

**KÉTDIMENZIÓS NYÁLMIRIGY MODELLEK AKTÍV,
TRANSZEPITELIÁLIS ELEKTROLIT
TRANSPORTJÁNAK VIZSGÁLATA**

Doktori értekezés

dr. Hegyesi Orsolya

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Varga Gábor az MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Köles László PhD, egyetemi docens
Dr. Maléth József PhD, tudományos munkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Fábián Tibor CSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kecskeméti Valéria PhD, egyetemi tanár
Dr. Kelentey Barna PhD, egyetemi docens

Budapest

2016

TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék	2
1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés	9
2.1 Az emberi nyálmirigyek szerkezete	9
2.2 Az epitélium szerkezete	11
2.3 A nyáleválasztás mechanizmusa	15
2.3.1 Elektrolit- és víztranszport	15
2.3.2 Protein szekréció	19
2.3.3 A nyálszekréció szabályozása	19
2.4 A nyál élettani szerepe	22
2.5 A nyáleválasztás csökkenése, hyposalivatio és xerostomia	23
2.5.1 Nyálmirigy regeneráció őssejtek segítségével	25
2.5.2 A nyálmirigy működésének helyreállítása génterápiával	26
2.5.3 „Mesterséges nyálmirigy” létrehozása	27
2.6 <i>In vitro</i> nyálmirigy modellek	28
3. Célkitűzések	32
4. Módszerek	33
4.1 Anyagok a sejttenyésztéshez	33
4.2 Sejttenyésztés és a sejtek előkészítése a további vizsgálatokhoz	33
4.2.1 Par-C10, HPAF és SMIE sejtvonalak tenyésztése	33
4.2.2 Primer sejttenyészet izolálása emberi nyálmirigyből	34
4.2.3 A sejtek előkészítése funkcionális vizsgálatokhoz	36
4.3 Génexpresszió vizsgálata	37
4.4 Funkcionális vizsgálatok	38
4.4.1 Oldatok a funkcionális vizsgálatokhoz	38
4.4.2 Rövidzárlati áram mérése	39
4.5 Amiláz termelés mérése	40
4.6 Statisztika	40
5. Eredmények	41
5.1 A felhasznált sejtek és primer sejt kultúrák jellemzése	41

5.2 Az acináris fenotípus megjelenésének és fennmaradásának igazolása a PTHSG és a huSMG sejtkultúrákban molekuláris vizsgálatokkal	44
5.3 Funkcionális vizsgálatok	45
6. Megbeszélés	53
7. Következtetések.....	60
8. Összefoglalás	62
9. Summary.....	63
10. Irodalomjegyzék	64
11. Publikációs jegyzék	81
12. Köszönetnyilvánítás	82

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACh	–	acetyl-kolin
ADP	–	adenozin-difoszfát
AE	–	anion exchanger; anion kicserélő
AE2	–	anion exchanger; anion kicserélő, 2-es altípus
Ag	–	ezüst
AMY1A	–	amiláz 1A altípus génjének neve
AP	–	apikális oldal
AQP	–	aquaporin, vízcsatorna
AQP1	–	aquaporin, vízcsatorna, 1-es altípus
AQP3	–	aquaporin, vízcsatorna, 3-as altípus
AQP5	–	aquaporin, vízcsatorna, 5-ös altípus
AQP8	–	aquaporin, vízcsatorna, 8-as altípus
ATCC	–	American Type Culture Collection; Amerikai Típusú Sejtkultúra Gyűjtemény
ATP	–	adenozin-triszfoszfát
ATP1A, B	–	nátrium-kálium ATP-ázt kódoló gén neve
Ad5	–	rekombináns adenovírus, 5-ös altípus
AdhAQP1	–	a humán aquaporin 1 típusú vízcsatornát szállító vírusvektor neve génterápiás eljárásnál
AAV2	–	adeno-asszociált vírus, 2-es altípus
BME	–	basement membrane extract; extracelluláris mátrix komponenseket tartalmazó készítmény
BL	–	bazolaterális oldal
CA	–	karbo-anhidráz
Ca ²⁺	–	kalcium ion
cAMP	–	ciklikus adenzil-monofoszfát
CaCC	–	kálciumion aktiválta kloridion csatorna
CCh	–	carbachol
cDNS	–	komplementer DNS

CFTR	–	cisztikus fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor
CGRP	–	kalcitonin gén relációs fehérje
Cl ⁻	–	klorid ion
CLDN1	–	claudin, 1-es altípus génjének neve
CLDN4	–	claudin, 4-es altípus génjének neve
CO ₂	–	szén-dioxid
CT	–	komputer tomográf
DAG	–	diacil-glicerol
DER	–	durva felszínű endoplazmás retikulum
DMEM	–	sejttenyésztő tápoldat; Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMEM-F12	–	sejttenyésztő tápoldat; Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture Ham F12 1:1 arányú keveréke
DNS	–	dezoxi-ribonukleinsav
EC	–	extracelluláris
ECM	–	extracelluláris mátrix
EDTA	–	etilén-diamin-tetraecetsav
EGF	–	epidermális növekedési faktor
EHS	–	Engelbreth-Holm-Swarm szarkóma
EIPA	–	5-(N-etil-N-izopropil) amilorid
ENaC	–	epiteliális nátrium ioncsatorna
FBS	–	fötális borjúsérum
FGF	–	fibroblaszt növekedési faktor
Gp-340	–	agglutinin másik neve
H ⁺	–	hidrogénion
hAQP1	–	humán 1-es típusú vízcsatorna
H ₂ DIDS	–	4,4'-diizotiocianatodihidrostilbén- 2,2'-diszulfonsav
HCO ₃ ⁻	–	bikarbonátion
Hepato-STIM	–	sejttenyésztő tápoldat; feldúsított Williams' E tápoldat
HEPES	–	4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav
HPAF	–	egy emberi hasnyálmirigy adenokarcinómából izolált sejtvonal neve
HS-LPO	–	emberi nyálmirigy eredetű laktoperoxidáz
HSG	–	emberi nyálmirigy tumorból létrehozott sejtvonal neve

HSPG2	–	heparán-szulfát proteoglikán 2
huSG	–	emberi nyálmirigyből izolált primer sejttenyészet neve
huSMG	–	human submandibular salivary gland; emberi szubmandibuláris nyálmirigyből izolált primer sejttenyészet neve
IgA	–	„A” szerotípusú immunglobulin
IK1	–	az SK4 közepes konduktanciájú kalciumion aktiválta kálium ioncsatorna
IMRT	–	intensity-modulated radiation therapy; daganat sugárterápiás eljárás
IP ₃	–	inozitol-triszfoszfát
Isc	–	rövidzárlati árammennyiség
JAM	–	junctional adhesion molecule; a sejtkepcsoló struktúrákat felépítő egyik fehérjecsald
JAM-A	–	junctional adhesion molecule, A altípus
K ⁺	–	kálium ion
KCNMA1	–	a maxi K (SLO) nagy konduktanciájú kalciumion aktiválta kálium ioncsatornát kódoló gén neve
KCNN4	–	az IK1 (SK4) közepes konduktanciájú kalciumion aktiválta kálium ioncsatornát kódoló gén neve
maxi K	–	nagy konduktanciájú kalciumion aktiválta kálium ioncsatorna
MEM	–	sejttenyésztő tápoldat; Minimal Essential Medium
MPO	–	mieloperoxidáz
MRI	–	mágneses magrezonancia képalkotás
mRNS	–	hírvivő (messenger) RNS
MUC5B	–	mucin, 5B altípus
MUC7	–	mucin, 7-es altípus
Na ⁺	–	nátrium ion
NBC1	–	nátrium-bikarbonát kotranszporter, 1-es altípus
NH ₄ ⁺	-	ammónium ion
NHE1	–	nátrium-hidrogén kicserélő (exchanger), 1-es altípus
NHE2	–	nátrium-hidrogén kicserélő (exchanger), 2-es altípus
NHE3	–	nátrium-hidrogén kicserélő (exchanger), 3-as altípus
NKCC	–	nátrium-kálium-2 klorid kotranszporter

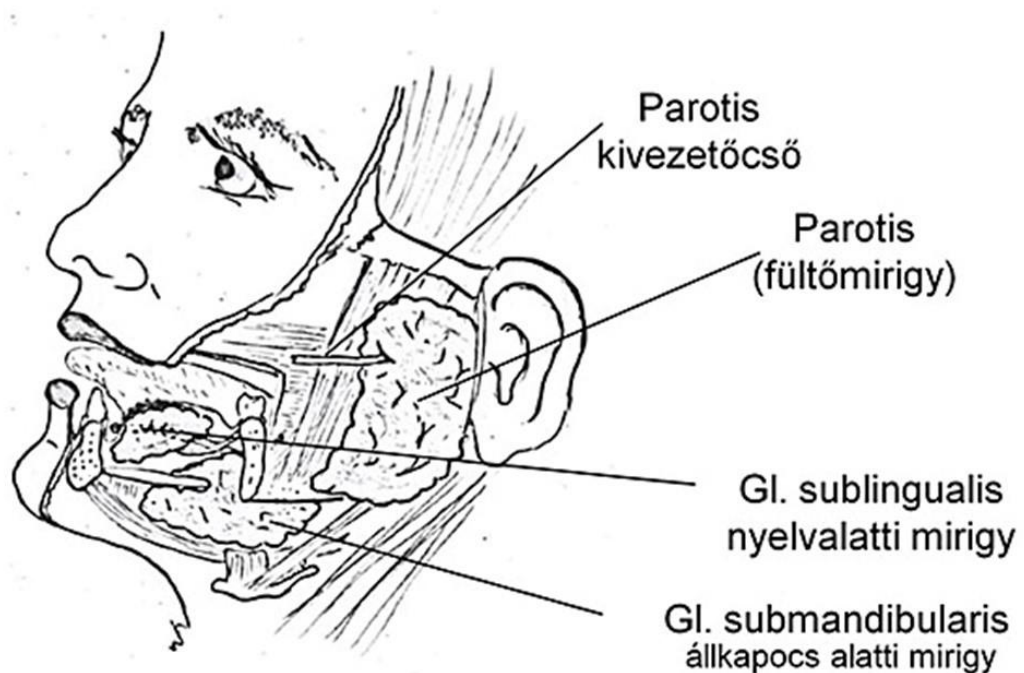
NKCC1	–	nátrium-kálium-2 klorid kotranszporter, 1-es altípus
NMDG ⁺	–	N-metil-D-glukamin ion
Par-C10	–	egy patkány parotisz acináris eredetű sejtvonal neve
PCR	–	polimeráz láncreakció
PIP ₂	–	foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát
PlndIV	–	heparán-szulfát proteoglikán 2 IV. doménje
P1	–	1-es típusú purinerg receptor
P2X	–	2-es típusú purinerg receptor, X altípus
P2Y	–	2-es típusú purinerg receptor, Y altípus
PGA	–	poliglikolsav
PGA/PLLA	–	poli-L-tejsavval bevont poliglikolsav
PKA	–	protein-kináz, „A” típus
PLLA	–	poli-L-tejsav
PTHSG	–	primary total human salivary gland; emberi szubmandibuláris nyálmirigyből izolált primer sejttenyészet neve
qRT-PCR	–	kvantitatív reverz-transzkriptáz polimeráz láncreakció
RNS	–	ribonukleinsav
RPMI-1640	–	sejttenyésztő tápoldat; Roswell Park Memorial Institut 1640
RT-PCR	–	reverz-transzkriptáz polimeráz láncreakció
SCNN1A	–	az ENaC epiteliális nátriumion csatornát kódoló gén neve
SEM	–	standard error of the mean, az átlag szórása
SGT	–	szubmandibuláris nyálmirigy transzfer
SK4	–	az IK1 közepes konduktanciájú kalciumion aktiválta kálium ioncsatorna
SLO	–	a maxi K nagy konduktanciájú kalciumion aktiválta kálium ioncsatorna
SLC4A2	–	anion kicserélő 2-es altípus (AE2)
SLC4A4	–	nátrium-bikarbonát kotranszporter, 1-es altípus
SLC9A1	–	nátrium-hidrogén kicserélő, 1-es altípus
SLC9A2	–	nátrium-hidrogén kicserélő, 2-es altípus
SLC9A3	–	nátrium-hidrogén kicserélő, 3-as altípus
SLC12A2	–	nátrium-kálium-2 klorid kotranszporter, 1-es altípus

SLC26A6	–	egy anion kicserélő génjének neve
SMIE	–	patkány szubmandibuláris nyálmirigy eredetű sejtvonal nev
SS	–	Sjögren-szindróma
TER	–	transzepiteliális ellenállás
TMEM16A	–	kalciumion aktiválta kloridion csatorna
TJ	–	tight junction, sejtkapcsoló struktúra
UTP	–	uridin-triszfoszfát
UDP	–	uridin-difoszfát
VIP	–	vazoaktív intesztinális fehérje
V_m	–	transzepiteliális potenciálkülönbség
ZOs	–	zonula occludinek; a sejtkapcsoló struktúrákat felépítő egyik fehérjecsald
ZO-1	–	zonula occludin 1-es altípus

2. BEVEZETÉS

2.1 AZ EMBERI NYÁLMIRIGYEK SZERKEZETE

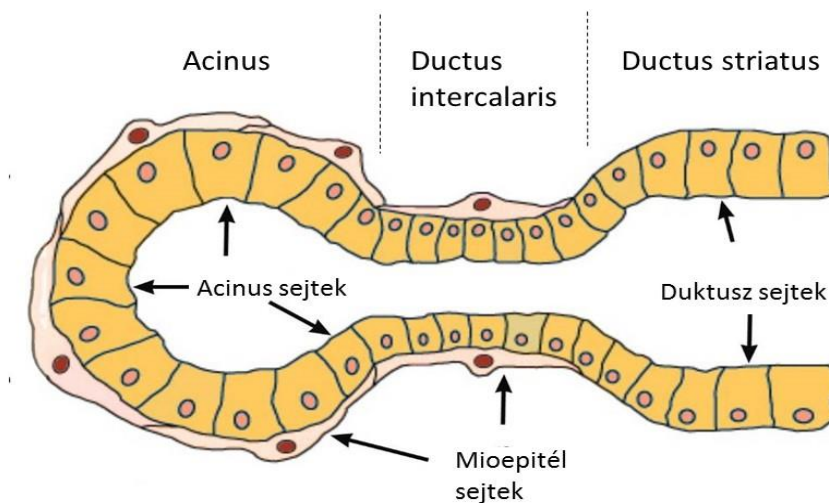
A nyálmirigyekben naponta közel 1-1,5 liter nyál termelődik. Ennek több mint 90%-át a három pár nagy nyálmirigy termeli: a *glandula sublingualis*, a *glandula submandibularis* és a *glandula parotis* (1. ábra). A fennmaradó mennyiségért a szájüregi nyálkahártyában elhelyezkedő többszáz kisnyálmirigy felelős: a *glandulae labiales* az ajkakban, a *glandulae buccales* a pófákban, a *glandulae palatinae* a szájpadon illetve a nyelvben található *Nuhn-Blandin*, *von Ebner* és *Weber* mirigyek [1-3].



1. ábra A nagy nyálmirigyek elhelyezkedése

(kép forrása: <http://www.tankonyvtar.hu>, letöltés ideje: 2016.04.23.)

A nyálmirigyeket kötőszövetes tok veszi körül és a mirigy állománya kötőszöveti szeptumokkal elválasztott lebenyekre tagolódik [2]. A nyálelválasztás alapegysége az acinus vagy végkamra, melynek két típusát különítjük el a termelt szekrétum szerint, a mucinózus és a szerózus acinusokat. A mucinózus acinusok szekrétuma kis mennyiségű, sűrű, a szerózus acinusok ezzel szemben nagy mennyiségű híg nyálat termelnek. A gl. parotis szerózus acinusokból áll, a szubmandibuláris nyálmirigyben az acinusok többsége (kétharmada) tisztán szerózus, némelyiknél viszont a kivezetőcső felé eső rész mucinózus szerkezetű, a félgömbszerű vég pedig szerózus. Ez utóbbi rész metszetben félhold alakú, ezek a Gianuzzi-félholdak. A gl. sublingualis szintén kevert mirigy, kétharmad részben mucinózus végkamrákkal. A termelt nyál faágszerű hálózatot alkotó kivezető csőrendszeren, a duktuszokon keresztül jut a szájüregbe [2]. Az acinusokat acinus sejtek, a duktuszok falát pedig duktusz sejtek alkotják. Az acinusokat és a duktuszok kezdeti szakaszát (ductus intercalaris) mioepitél sejtek veszik körül (2. ábra). Ezek összehúzódása segíti a nyál ürülését a végkamrákból. A duktusz rendszer későbbi szakaszai (ductus striatus, ductus excretoricus) nem csak az elvezetésben vesznek részt, hanem módosítják is a nyál összetételét [3, 4].



2. ábra A nyálmirigy végkamra és a kivezető csőrendszer kezdeti szakasza

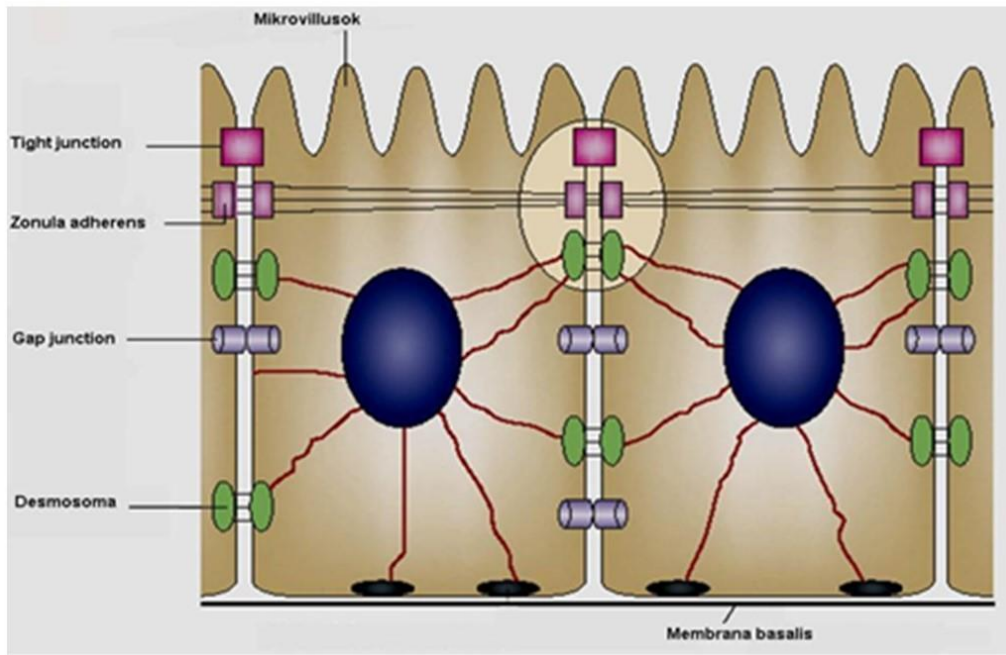
(az eredeti, angol nyelvű kép forrása: www.parotidmd.com, letöltve: 2016.03.24)

2.2 AZ EPITÉLIUM SZERKEZETE

Az epitélium egy vékony hámréteg, mely az emberi szervezetben számos helyen megtalálható. Epitélium határolja el a testnedveket a külső környezettől (pl.: gasztrointesztinális traktus) és a különböző folyadéktartókat egymástól (pl.: vese kiválasztó működése). Az epitélisejtek a vékony (30-70 nm vastagságú) membrana basalishoz rögzülnek, melynek fő alkotói a IV. típusú kollagén, a fibronectin és a laminin. A membrana basalis választja el a hámréteget az alatta lévő kötőszövetről. A sejtek bazálmembrán felé eső oldalát bazolaterális (BL), lumen felé esőt pedig apikális (AP) oldalnak hívjuk. A bazolaterális és az apikális plazmamembránban a membránösszetevők, a transzporterek és az enzimek különbözőképpen oszlanak el (ld. a 2.3.1. fejezetben) [5].

Az epitélium feladata megakadályozni, hogy létfontosságú ionok, metabolitok és víz vesszen el a szervezetből vagy káros anyagok, mikroorganizmusok juthassanak be oda, ezt barrier funkciónak nevezzük. Ugyanakkor a szervezet működése szempontjából alapvető, hogy szelektív transzportfolyamatok által a káros anyagok kijussanak, a tápanyagok pedig bekerüljenek a keringésbe, ez szintén az epitélium feladata. A transzport megvalósulhat a sejteken át (transzcelluláris transzport) és a sejtek közötti sejtkapcsoló struktúrán, a juncionális komplexen keresztül (paracelluláris transzport) [5]. A juncionális komplex (3. ábra) fő alkotóelemei a fokális adhézciók, a gap junction, az intermediate junction (zonula adherens), a dezmoszóma (macula adherens) és a szoros kapcsolat (tight junction vagy zonula occludens) [6]. A fokális adhézciókat alkotó *integrin* fehérjék az extracelluláris mátrix (ECM) és a sejt között teremtenek kapcsolatot, ezzel nélkülözhetetlen szerepet töltenek be a jelátviteli folyamatokban [7], a génexpresszió szabályozásában és így a sejtadhézió, migráció és a sejt differenciáció során is [8]. A gap junctiont alkotó *connexin* fehérjék egy kb. 2 nm átmérőjű csatornát (connexont) hoznak létre a szomszédos sejtek citoszolja között. A gap junction szerepe az excitábilis sejtekben (pl. neuronok, szív- és simaizom sejtek) alapvető fontosságú. Az intercelluláris csatornák nemcsak a szinaptikus transzmissziót gyorsítják, hanem kisebb sejtcsoportok összehangolt működését is lehetővé teszik a csatornákon keresztüli, gyors ionáramlás révén. A gap junction jelenléte a többi szövetben is elengedhetetlen. A citoszol kapcsolat segítségével a szomszédos sejtek képesek

kompenzálni egy kisebb területet érintő átmeneti tápanyag hiányt vagy akár egy olyan szomatikus mutációt is, melynek következtében egy érintett sejtől valamelyik fontos metabolikus enzim hiányzik [9]. A gap junction jelenléte a normál nyáltermeléshez is elengedhetetlen, de ennek molekuláris részletei még nem ismertek [10].



3. ábra A **junkcionális komplex** [11]

(az eredeti, angol nyelvű ábra forrása: www.nature.com, letöltve 2016.03.24)

A zonula adherens övszerűen fut körbe a sejten az apikális oldalhoz közel, a desmoszóma pedig foltszerűen helyezkedik el [5]. Elsődleges feladatuk a sejtek mechanikai rögzítése egymáshoz, de a zonula adherens alkotóelemei, a *cadherine*nek fontos szerepet játszanak a nyálmirigy morfogenezisében is [12].

A tight junction (TJ) szintén az apikális harmadban található, vékony övként veszi körbe a sejteket. A körkörös rögzítésen túl a tight junction több fontos feladatot lát el:

- megakadályozza a sejtmembránban a membránfehérjék oldalirányú mozgását, így elsődleges szerepe van a polarizált sejtfelepítés megtartásában [11, 13],
- meghatározza az epitélium átteresztőképességét, a paracelluláris permeabilitást. Ez alapján elkülönítjük a szorosan záró, „tight” epitéliumot és a szivárgó, „leaky” epitéliumot [5],

- a paracelluláris barrier szerepe révén fenntartja a szelektív transzepteliális ion grádiens, ami elengedhetetlen az epiteliális transzport folyamatokhoz [14].

A tight junction felépítésében több transzmembrán fehérjecsald vesz részt, a *claudinok*, *occludinok* és a *JAM-ek* (*junctional adhesion molecules*). A humán nyálmirigyekben a claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7, -11, -16, az occludin és a JAM-A jelenlétét mutatták ki [6]. Bár a tight junction az utóbbi években intenzív kutatás tárgya, az egyes alkotóelemek szerepéről ma még főként állati eredetű sejtvonalakon végzett kísérletekből származnak adatok. A nyálmirigyekben előforduló TJ fehérjék lokalizációját és feltételezett szerepét az 1. táblázat foglalja össze. A táblázat Baker 2010-es áttekintő cikke [6] alapján készült, kiegészítve az újabb kutatási eredményekkel.

A claudin-1 (CLDN1) szerepe kritikus a TJ felépítésében. Egy tanulmány szerint a claudin-1 hiányában a kísérleti állatok (CLDN1 knock out egerek) 1 napos korukban elpusztultak [15]. A CLDN1-et először csak a ductusz sejtekben tudták kimutatni mind patkány nyálmirigyben [16], mind humán kisnyálmirigyekben [17], az acinusokban és a nagy nyálmirigyek ductuszaiban nem. Későbbi vizsgálatok már detektálták emberi nagy nyálmirigyek ductusz sejtjeiben, sőt, szerózus acinusaiban is [18]. A TJ a sejt citoszkeletonjával is összeköttetésben van egy fehérjecsald, a *zonula occludinek* (ZO) tagjai révén. A humán nagy nyálmirigyekben a ZO-1 kimutatható az acinusokban, ductuszokban és az endothel sejtekben is [18]. A ZO-1 citoplazmatikus fehérje, mely kapcsolatban áll a TJ fehérjékkel (occludin, claudin-16, JAM-A) és az aktin citoszkeletonnal is [19, 20]. A ZO-1-et jelenleg a nyálmirigy differenciáció egyik legfontosabb markereként tartják számon [21].

1. táblázat A tight junction felépítésében részt vevő fehérjék

<i>Protein neve</i>	<i>Előfordulása humán nagy nyálmirigyekben</i>	<i>Előfordulása humán kis nyálmirigyekben</i>	<i>Feltételezett szerepe</i>
CLAUDIN-1	szerozus acinus [18], duktusz [16]	duktusz [17]	sejtpolaritás megőrzése, „zár”: paracelluláris permeabilitás nő
CLAUDIN-2	acinus, duktusz		„nyit”: paracelluláris permeabilitás csökken
CLAUDIN-3	acinus, duktusz	acinus, duktusz	sejttípustól függ
CLAUDIN-4	acinus, duktusz	acinus, duktusz	paracelluláris barrier funkció szabályozása [22, 23]
CLAUDIN-5	acinusok és duktuszok körüli endotél sejtek		tápanyagok transzportja a vér és a nyálmirigy között
CLAUDIN-6	csak magzati korban van jelen, felnőtt szövetben nem kimutatható		
CLAUDIN-7		duktusz	paracelluláris víz- és iontranszport
CLAUDIN-11		duktuszsejt citoplazmája!	nem ismert
CLAUDIN-16	duktusz acinus BL oldal		duktusz: ZO-1 komplex tagja; egy acinuson belüli vagy szomszédos acinusokat alkotó acinussejtek összekötése
OCCCLUDIN	duktusz, acinus, endotél	nem ismert	paracelluláris transzport pórusok létrehozása, ZO-1 komplex tagja
JAM	acinus, duktusz	nem ismert	szignál transzdukció, sejtpolarizáció, TJ képzés szabályozása[24], ZO-1 komplex tagja;

2.3 A NYÁLELVÁLASZTÁS MECHANIZMUSA

A nyálmirigyekben az elektrolit- víz- és fehérje szekréció fő színtere az acinus. A szekréció két fázisú: az acinus sejtek által termelt primer, izozmotikus szekrétum a ductusz rendszerben áthaladva módosul, így alakul ki a végső, hipozmotikus nyál [25].

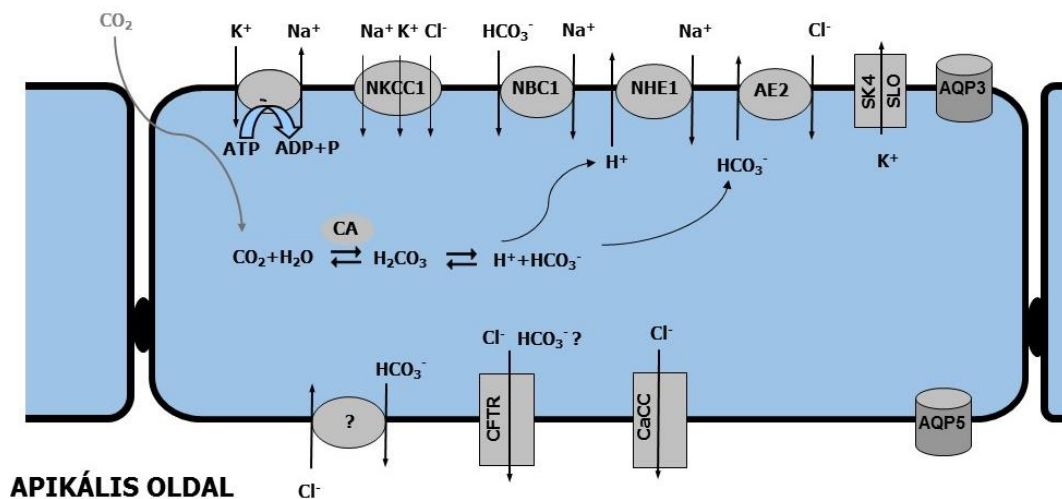
2.3.1 ELEKTROLIT- ÉS VÍZTRANSPORT

Az acinusokban a víz két útvonalon át jut a lumenbe: paracellulárisan a juncionális komplexen és transzcellulárisan az epitélsejteken keresztül. A víztransport - akár paracelluláris, akár transzcelluláris - passzív folyamat. A nyálszekréció során a lumenbe szekretálódott elektrolitok ozmotikus grádiens alakítanak ki a lumen és az interstícium között, a víz mozgásának ez a grádiens a hajtóereje [26]. A transzcelluláris transport útvonal meghatározó elemei az aquaporin vízcsatornák [27]. Az aquaporinoknak (AQP) a nyálmirigyben több típusa mutatható ki: az AQP1 az endothel sejtekben, az AQP3 az acináris sejtek bazolaterális membránjában, AQP5 az acináris sejtek lumenális membránjában lokalizálódik, míg az AQP8 a mioepitél sejtekben található [27-29]. A nyálszekréció szempontjából kiemelkedő fontosságú az AQP5 vízcsatorna [29]. AQP5 hiányában egereknél a nyáltermelés drasztikus, akár 60%-os csökkenését figyelték meg [30, 31]. A ductuszok fala a víz szempontjából átjárhatatlan [13].

Az elektrolit szekréció ezzel szemben aktív, energiaigényes folyamat. Az acinusejt bazolaterális membránjában lévő **Na⁺/K⁺ ATPáz** az ATP bontásából származó energia felhasználásával 3 nátriumiont pumpál ki a sejtől és cserébe 2 káliumiont visz be. A kloridionok az így kialakult relatív magas extracelluláris Na⁺ koncentrációt kihasználva a bazolaterális membránban lévő elektroneutrális **Na⁺/K⁺/2Cl⁻ kotranszporter**en (**NKCC1**) keresztül lépnek be a sejtbe [32, 33]. A kálium ionok a bazolaterális membránban lokalizálódó magas konduktanciájú **maxi K** vagy **SLO1** valamint a közepes konduktanciájú **IK1** vagy **SK4** csatornán keresztül recirkulálnak az interstíciumba. Az SK4 Ca²⁺-aktiválta, a maxi K pedig Ca²⁺ és feszültségfüggő úton is nyílik. Knock-out egereken végzett vizsgálatok szerint a

nyálszekréció csak a két csatorna együttes hiányában csökken le, mely arra utal, hogy a működésük egymástól függetlenül is képes biztosítani a K^+ kiáramlását a sejtből [34, 35]. Létezik egy másik bazolaterális kloridfelvételi út is, mely két anionporter, a **Na^+/H^+ kicserélő (NHE1)** és a **Cl^-/HCO_3^- kicserélő (AE2)** koordinált működésével valósul meg [4, 32, 33, 36]. Az ioncseréhez szükséges H^+ és a HCO_3^- ionok forrása egyrészt az interstíciumból bediffundáló CO_2 , melyet a **karboanhidráz enzim (CA)** víz segítségével szénsavvá alakít. A szénsav ezután spontán disszociál H^+ és a HCO_3^- ionokra [37]. Állatkísérletes modellek szerint a bikarbonát ionok a bazolaterális membránban lokalizálódó **Na^+/HCO_3^- kotranszporter (NBC1)** útján is bejuthatnak a sejtbe [38-43]. Az NBC1 működése humán szövetekben még nem tisztázott [33, 44]. Az NKCC1 knock-out egereken végzett kísérletek azt mutatják, hogy a kloridfelvétel 70%-áért az NKCC, míg 30%-áért a bikarbonátfüggő útvonal a felelős [45]. Az apikális oldalon a kloridionok egy Ca^{2+} aktiválta klorid ioncsatornán (CaCC) keresztül lépnek a lumenbe. A csatornát a **TMEM16A** gén kódolja [46-48]. A K^+ bazolaterális és a Cl^- apikális távozása következtében a lumen az interstíciumhoz képest erősen negatív töltésűvé válik. Ez a hajtóereje a Na^+ ionok passzív, paracelluláris transzportjának [4, 44]. (4. ábra).

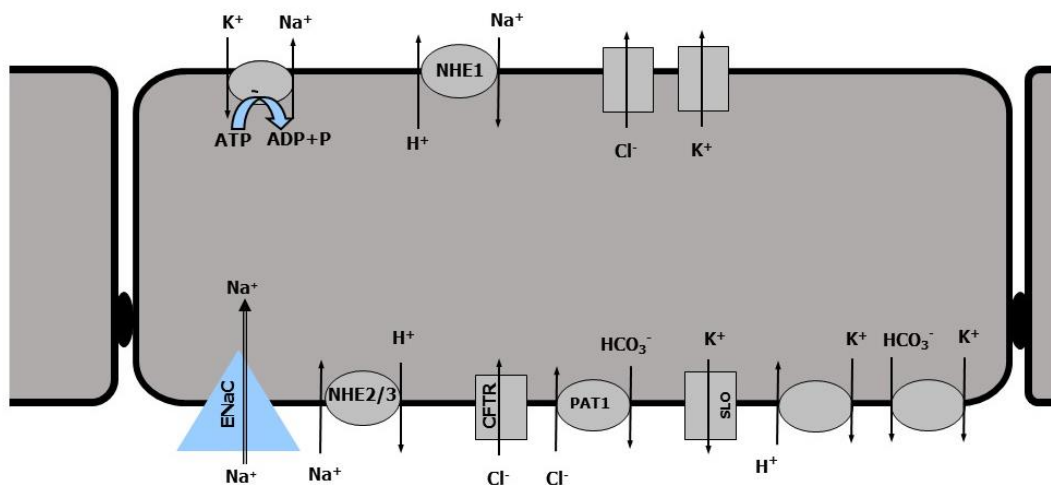
BAZOLATERÁLIS OLDAL



4. ábra Az nyálmirigy acinus transzporterei (saját ábra) NKCC1: 1. típusú $Na^+K^+2Cl^-$ kotranszporter, NBC1: 1. típusú $Na^+HCO_3^-$ kotranszporter, NHE1: 1. típusú Na^+H^+ -kicserélő, AE2: 2. típusú anion kicserélő, SK4 és SLO: Ca^{2+} aktiválta K^+ csatorna, AQP3, 5: 3. és 5. típusú vízcsatorna, CFTR: cisztikus fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor, CaCC: Ca^{2+} aktiválta Cl^- csatorna

A primer szekrétum a ductusz rendszerben módosul: a Na^+ és a Cl^- visszaszívása és a K^+ ionok szekrécója következtében a végső nyál hipozmotikus, kálium tartalma a plazmáénál magasabb [32]. A pontos ionösszetétel a nyál áramlási sebességétől függ: nem simulált állapotban a reabszorpció tökéletesebb, a végső nyál hipozmotikusabb lesz, míg a stimulált nyál (pl. étkezéskor) összetétele jobban hasonlít a primer szekrétuméra [4].

BAZOLATERÁLIS OLDAL



APIKÁLIS OLDAL

5. ábra A nyálmirigy ductusz transzporterei (saját ábra) NHE1, 2, 3: 1., 2., 3. típusú Na^+ - H^+ -kicszerelő, ENaC: epiteliális nátriumion csatorna, CFTR: cisztikus fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor, PAT1: $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ kicszerelő; SLO: Ca^{2+} aktiválta K^+ csatorna

A ductuszsejtek bazolaterális oldalán lévő **Na^+/K^+ ATPáz** a nátrium ionok eltávolítását végzi a sejtből, egyben biztosítja az alacsony intracelluláris nátrium koncentrációt, mely az apikális oldalon lévő transzporterek működéséhez szükséges [4]. Egér és patkány nyálmirigyhez hasonlóan az emberi nyálmirigyben a ductusz sejtek apikális oldalán kimutatható az **NHE2/NHE3** Na^+/H^+ kicszerelők és epiteliális nátrium ioncsatorna, az **ENaC**; míg a bazolaterális oldalon kimutatható az **NHE1** Na^+/H^+ kicszerelő jelenléte. [33, 42]. Egereken végzett knock-out vizsgálatok azonban azt mutatják, hogy a Na^+ reabszorpció az ENaC csatornán keresztül valósul meg, a Na^+/H^+ kicszerelők szerepe egyelőre nem tisztázott [49]. A kloridionok visszavétele a **CFTR** (cisztikus fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor) csatorna és egy

Cl⁻/HCO₃⁻ kicserélő, a PAT1 (Putative Anion Transporter, melyet az SLC26A6 gén kódol) összehangolt működésével jön létre. A CFTR-nek ezen túlmenően összetett szabályozó szerepe is van [49-51]. Az apikális oldalon három kálium transzporter is kimutatható: egy **K⁺/H⁺ kicserélő**, egy **K⁺- HCO₃⁻ kotranszporter** és a **SLO csatorna**. Bár a kálium szekréció részleteiben nem ismert, a jelenlegi adatok szerint az SLO csatornának kiemelt szerepe van a szekrécióban [52] (5. ábra).

Szinte mindegyik transzporternek több elnevezése ismert. Az egységes nomenklátúra a fehérjét kódoló gén neve alapján alakult ki, de sok esetben inkább a mechanizmusra utaló név (pl. kotranszporter, kicserélő, stb) a használatos. A 2. táblázat transzporterek különböző elnevezéseit, lokalizációját és feltételezett szerepét foglalja össze.

2. táblázat Az emberi nyálmirigy elektrolitszekréciójában részt vevő legfontosabb transzporterek. Rövidítések a „Lokalizáció” oszlopban: A=acinus, D=duktusz, BL=bazolaterális membrán, AP= apikális membrán

GÉN NEVE	EGYÉB NÉV	FUNKCIÓ	LOKALIZÁCIÓ
ATP1A, B		Na ⁺ /K ⁺ ATPáz	A: BL; D: BL
CFTR	CFTR	összetett, lásd a szövegben	D: AP
KCNN4	IK1, SK4	kálium csatorna	A: BL
KCNMA1	SLO1, maxi K	kálium csatorna	A: BL; D: AP
SCNN1A	ENaC		D: AP
SLC4A2	AE2	anion kicserélő	A: BL
SLC4A4	NBC1, NBCe1	Na ⁺ -HCO ₃ ⁻ kotranszporter	A: BL
SLC9A1	NHE1	Na ⁺ /H ⁺ kicserélő	A: BL
SLC9A2	NHE2	Na ⁺ /H ⁺ kicserélő	D: BL
SLC9A3	NHE3	Na ⁺ /H ⁺ kicserélő	D: AP
SLC12A2	NKCC1	Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ kotranszporter	A: BL
SLC26A6	PAT1	Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ kicserélő	D: AP; A?
TMEM16A		Ca ²⁺ akt. Cl ⁻ csatorna	A: AP

2.3.2 PROTEIN SZEKRÉCIÓ

A nyálban lévő fehérjék (amiláz, lizozim, IgA, mucin, stb) nagyrészt a nyálmirigyekből származnak. Legnagyobb mennyiségét az α -amiláz teszi ki, ennek 70%-át a parotisz szerózus végkamrái termelik. A szerózus acinusokban termelődik az antimikrobiális védelemben szerepet játszó fehérjék, enzimek legnagyobb része, a mucinózus végkamrák fő terméke pedig a mucin (a fehérjék élettani szerepéről az 2.4. fejezetben lesz szó). A nyálmirigy sejtekben a fehérjék termelése folyamatos és a sejten belül vektoriális transzporttal jutnak a termelés helyétől, a durva felszínű endoplazmás retikulumból (DER) a lumenig. A DER-ből a Golgi-komplexbe kerülnek, ahol számos poszttranszlációs módosításon mennek keresztül. Ezután a szekréciós granulomokban (zimogén szemcsék) tárolódnak, míg a megfelelő idegi stimuláció hatására exocitózissal ürülnek az apikális oldalon a lumenbe [4, 44].

2.3.3 A NYÁLSZEKRÉCIÓ SZABÁLYOZÁSA

A kis nyálmirigyek folyamatosan, az idegi szabályozástól lényegében függetlenül szekretálnak. A nagy nyálmirigyek viszont paraszimpatikus és szimpatikus beidegzéssel is rendelkeznek [4].

A paraszimpatikus stimuláció nagy mennyiségű, híg nyál termeléséhez vezet. Az acetil-kolin (ACh) az acinus sejtek bazolaterális oldalán muszkarin receptorokhoz köt. A muszkarin receptor G-fehérjékhez kötött, a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PIP₂) hidrolízisével másodlagos hírvivő molekulákat, inozitol-1,4,5-triszfoszfátot (IP₃) és diacil-glicerolt (DAG) hoz létre. Az IP₃ kalciumot szabadít fel az endoplazmás retikulumból, a megemelkedett intracelluláris Ca²⁺ szint hatására pedig nyílnak a bazolaterális oldalon a Ca²⁺ aktiválta K⁺ csatornák és az apikális oldalon a Ca²⁺ aktiválta Cl⁻ csatorna. A bazolaterális K⁺ kiáramlás hatására a sejt belseje negatív töltésűvé válik. Ez gyorsítja az apikális oldalon az anionok leadását a lumenbe, ami pedig ozmotikus úton gyorsítja a víz szekrécióját [26]. A [Ca²⁺]_i ezen kívül fokozza a bazolaterálisan lévő Cl⁻/HCO₃⁻ és Na⁺/H⁺ antiporterpár és a Na⁺-K⁺-2Cl⁻ kotranszporter működését [53, 54] és megindítja az AQP5 aquaporinok beépülését az apikális

plazmamembránba [55]. Úgy tűnik, a muszkarinerg stimuláció a paracelluláris transzport folyamatokat is szabályozza. A muszkarinerg agonista carbachol hatására csökken a claudin-4 (CLDN4) mennyisége a membránban és csökken a CLDN-4 expressziója is. Ennek eredményeképpen pedig fokozódik a paracelluláris permeabilitás [22, 23].

A szimpatikus stimuláció következtében kis mennyiségű, de magas fehérje tartalmú, viszkózus nyál termelődik. Ez β -adrenerg receptorokon keresztül valósul meg, mely fokozott adenilát-cikláz aktivitáshoz és így a sejten belül a ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) szint növekedéséhez vezet. A cAMP szint növekedése aktiválja a protein-kináz A-t (PKA), ez pedig egy foszforilációs útvonalon fokozza a szekrétoros granulumok exocitózist és így a fehérje szekréciót. A cAMP szint növekedésével hatnak más neuropeptidek is, így például a VIP (vazoaktív intesztinális fehérje) vagy a CGRP (kalcitonin gén relációs peptid) is. [26] A kétféle stimuláció nem független egymástól. A szimpatikus stimulus hatására is szekretálódik folyadék és a paraszimpatikus hatás is kivált valamennyi fehérje termelést [4]. Állatkísérletes modellekben fény derült arra, hogy a PKA foszforilálja az IP_3 receptorát és ezzel növeli az érzékenységet, a megemelkedett kalcium szint pedig Ca^{2+} -érzékeny adenilát-cikláz (adenilát-cikláz 8) útján növeli a cAMP-szintet [26].

Az extracelluláris adenzin vegyületek esetleges szabályozó szerepét Szent-Györgyi Albert és munkatársai már 1929-ben leírták [56]. Azóta fény derült arra, hogy a purinerg szabályozás fontos szerepet tölt be a például a vesében, légzőrendszerben, a gasztrintesztinális traktusban, a májban, a hasnyálmirigyben és az nyálmirigyekben is [57-59]. Az ATP extracelluláris térbe való kilépése vezikuláris és nem vezikuláris transzporttal is megvalósulhat. A vezikuláris transzport folyamatát először idegsejteken írták le, de nem excitábilis sejteken is megfigyelhető [60]. A neuronokban az ATP szekréciós vezikulákban tárolódik igen magas, 100 mM-os koncentrációban. Megfelelő idegi vagy agonista stimulus hatására ezekből a vezikulákból (más neurotranszmitterekkel, pl acetilkolin, noradrenalin, VIP együtt) exocitózissal ürül szinapszisokba [60, 61]. A nem vezikuláris transzport alapja, hogy a sejtek citoszoljában az ATP 3-10 mM-os koncentrációban van jelen, míg extracelluláris koncentrációja a nanomólos tartományba esik. Ez a különbség olyan kémiai grádiens teremt, ami lehetővé teszi az ATP kiáramlását nagy áteresztő képességű csatornákon

keresztül [62]. Bár az ATP leadás és a CFTR működése között nagyon szoros az összefüggés, jelenleg úgy tűnik, hogy nem a CFTR működik ATP-csatornaként, hanem a CFTR szabályozó molekulaként van jelen és stimulálja más csatornák működését [63, 64], illetve ABC (ATP binding cassette) fehérje révén maga is képes lehet ATP transzportra, nem konduktív módon [58, 65]. Az ATP leadásban részt vevő transzporterek molekuláris azonosítását nehezíti, hogy úgy tűnik, sejtípusonként más és más mechanizmus dominál az ATP leadásában [58]. A vezikuláris transzport gyorsabb, intenzívebb választ eredményez, főként, hogy a vezikulák maguk is tartalmazhatnak ATP-csatornákat, így a két mechanizmus kombinálódhat [66]. Az ATP az intercelluláris kommunikációban is részt vesz a connexinek által létrehozott csatornákon keresztül [67].

A purinerg receptorok két fő típusra oszthatók: az adenosin vegyületek által aktivált P1 receptorokra (adenosin receptorok) és a P2 receptorokra, melyeket elsősorban az ATP, ADP, UTP és az UDP aktivál. A P1 receptorok négy altípusa van, az A1, A2A, A2B és A3, melyek G-fehérjéhez kötött jelátviteli utakon keresztül hatnak. A P2 receptorok két további altípusra oszthatók: a P2X és a P2Y receptorcsaládra. A P2X receptoroknak 7 altípusa ismert (P2X1-7), a P2Y-nak pedig emberi szövetekben 8 altípusa mutatható ki a P2Y1, 2, 4, 6, 11-14 [68]. A P2X lényegében egy nem szelektív kation csatorna, melyet az extracelluláris ATP aktivál. Képes közvetlenül, Ca^{2+} csatornaként működve növelni az intracelluláris Ca^{2+} szintet, a kationok beáramlását követő depolarizáció pedig nyitja a feszültségfüggő csatornákat. A P2Y receptorok pedig nagyrészt G-fehérjéken keresztül, a PLC-IP3-DAG jelátviteli útvonalon át, az intracelluláris Ca^{2+} szint növelése útján hatnak [58]. A P2Y₁₁ altípus azonban közvetlenül aktiválja az adenilát-cikláz [69].

Patkány és emberi parotisz sejteken végzett vizsgálatok alapján úgy tűnik, a nyálmirigyekben az ATP által kiváltott $[\text{Ca}^{2+}]_i$ szint növekedés elsősorban P2X receptorokon keresztül valósul meg [70].

2.4 A NYÁL ÉLETTANI SZEREPE

A nyál elengedhetetlen szerepet játszik a táplálkozásban és az egész szájüreg védelmében. A nyál a táplálkozás során elősegíti a falat képződését és nedvesen tartását, a rágást és az ízlelést, a benne lévő emésztőenzimek (amiláz, lipáz) révén megkezdődik a táplálék emésztését [71].

A nyál legnagyobb részét (98%-át) víz alkotja. Ennek mosó-tisztító hatása a szájüregi védelemben fontos szerepet tölt be. A nyálban oldott ionok egy részének fő feladata a víztranszport biztosítása (*klorid, nátrium, kálium*), míg a *bikarbonát ionok* a nyál elsődleges puffer rendszerét biztosítják. Ez a puffer rendszer képes a kívülről (étel, ital) vagy belülről (reflux) érkező savas hatások közömbösítésére, a fogak szempontjából optimális pH (pH=5,6) visszaállítására. A fogzománc ennél savasabb közegben demineralizálódik, vagyis *kalcium és foszfát* oldódik ki belőle, míg a helyreállt pH tartományban a remineralizációs folyamatok kerülnek túlsúlyba [4].

A nyálmirigyek által termelt glikoproteinek, a *mucin* és az *agglutinin* kettős feladatot látnak el. A mucinok egyik típusa, a MUC5B erős vízmegkötő képességű, nagyméretű glikoprotein, ez a fő összetevője a szájüregi nyálkahártya epitéliumát borító viszkózus anyagnak, mely védi az epitéliumot a mechanikai sérülésektől, savas hatásoktól és a vírusok, baktériumok vagy gombák direkt károsító hatásaitól is [72]. Az MUC7 mucin viszont kisebb és másképp vesz részt az antimikrobiális védelemben [73]. Az MUC7 és az agglutinin (más néven *Gp-340*) többféle *Streptococcus* faj felszínéhez képes kötődni (pl. *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguis*), így gátolják a kolonizációt és elősegítik a baktériumok fagocitózisát [71]. A szájüregi védelemben az *immunoglobulinok* közül az IgA típus játsza a legfőbb szerepet. A nyálban az IgA dimer formában van jelen, amelyet *szekrétoros IgA*-nak (s-IgA) hívnak. A s-IgA képes komplexet képezni az agglutininnal, így egymás hatását erősítik a kórokozók eltávolításában [4].

A *cisztein proteínáz inhibitorok* (cisztatínok), *szerin proteáz és metalloproteáz inhibitorok* a mikroorganizmusok által termelt vagy a szervezet immunválasza során termelődött proteolitikus enzimek hatását közömbösítik, ezen kívül közvetlen antivirális, antimikrobiális hatással is bírnak. A szerin-proteázok segítik a sebgyógyulást is. A *kitináz* egyes gombafajok sejtfalát bontja, a *lizozim* pedig nemcsak a baktériumok

sejtfalát képes megbontani, de a baktériumokban lévő autolizineket is aktiválja. A *laktoperoxidáz* forrása lehet a nyálmirigy (ez a HS-LPO, human salivary lactoperoxidase) és a szájüregi polimorfonukleáris sejtek is (MPO, myeloperoxidáz). Ez az enzim a tiocianát oxidálásával hypotiocianátot, egy rendkívül erős antibakteriális anyagot hoz létre. A *laktoferrin* megköti a vasat, így gátolja a baktériumok és gombák növekedését. Ezen kívül aktiválja a leukocitákat és ezáltal fokozza a citokin termelést. A *hisztatinok* gombák elleni hatása kiemelkedő (különösen a *Candida* fajok ellen), de egyes típusai proteináz inhibitoroként is működnek, míg mások a citokin termelést gátolják [4, 71].

2.5 A NYÁLELVÁLASZTÁS CSÖKKENÉSE, HYPOSALIVATIO ÉS XEROSTOMIA

A szájszárazságtól (*xerostomia*) szenvedő páciensek leggyakoribb panaszai a következők:

- evési, ízérzékelési zavarok (*dysgeusia*),
- nyelési nehézségek (*dysphagia*),
- beszéd nehezedik, nyelv a szájpadláshoz tapad,
- gyakori – főként éjszakai – vízivás,
- kivehető fogpótlások viselése kényelmetlenné, fájdalmassá válik,
- erős szájszag (*halitosis*),
- a nyelv fájdalma (*glossodynia*),
- égő érzés, gyulladás a szájnyálkahártyán (*mucositis*),
- akjak gyulladása, berepedése (*cheilitis*),
- a nyálmirigyek megnagyobbodása, fájdalma, gyulladása (*sialadenitis*),
- gyakori száj- és garatfertőzések (különösen *Candida* infekciók),
- nő a fogszuvasodás és a fogágybetegségek gyakorisága .

A *xerostomia* szubjektív tünetegyüttes, mely nem mindig jár együtt a nyáaltermelés csökkenésével (*hyposalivatio*). A nyálmirigy működésétől független okok lehetnek például neurológiai vagy szenzoros diszfunkciók, a szájlégzés vagy a

kiszáradás is. Gyógyszerek mellékhatásaként is jelentkezhethet szájszárazság érzés a nyáltermelés csökkenése nélkül. Tényleges hyposalivatiót okoznak többek között bizonyos gyógyszerek, autoimmun betegségek, főként a Sjögren-szindróma, és a fejnyaki daganatok sugárkezelése.

A gyógyszer okozta formák (pl. H1 antihisztaminok, triciklikus antidepresszánsok, alfa- és béta blokkoló vérnyomáscsökkentők), bár gyakoriak, általában reverzibilisek és a gyógyszerelés megváltoztatásával meg is szűnnek. [75, 76].

A Sjögren-szindrómában (SS) az elsődleges tünet a nyál- és a könnytermelés nagy mértékű csökkenése. Az SS-nek két típusa ismert: az elsődleges SS csak a nyál- és a könnymirigyeket érinti, míg a másodlagos forma más autoimmun kórképekkel együtt jelenik meg, mint például a reumatoid arthritis vagy a szisztémás lupus erythematosus [77]. Az SS jellegzetessége a fokális limfocitás infiltráció és a gyulladás. A gyulladásos mediátorok emelkedett szintje károsítja a sejtek közötti kapcsolatok integritását [78, 79], a limfociták pedig auto-antitesteket termelnek, amelyek permanensen pusztítják az acinus sejteket [80]. Ennek következtében az érintett mirigyekben a működőképes acinusok száma lecsökken és erőteljes fibrózis figyelhető meg [77].

A sugárkezelés utáni jellegzetes szövettani kép az SS-hez hasonlóan degenerációt, atrófiát, erőteljes fibrózist mutat. Itt is az acinusok károsodnak elsősorban, míg a ductusz rendszer lényegében intakt marad [77, 81]. A sugárkezelés következtében a hyposalivatio két fázisban jelentkezik. Az *akut hyposalivatio* a sugárkezelést követő 3.-8. héten jelentkezik. Ez a sugárzás okozta gyulladásos folyamat következménye, a nagy nyálmirigyek nyáltermelése akár 80 %-kal is csökkenhet. A *késői xerostomia* a besugárzást követő egy éven belül alakul ki, mértéke a nyálmirigyek károsodásától függ, de a tumor helyétől és így a besugárzott területtől függően a károsodás akár az összes nagy- és kisnyálmirigyet érintheti [75, 82].

A sugárkezelés káros mellékhatásainak kivédésére szolgál a kemoprevenció pilocarpinnal [83] és a szubmandibuláris nyálmirigy transzfer (SGT) is. Az SGT egy viszonylag egyszerű, olcsó és biztonságos sebészi eljárás, melynek során az egyik szubmandibuláris nyálmirigy a szubmentális területre ültetik. Ezt a területet a sugárkezelés során leárnyékolják a röntgensugaraktól [84]. Bár az eljárás a kemoprevenciónál hatékonyabbnak bizonyult, azoknál a pácienseknél nem használható,

akiknek a primer daganat a szájüregben van illetve akiknek a szubmandibuláris-szubmentális nyirokcsomókba adott áttétet a daganat [85].

A sugárterhelés csökkentésére szolgál az IMRT technika (intensity-modulated radiation therapy). Ennek lényege, hogy a besugárzandó daganat a lehető legnagyobb, míg a környező területek a lehető legkisebb sugárdózist kapják. Ehhez szükséges a daganat és a környező szervek pontos térfogat meghatározása CT felvételek segítségével (gyakran MRI-vel és PET-tel kiegészítve) és a pontos dózistervezés, vagyis a besugárzandó területekre irányuló sugárdózis és a környező egészséges területeket érő maximális sugárterhelés megadása egy számítógépes szoftverben. A sugárzást végző eszközt ezen adatok alapján a számítógép vezérli [86].

A hyposalivatio kezelésére jelenleg korlátozottak a lehetőségek. A szájüregi diszkomfort tünetek enyhítésére különböző „műnyál” készítmények, szájöblítők, spray-k, gélek állnak rendelkezésre. A megmaradt nyálmirigy működés serkentésére cukormentes rágógumik is forgalomban vannak. Mindezek a klinikai vizsgálatok szerint csak enyhe javulást hoznak. Ezeknél hatékonyabb nyáltermelés fokozó a muszkarin agonista *pilocarpin* és a *cevimeline*. Azonban számos szisztémás mellékhatásuk van, például fokozott izzadás, rhinitis, emésztőrendszeri panaszok; de a légző- és a kardiovaszkuláris rendszerben olyan komoly mellékhatásokat is okozhatnak, hogy bizonyos szisztémás betegségek esetén a használatuk kontraindikált [75, 76, 82, 87].

A valódi, oki terápiára, vagyis a nyáltermelés helyreállítására alkalmas lehet:

- a nyálmirigy regeneráció őssejtek segítségével,
- a nyálmirigy működésének helyreállítása génterápiával és a
- „mesterséges nyálmirigy” létrehozása

2.5.1 NYÁL MIRIGY REGENERÁCIÓ ŐSSEJTEK SEGÍTSÉGÉVEL

A regeneráció során a szervezet a károsodott szöveti struktúrákat úgy állítja helyre, hogy az újonnan keletkezett szövet az eredetivel teljesen megegyezik [88]. A regenerációs képesség szövetenként eltérő, a máj például közismerten kiemelkedően jól regenerálódik, ezzel szemben a központi idegrendszer regenerációs képessége

meglehetősen limitált. A regeneratív orvoslás a szervezet természetesen is meglévő regenerációs folyamatait segíti elő úgy, hogy biztosítja a szövetépítéshez szükséges helyet az adott területen és a regenerációt sejtek és/vagy növekedési faktorok hozzáadásával is segíti [89]. A sejtttranszplantáció nem csak őssejtek révén történhet, biztató eredményeket értek el például diabetes mellitus kezelésében szigetsejtek átültetésével [90] vagy patkány nyálmirigy esetében *in vitro* tenyésztett, differenciálódott epitelsejtek beültetésével is [91]. A nyálmirigyek esetében több vizsgálat támasztja alá, hogy a károsodott szövetbe ültetett őssejtek képesek elősegíteni a nyálmirigy regenerációját [92, 93]. A csontvelő eredetű őssejtekkel végzett kutatások pedig azt mutatják, hogy nem maguk az őssejtek, hanem az általuk kifejtett parakrin hatás az, ami a regenerációt elősegíti [94].

2.5.2 A NYÁLMIIRIGY MŰKÖDÉSÉNEK HELYREÁLLÍTÁSA GÉNTERÁPIÁVAL

A nyálmirigy károsodás során elsődlegesen az acináris sejtek sérülnek, a duktusz rendszer meglehetősen sokáig ép marad. A duktusz sejtek acinusok hiányában is képesek egy lumen felé irányuló ozmotikus grádiens kialakítani (K^+ és HCO_3^- szekréció), de mivel a duktusz sejtek luminális membránjában nincs vízesatorna, így a víz nem tudja követni a grádiens. A génterápiás eljárás során a humán aquaporin 1 (hAQP1) cDNS-e épül be a károsodott nyálmirigy duktusz sejtjeibe, átjárhatóvá téve ezzel a duktuszokat a víz számára [95]. *In vivo* állatkísérletek során az AdhAQP1 bevitele a nyáltermelést a normálisnak közel 80%-ára tudta visszaállítani (patkány [96], törpe disznó [97]). Az eljárás humán alkalmazása is ígéretes, hiszen a nyálmirigyeket különösen alkalmassá teszi a génbevitelre az, hogy:

- a szájüregből kivezetőcsövön keresztül könnyen kanülálható,
- tokkal körülhatárolt szerv, ami gátolja a vektor szóródását a szervezetbe,
- jól differenciált, stabil szövetek alkotják,
- az életben maradáshoz nem nélkülözhetetlen szerv, tehát komoly komplikáció esetén eltávolítható [98].

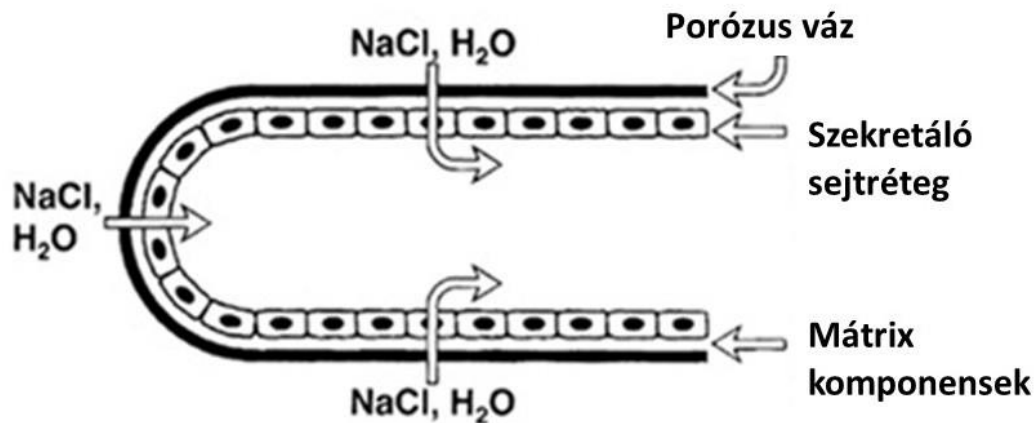
Az aquaporin-1 beviteléhez vektorként a vírus vektorok, a rekombináns adenovírus 5 (Ad5) és az adeno-asszociált vírus 2 (AAV2) lényegesen hatékonyabbnak bizonyultak a nem vírus vektoroknál, bár használatuk biztonsági kockázatot jelent.

Az Ad5 vektorral végzett génterápiás eljárás állatkísérletes biztonságossági vizsgálatokat [99-101] követően humán klinikai fázisban jutott. A 2006-2016-ig tartó vizsgálat sorozat lezárult, az eredményeket eddig még nem publikálták. A 2011-ig született részeredmények azonban biztatóak a humán alkalmazást illetően [103].

2.5.3 „MESTERSÉGES NYÁLMIRIGY” LÉTREHOZÁSA

A harmadik megközelítési út a „szövetépítés” (tissue engineering). A mesterséges nyálmirigy koncepcióját Bruce J. Baum és munkatársai publikálták 1999-ben [104]. A nyáltermelő „szerkezet” egy egyik végén zárt cső, amelyet a szájüregi nyálkahártya alá ültetnek, a nyitott végét a szájüregbe szájzattva. Szerkezetileg három része van (6. ábra):

1. egy porózus, biológiailag elbomló váz,
2. bevonva extracelluláris mátrix (ECM) proteinnel, ehhez
3. egy polarizált epitélsejt réteg tapad, mely a szekréciót végzi [105].



6. ábra A "mesterséges nyálmirigy" kezdeti modellje [104]

(az eredeti, angol nyelvű ábra forrása: www.researchgate.net, letöltve 2016.03.24.)

A fibronectinnel bevont poli-L-tejsav (PLLA) és a poli-L-tejsav poliglikolsav kopolimer (PGA/PLLA) alkalmasnak tűnt a hordozó réteg szerepére [106, 107]. Ezek biokompatibilis anyagok, ráadásul a fibronectin vérplazmából könnyen kivonható, így

lehetőség lenne minden páciensnél saját, autológ anyag használatára [106]. Az utóbbi évek kutatásai rávilágítottak arra, hogy a megfelelő hordozó réteg az egyszerű „sejtrögzítésen” túl a sejtek szekréciós tulajdonságait is javíthatja. (ld. 2.6 fejezet)

A szekretáló sejtréteg kialakítására a legideálisabb megoldás az *autológ primer sejtek* használata lenne. A sugárkezelést megelőzően eltávolítanának a páciens egészséges nyálmirigyszövetéből valamennyit, amit később a hordozó rétegre növesztve, mesterséges nyálmirigyként kapna vissza a páciens [108]. Amennyiben ez nem lehetséges (már eltávolított vagy súlyosan károsodott nyálmirigyek esetén) *donor sejtekre* van szükség [105, 109].

2.6 IN VITRO NYÁL MIRIGY MODELLEK

Az *in vitro* nyálmirigy modellek elengedhetetlenül fontosak a nyálmirigy működésének megértésében, biztonságos génmanipulációs és farmakológiai eljárások kidolgozásában és a mesterséges nyálmirigy felépítésében is [110]. A modellezésre több emberi és állati eredetű sejtvonal áll rendelkezésre, de nyálmirigyből primer sejt kultúrát is létre lehet hozni.

Az úgynevezett „kétdimenziós” modellek porózus membránon létrehozott, zárt, polarizált egysejtréteget (monolayer) jelentenek. Jelenleg ez a legalkalmasabb forma transzepiteliális transzportfolyamatok karakterizálására [39-41, 111].

A „háromdimenziós” formák gél állagú hordozóanyagon alakulnak ki, mely lehetővé teszik a térbeli szöveti szerveződést és így acináris vagy akár acinotubuláris struktúrák kialakulását is [21, 112-118].

A korábban ismertetett „mesterséges nyálmirigy” felépítésében jelenleg a szekretáló sejtréteg kialakítása jelenti a legnagyobb kihívást. A sejteknek számos követelménynek kell megfelelniük:

- A szekréciós epitélium funkcióképességének alapja, hogy a sejteknek polarizált szerkezetű, zárt egysejtsoros réteget alkossanak megfelelő paracelluláris barrierként működő junkcionális komplexekkel [77, 105, 107].
- Mivel a nyálmirigyekben a fehérje-, elektrolit- és vízszekréció fő színtere az acinus, acináris fenotípusú sejtekre van szükség [4, 32, 44].

- Mivel élő emberi szervezetbe kerülnek, sem a sejtek sem a tenyésztés során használt anyagok nem tartalmazhatnak állati eredetű, allergizáló, ismeretlen összetételű összetevőt vagy daganatos sejtből, szövetből származó anyagot [105, 119-121].

A továbbiakban ezen szempontok szerint vizsgálom a jelenleg rendelkezésre álló sejteket és modellrendszereket.

Az immortalizált vagy tumorból származó sejtvonalak kiváló kiindulási alapot biztosítanak a modellezésre [110]. Előnyük, hogy könnyen hozzáférhetőek, gyorsan nőnek, meglehetősen sokáig eltarthatóak: sokszoros passzálás után is megőrzik a tulajdonságaikat, de fagyasztva is tárolhatók. A sejtek uniformizált tulajdonságai miatt pedig a kísérletek könnyen standardizálhatók. Ugyanakkor a sejtvonalakon végzett kísérletek eredményei a sejtek neoplasztikus jellege miatt nem mindig értelmezhetőek egyértelműen a natív szövetre [116, 117, 122, 123].

Az állati eredetű sejtvonalak között több jól differenciált, acináris karakterű sejtípust találunk, melyeket számos tanulmány során segítettek a normál nyálmirigy működés vagy éppen egyes betegségek patofiziológiájának megértését. Ilyen például a **Par-C5** és **Par-C10** patkány parotisz sejtvonalak [41, 79, 124-126] vagy az **SMG-C6** és **SMG-C10** patkány szubmandibuláris nyálmirigy eredetű sejtvonalak [127-129].

Humán eredetű, acináris karakterű sejtvonal azonban jelenleg nem áll rendelkezésre [110]. A **HSG** (human slivary gland) sejtvonal besugárzott emberi nyálmirigyből származik és interkaláris duktusz sejtek építik fel [130]. Mikroszkóposan jól látható dezmoszómákat alkot, tight junction rendszere viszont fejletlen, szervezetlen [131], amit alátámaszt az is, hogy a HSG sejtek nem expresszálják a ZO-1, occludin, claudin-1 és claudin-2 fehérjéket. Ennek következtében a HSG sejtek nem képesek zárt egysejtréteg (monolayer) kialakítására és hiányzik a paracelluláris barrier funkció is [132]. Ezen túlmenően a HSG nem expresszálja az aquaporin 1 és 5 fehérjéket sem, így nem képes szabályozott víztranszportra [133]. A HSG funkcionális tulajdonságai több úton is javíthatók. Génterápiával sikeresen vitték be a hiányzó fehérjék génjeit, így például a claudin-1, claudin-2 [132] vagy az aquaporinok génjét [95]. A későbbiekben ismertetett Matrigelen tenyésztett HSG sejtek pedig képesek zárt monolayer szerkezetet

és működőképes tight junction rendszert létrehozni, expresszálják az alap HSG sejtvonalból hiányzó CLDN-1, -2, -3, -4 fehérjéket, ezen kívül az occludint, a JAM-A-t és a ZO-1-et, valamint az acináris fenotípusra jellemző α -amilázt és az AQP5-öt is [119]. Az előbbieken ismertetett biztonsági okok miatt azonban a „mesterséges nyálmirigy” részeként immortalizált és tumor eredetű sejtvonalak nem alkalmazhatók [119] még úgy sem, hogy az apoptózis indukálására és így a kontrollálatlan sejtnövekedés megakadályozására van lehetőség [134].

A primer sejtkultúrák létrehozása és fenntartása a sejtvonalakhoz képest több technikai nehézséggel jár. Jellemzően korlátozott mennyiségű natív szövet áll rendelkezésre, főleg humán szövetek esetén. Ráadásul a sejtkultúra csak rövid ideig, 3-4 hétig tartható fenn, azután megindul a tenyészet dedifferenciációja [116, 122]. A hosszabb ideig fenntartott primer epiteliális tenyészeteknél [135, 136] a polarizált, epiteliális jelleg megtartottságát kérdéses [137], bár egy nemrégiben megjelent tanulmány eredményei arra utalnak, hogy a tenyésztési körülmények optimalizálásával a tenyészet élettartama jelentősen javítható [138].

Tran és mtsai 2005-ben publikálták a **huSMG** (human submandibular gland) szubmandibuláris nyálmirigyből létrehozott, primer sejtkultúra protokollját (részletes leírása a 4.2.2 fejezetben található) [137]. A későbbi tanulmányokban a sejtkultúra létrehozásához parotisz és szubmandibuláris nyálmirigy szöveteket együttesen használtak fel, emiatt a neve **huSG**-re változott [120, 139]. A huSMG sejtek zárt, polarizált monolayert alkottak a sejtek között működőképes junkcionális komplexekkel. Expresszálták a ZO-1 és a claudin-1 tight junction fehérjéket és a Na^+/K^+ -ATP-ázt is, ugyanakkor a vízzel szemben relatíve átjárhatatlan epitélium képét mutatták. Mindezek alapján úgy tűnik, a huSMG duktális karakterű sejtkultúra [137] csakúgy, mint a szintén emberi szubmandibuláris nyálmirigyből létrehozott **PTHSG** sejtkultúra [116].

A nyálmirigy fejlődése során az epitélium és a mezenchima folyamatos interakcióban van [77, 140, 141] A végkamrás szerkezet kialakulását, az elágazódások képzését és a sejtek differenciálódását is a mezenchima kontrollálja [141]. A nyálmirigy optimális szöveti szerveződése és a sejt-differenciáció során az extracelluláris mátrix (ECM) komponensek, a parakrin növekedési faktorok (pl. EGF, FGF) és a sejt-sejt kapcsolatok egyaránt szabályozó szerepet töltenek be [140]. Ezen alapul a komplex összetételű ECM

készítmények, a bazálmembrán kivonatok (BME, basement membrane extract), mint például a **Matrigel** használata a sejttenyésztés során [123]. Használatuk elősegítette a sejtek acináris differenciációját mind primer sejttenyészetek [114, 116, 120, 142], mind sejtvonalak [112, 117, 119, 142] esetén. A Matrigelen tenyésztett huSG sejtek háromdimenziós, acinus jellegű képződményeket hoznak létre, melyek expresszálják a CLDN-1, -2, -3 -4, a JAM-A és a ZO-1 fehérjéket, az occludint (TJ felépítése), az α -amilázt, az AQP5-öt és a mucint (acináris fenotípus) [120]. A Matrigel és a BME állati eredetű, Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) szarkómából kivont, nem pontosan definiált összetételű anyagok, vagyis a „mesterséges nyálmirigy” részeként ezek sem használhatók [121]. A perlecan (heparán-szulfát proteoglikán 2, HSPG2) az extracelluláris mátrix egyik, több domén rendelkező proteoglikánja. Ennek IV. doménje, a **PlnDIV** (perlecan IV. domén) egy olyan peptid, amely elősegíti a sejtadhéziót, migrációt és fontos szerepe van a sejtek szöveti szerveződésének kialakításában [143]. Mivel a PlnDIV szintetizálható állati eredetű összetevők használata nélkül, így ígéretes lehetőség a komplex ECM készítmények kiváltására [121] csakúgy, mint a szintetikus **poliakrilamid gélek** [113].

3. CÉLKITŰZÉSEK

Az emberi nyálmirigyből izolált huSMG és PTHSG sejtek az irodalmi adatok alapján dukális fenotípusúak. Azonban a sejtek részletes, funkcionális karakterizálására eddig nem került sor. A tanulmány célja tehát:

1. Primer sejtenyészet, majd polarizált monolayerek létrehozása humán szubmandibuláris nyálmirigyből, valamint az izolálási és tenyésztési körülmények optimalizálása sejt kultúra kialakulása során.
2. Annak vizsgálata, hogy az acináris fenotípust jelző marker fehérjék (NKCC1, AQP5, amiláz) expressziója illetve az amiláz termelés fennmarad-e az izolálás és a monolayerek kialakulása során.
3. Annak vizsgálata, hogy a SMIE, a Par-C10 és az HPAF sejt vonalak alkalmasak-e zárt monolayer kialakítására és transzepiteliális transzport folyamatok funkcionális vizsgálatára. A sejt vonalakon végzett előkísérletek célja a funkcionális vizsgálatok megalapozása, az optimális körülmények beállítása a primer sejtek vizsgálatához.
4. A huSMG és a PTHSG sejtekből létrehozott monolayerek transzepiteliális ion transzportjának vizsgálata során a következő kérdésekre kerestük a választ:
 - a. Mérhető-e a sejtekben transzepiteliális anion szekréció?
 - b. Stimulálható-e a transzepiteliális ionáram az intracelluláris Ca^{2+} vagy cAMP közvetítette jelátviteli útvonalakon?
 - c. A bazolaterális oldalon milyen transzporterek vesznek részt az anionok utánpótlásában?

4. MÓDSZEREK

4.1 ANYAGOK A SEJTTENYÉSZTÉSHEZ

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma-Aldrich), DMEM és Nutrient Mixture Ham F12 1:1 arányú keveréke (DMEM-F12; Gibco); főtális borjú savó (FBS; Gibco); Hepato-STIM (BD Biosciences); Minimal Essential Medium (MEM; Sigma Aldrich); Roswell Park Memorial Institut 1640 tápoldat (RPMI-1640, Sigma-Aldrich); antimikrobális oldat (100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 2,5 mg/ml amphotericin-B; Sigma-Aldrich); tripszin (Gibco); kollagenáz (Sigma-Aldrich); Dnase I (Roche Diagnostic Corporation); tripszin és etilén-diamin-tetraecetsav keveréke (tripszin-EDTA; Gibco); retinsav (Gibco); nem-esszenciális aminosavak (NEAA, Gibco); trijód-tironin, hidrokortizon, nátrium-piruvát (Sigma-Aldrich);

4.2 SEJTTENYÉSZTÉS ÉS A SEJTEK ELŐKÉSZÍTÉSE A TOVÁBBI VIZSGÁLATOKHOZ

Mindegyik sejttípus tenyésztése standard körülmények között történt, vagyis 37°C-on, párasított, 5% CO₂-dal dúsított levegőt tartalmazó tenyésztőszekrényben.

4.2.1 PAR-C10, HPAF ÉS SMIE SEJTVONALAK TENYÉSZTÉSE

A Par-C10 és az HPAF sejteket kontrollként használtuk a monolayer képződés és a rövidzárlati áram mérések során. Az HPAF és a Par-C10 sejtek képesek zárt, polarizált monolayer létrehozni, ráadásul jól karakterizáltak az epiteliális transzport szempontjából is (Par-C10 [41, 124, 125]; HPAF [40, 111, 144]). A SMIE pedig negatív kontrollként szerepel, hiszen ez a sejtvonal az alacsony claudin-3 expresszió miatt áteresztő, „leaky” epitéliumot hoz létre [52, 145].

A **Par-C10** patkány parotisz sejtekből származó sejtvonal dr. David Quissel (School of Dentistry, University of Colorado Health Sciences Center, Denver, USA) ajándéka volt. A sejteket DMEM-F-12 tápoldatban tenyésztettük, melyhez 10% FBS-t, 0,1 μ M retinsavat, 2 nM trijód-tironint, 0,4 μ g/ml hidrokortizont, és 50 U/ml penicillint és 50 μ g/ml streptomycint adtunk. A sejteket hetente 1:50 arányban passzáltuk, a 3-15. passzázsából származó sejteket használtuk a funkcionális vizsgálatokhoz.

Az **HPAF** egy emberi hasnyálmirigy adenokarcinómából létrehozott, duktális sejtvonal, mely az ATCC-től (American Type Culture Collection) származott. A tenyésztéshez MEM tápoldatot használtunk, kiegészítve nem esszenciális aminosavakkal (NEAA), nátrium-piruváttal, 10% FBS-sel, 50 U/ml penicillinnel és 50 μ g/ml streptomycinnel. Hetente 1:10 arányban passzáltuk a sejteket és a további kísérletekhez a 12.-23. passzázs számú sejteket használtuk.

A **SMIE** egy patkány nyálmirigy eredetű acináris sejtvonal. DMEM, 10% FBS, 100 U/ml penicillin és 100 μ g/ml streptomycin tartalmú tápoldatban tenyésztettük. A további vizsgálatokhoz az 1-8. passzázsából származó sejteket használtuk fel.

4.2.2 PRIMER SEJTENYÉSZET IZOLÁLÁSA EMBERI NYÁL MIRIGYBŐL

A munkánk kiindulási alapja a huSMG [137] és a PTHSG [116] protokollja volt. Az emberi nyálmirigy minták olyan páciensektől származtak, akiknél fej-nyaki területen lévő (elsősorban orr-, szájüreg és garat) daganat és áttétei miatt nyaki disszekció műtétre volt szükség. A vizsgálat sorozatot a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága engedélyével végeztük, engedélyszám: 67/2005. A műtétet a Semmelweis Egyetem Arc- Állcsont-Szájsebészeti és Fogászati Klinika orvosai végezték. Összesen 49 páciens-től vettünk mintát, az életkoruk 40 és 86 év között volt. A vizsgálatba azokat a pácienseket vontuk be:

- akik előzetesen sem radio- sem kemoterápiában nem részesültek,
- akiknek a nyálmirigyében daganatot nem találtak,
- akik nem szenvedtek semmilyen nyálmirigy betegségben, rendellenességben.

A nyálmirigy minták szövettanilag normális szubmandibuláris nyálmirigy képét mutatták. Az 1-2 g súlyú nyálmirigy darabokat jégbe hűtve, egy szállító tápoldatban

szállítottuk a Szájsebészeti Klinikától a laborig. A *szállító oldat* összetétele: RPMI-1640, 5% FBS, antimikrobális oldat. Ezután a szövet egy *mosóoldatba* került, mely DMEM-F12 és az antimikrobális oldat elegye. A mosást a mechanikai tisztítás és darabolás alatt többször megismételtük. Végül a „szövet pép” a *disszociáló oldatba* került és 37°C-os vízfürdőben inkubáltuk 1 órán keresztül, vortexelve minden 20. percben. A disszociáló oldat összetétele: DMEM-F12, 0,04% tripszin, 0,15 mg/ml kollagenáz. Az eredeti protokoll során ez az inkubálási fázis közel 4-5 órán át tartott, 30 percenkénti vortexeléssel [137]. Mi a protokollt megváltoztattuk és egy óra elteltével a felülúszót, mely a már disszociált sejteket tartalmazta, áttettük egy 20 ml DMEM-F12 tápoldatot tartalmazó Falcon csőbe. A maradék szövetre 20 ml friss disszociáló oldat került és így folytattuk tovább az inkubációt az előbb leírt módon. A már disszociált sejteket minden újabb óra végén kivettük, így óránként egy-egy disszociált frakciót kaptunk. A teljes disszociáció kb. 2,5 órát vett igénybe, melynek végén az összes frakciót egy edénybe öntöttük. Az inkubáció végén a sejtszuspenzióhoz 1 ml 10 mg/ml koncentrációjú Dnase I-et adtunk és 2 percig le-föl pipettáztuk, ezzel is biztosítva a sejtek különválását. Ezután a sejtszuspenziót centrifugáltuk (230 g, 5 perc), a felülúszót leöntöttük és az üledéket 20 ml hideg DMEM-et valamint 10 % FBS-t tartalmazó tápoldatba reszuszendáltuk. Egy újabb centrifugálási ciklus (230g, 5 perc) végén a felülúszót leöntöttük és az üledéket 10 ml Hepato-STIM *tápoldatba* (Hepato-STIM, 10% FBS, 1% glutamin, antimikrobális oldat) szuszpendáltuk föl. A szuszpenziót 70 mm-es sejtszűrőn szűrtük át, majd a sejteket FBS-sel előkezelt 60 mm-es Primaria sejtenyésztő edénybe (BD Biosciences) ültettük ki és egy éjszakán át inkubáltuk standard körülmények között. Másnap a felülúszót átöntöttük egy másik tálkába. Ennek a lépésnek az a célja, hogy szétválassza a felülethez gyorsan tapadó fibroblasztszerű sejteket a lassabban letapadó epiteliális jellegű sejtektől. A huSMG tenyészet így csak az 1 nap után még úszó, nem letapadó sejteket tartalmazza [137], míg a PTHSG sejtenyészetben gyorsan letapadó és nem letapadó sejtek egyaránt megtalálhatók [116]. A sejtenyésztés során összehasonlítottuk a Hepato-STIM tápoldat és a MEM tápoldat hatását a sejtek növekedési ütemére és a monolayer kialakulására. A tápoldatok összetétele:

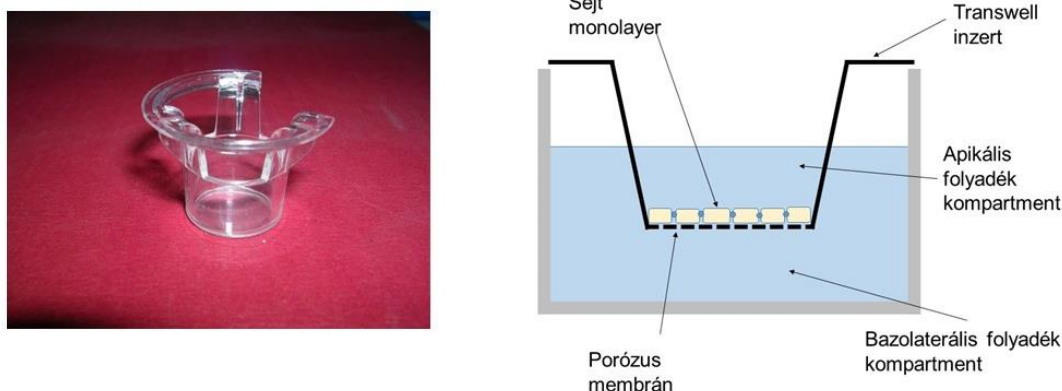
1. Hepato-STIM, 10% FBS, 1% glutamin, antimikrobális oldat
2. MEM, 10% FBS, antimikrobális oldat

A MEM egy konvencionális, széles körben alkalmazott tápoldat, mely ásványi anyagokat (magnézium, kalcium, kálium, nátrium, stb) és esszenciális aminosavakat tartalmaz. A Hepato-STIM tápoldat eredetileg hepatocyták tenyésztéséhez lett kifejlesztve, de sikeresen alkalmazták humán nyálmirigyből [116, 120, 137, 139] és nyúl könnymirigyből [147] származó primer sejtenyészetek izolálása során is. A Hepato-STIM alapja a Williams' E tápoldat, mely az ásványi anyagokon és aminosavakon kívül különböző vitaminokat és glükózt is tartalmaz. A Hepato-STIMben ez a tápoldat fel van dúsítva dexamethazonnal, inzulinnal, transferrinnel, szelénnel, EGF-fel és 1,8 mM kalciummal. Ezek a komponensek mind az epiteliális fenotípus fenntartását segítik elő [116, 121, 135, 137, 148]. A tápoldatokat hetente háromszor részlegesen cseréltük: a régi oldatnak körülbelül egyharmadát a sejteken hagytuk és ezt hígítottuk fel a friss tápoldattal. Ez az eljárás a sejtek által termelt értékes növekedési faktorok megőrzését célozta [149]. A sejteket 80%-os konfluencia elérésekor passzáztuk 0,25% tripszin-EDTA segítségével. A funkcionális vizsgálatokhoz az 1-3. számú passzázsából származó sejteket használtuk.

4.2.3 A SEJTEK ELŐKÉSZÍTÉSE FUNKCIONÁLIS VIZSGÁLATOKHOZ

A polarizált, konfluens monolayer létrehozására a sejteket 12 mm átmérőjű, 1,12 cm² területű, 0,4 µm pórusméretű permeábilis Transwell Clear poliészter membránra (Corning Costar) ültettük ki (7. ábra). A membránokat a PTHSG és a huSMG sejtek kiültetése előtt előkezeltük FBS-sel (15 perces inkubálás 37°C-on), a sejtvonalaknál előkezelést nem használtunk.

A tight junction rendszer kialakulását a transzepiteliális rezisztencia (TER) mérésével követtük. A TER-t EVOM epiteliális volt-ohm méterrel (World Precision Instruments) naponta ellenőriztük. A TER mérések értékét a sejtmentes membrán ellenállásához (135±9 Ωcm²) viszonyítottuk.



7. ábra A Transwell membrán (saját kép és ábra)

4.3 GÉNEXPRESSZIÓ VIZSGÁLATA

A PTHSG és a huSMG sejt kultúrában acinár és duktális markerek mRNS expresszióját vizsgáltuk kvantitatív reverz-transzkriptáz polimeráz láncreakcióval (RT-PCR). Acinár markerként az NKCC1, az AQP5 és az AMY1A (amiláz), duktális markerként pedig az ENaC és claudin-1 szerepelt. Az RNS-t izoláláshoz mintát vettünk a natív nyálmirigy szövetből, a plastik Petri tenyésztőedényben lévő sejtekből és a Transwell membránra kiültetett sejtekből is. A nyálmirigy mintákat Potter homogenizátorral (Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet) homogenizáltuk, az RNS izoláláshoz TRI Reagent-et (Life Technologies) használtunk. A sejt kultúrából a teljes RNS-t a NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel) segítségével vontuk ki a gyártó utasítása szerint. Az RNS koncentráció mérését NanoDrop spektrofotométerrel végeztük, az RNS minőségét gélelektroforézissel ellenőriztük. Ezután egy mikrogrammot a legjobb minőségű RNS mintákból kivettünk és a High-Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Life Technologies) segítségével cDNS-sé alakítottuk a kvantitatív vizsgálatokhoz. Az RT-qPCR ampifikációhoz az ABI StepOne Systemet (Applied Biosystems) és a TaqMan Universal Master Mixet (Applied Biosystems) használtunk, a primerek, melyek az Applied Biosystems-től származtak, a 3. táblázatban láthatók. A vizsgálatokban kontrollként a RPLP0 housekeeping gén szerepelt [116], a génextpresszió számításához a $\Delta\Delta CT$ módszert használtuk [150].

3. táblázat Az RT-qPCR vizsgálatokhoz használt primerek

<i>Gén</i>	<i>Azonosítószám</i>	<i>Termék hossza</i>
<i>ENaC/SCNN1A</i>	Hs00168906_m1	63 bp
<i>NKCC1/SLC12A2</i>	Hs00169032_m1	97 bp
<i>AQP5</i>	Hs00387048_m1	68 bp
<i>CLAUDIN1/CLDN1</i>	Hs00221623_m1	82 bp
<i>AMY1A</i>	Hs00420710_g1	120 bp
<i>RPLPO</i>	Hs99999902_m1	105 bp

4.4 FUNKCIONÁLIS VIZSGÁLATOK

4.4.1 OLDATOK A FUNKCIONÁLIS VIZSGÁLATOKHOZ

A HCO_3^- -tartalmú puffer tartalma: 116 mM NaCl, 25 mM NaHCO_3 , 5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM D-glukóz, 5 mM HEPES. Az oldatot 95% O_2 -5% CO_2 tartalmú gázzal buborékoltattuk át. A HCO_3^- -mentes oldat összetétele: 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM D-glukóz, 10 mM HEPES; ezt az oldatot 100% oxigénnel buborékoltattuk át. A Cl^- mentes oldatokban glukonát ionnal helyettesítettük a kloridot, a Na^+ -mentes oldatok pedig a nátrium helyett ekvimoláris mennyiségű N-metil-D-glukamin iont (NMDG^+) tartalmaztak. Az oldatok pH-ját 7,4-re állítottuk be és a vizsgálatok során 37 °C-ra melegítve használtuk azokat. Az összetevőket a Sigma-Aldrich cégtől vásároltuk.

4.4.2 RÖVIDZÁRLATI ÁRAM MÉRÉSE

A rövidzárlati áram az aktív transzportfolyamatokról ad képet. Méréséhez az Ussing kamrát használtuk, melynek alapelve a következő: a vizsgálandó preparátum két oldalán ismert, azonos összetételű oldat van. A két oldal közötti potenciálkülönbség mérhető feszültségelektrodok segítségével és ki is egyenlíthető a preparátumon átvezetett megfelelő nagyságú árammal. Ez az árammennyiség a rövidzárlati áram (short circuit current, I_{sc}). Mivel a preparátum két oldalán azonos összetételű oldatunk van, nem jön létre elektrokémiai potenciálkülönbség, vagyis ilyen körülmények között az I_{sc} változása az aktív transzport eredményeként létrejött ionmozgást mutatja [5].

A Transwell membránra kiültetett és ott konfluenssé vált monolayereket egy módosított Ussing kamrába helyeztük. A monolayerek bazolaterális és apikális oldalához külön-külön folyadékkompartmentek tartoznak, melyeket folyamatosan perfundáltunk a kiválasztott összetételű pufferoldattal, 2 ml/perc sebességgel. A transepiteliális potenciálkülönbséget (V_m) Ag/AgCl elektrodokon és agaróz-KCl hidakon keresztül mértük. Az I_{sc} mérése során a transepiteliális potenciálkülönbséget 0 mV-ra állítottuk be (feszültségzár, voltage clamp). Az ehhez szükséges áram mennyisége a rövidzárlati áram. A feszültségzár közvetlenül a pufferoldatokba merített Ag/AgCl elektrodokkal hoztuk létre, az elektrodok egy epiteliális voltage clamp erősítőhöz kapcsolódtak (EC-825, Warner Instrument Co). A sejtvonalakon végzett előkísérletek során kétféle regisztrálási módot használtunk. Az egyik, úgynevezett „TIMER” állásban az I_{sc} -t 30 másodperces intervallumokban mértük, melynek során a voltage clamp periódus 5 másodpercig tartott. Ennél a beállításnál a regisztrátumon az I_{sc} kis csúcsokként látszik (*11/A ábra*). A másik beállítás során a feszültségzár folyamatos, így a regisztrátumon is folyamatos vonal jelzi az I_{sc} -t (*11/B ábra*). A rövidzárlati áram mérés során a pozitív I_{sc} jelenthet a bazolaterálistól az apikális oldal felé irányuló anion áramlást vagy fordított irányú (apikálistól bazolaterális felé) kation áramlást is. Az agonisták hatását a rövidzárlati áramra különbség értéként ábrázoltuk (ΔI_{sc}), a ΔI_{sc} egyenlő az agonista adása után mért csúcs és az alapvonal közötti különbséggel.

4.5 AMILÁZ TERMELÉS MÉRÉSE

A PTHSG és a huSMG sejteket a plastik tenyésztőedénybe, illetve a Transwell membránra való kiültetés után 72 órán keresztül Hepato-STIM tápoldatban inkubáltuk, majd mintát vettünk a tápoldatból – a Transwell membránra ültetett sejtek esetén külön a bazolaterális és külön az apikális folyadék kompartmentből is. A mintákban az amiláz aktivitást Phadebas Amylase Test használatával mértük. Az adatok 1 m² monolayerre lettek normalizálva, mértékegysége U/l 1 óra alatt.

4.6 STATISZTIKA

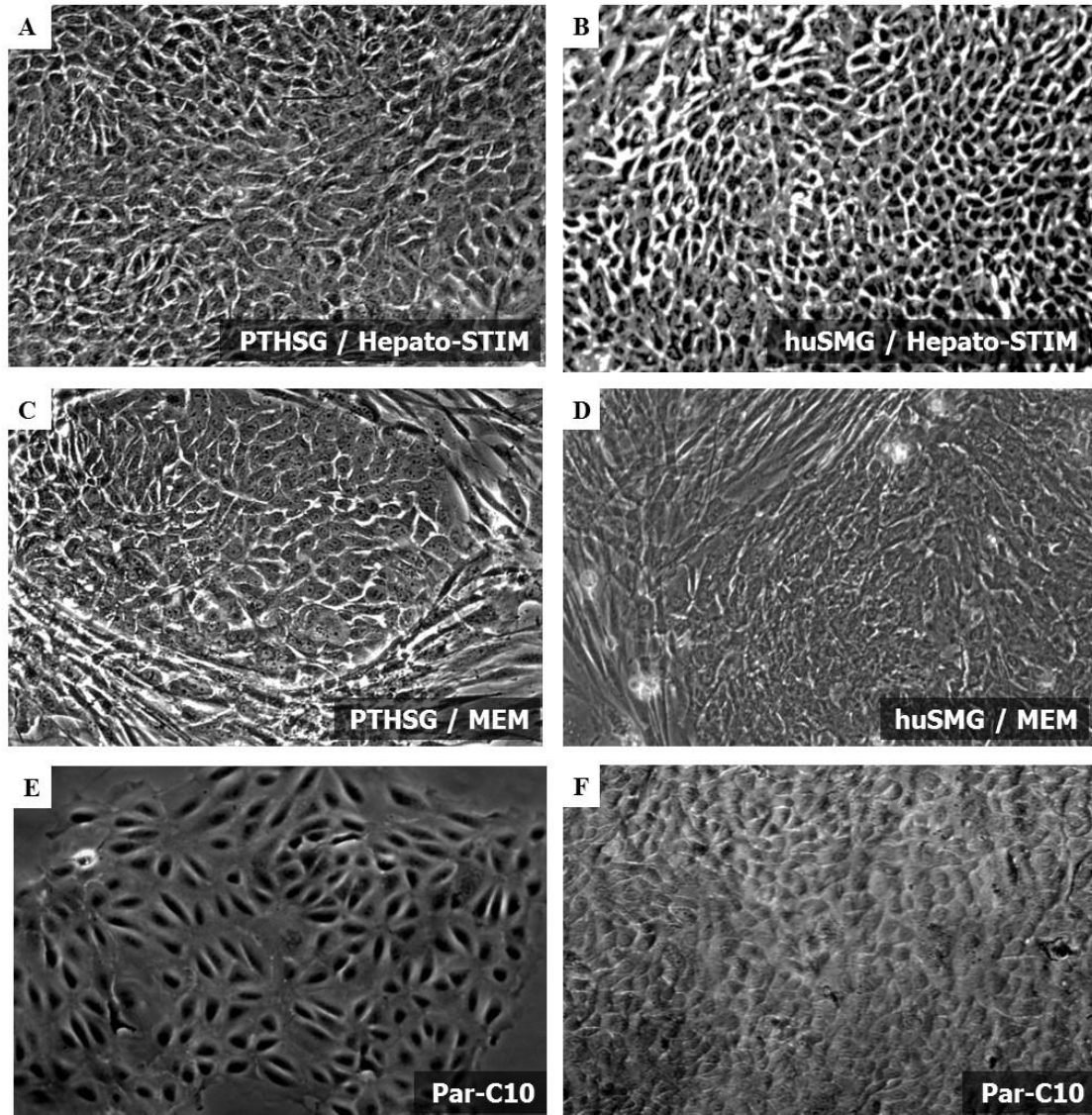
Az adatok formátuma: átlag ± SEM (standard error of the mean). A statisztikai elemzés során az adatok normál eloszlását Kolmogorov–Smirnov teszttel vizsgáltuk. Az adatok összehasonlítását varianciaanalízissel kezdtük, majd vagy Tukey post hoc tesztet vagy ha csak két csoportot kellett összehasonlítani, akkor Student-féle t-próbát használtunk. Ahol az adatok nem mutattak normális eloszlást (pl. bikarbonátmentes pufferben mért adatok a 15/E ábrán), ott nem parametrikus teszteket használtunk. Szignifikancia szintek: *p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,005.

5. EREDMÉNYEK

5.1 A FELHASZNÁLT SEJTEK ÉS PRIMER SEJTKULTÚRÁK JELLEMZÉSE

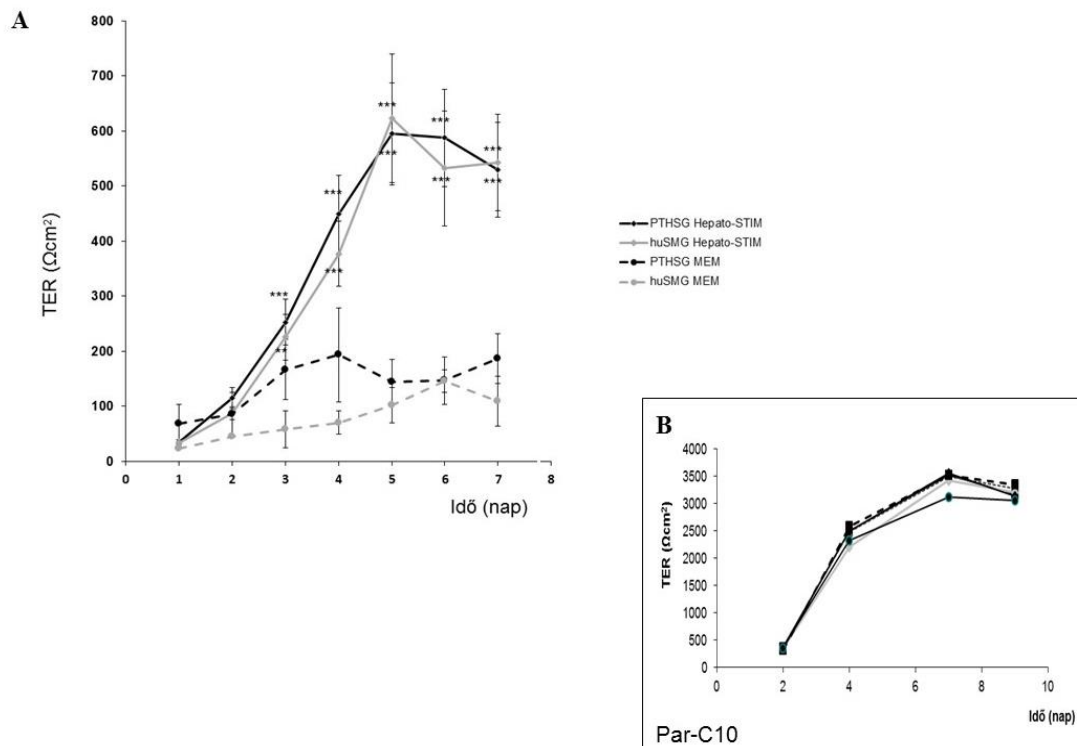
A PTHSG és a huSMG sejt kultúra mikroszkópos képén (8/A; 8/B ábra) a Par-C10 sejtekhez (8/E; 8/F ábra) hasonló, epitél jellegű sejtek alkotta szigetek láthatók, melyeket fibroblasztszerű vékony sávok választanak el egymástól. A huSMG sejteknél a kiültetést követő napokban a PTHSG-hez képest lényegesen több nem, vagy csak részlegesen letapadt sejt, sejtaggregátum figyelhető meg, melyek a passzálások során fokozatosan eltűntek. A tenyészetek a tenyésztőedényben egysejtréteggént nőttek és 5-6 nappal a kiültetést követően 80%-os konfluenciát értek el.

A MEM tápoldatban tenyésztett sejteknél már kezdetektől több fibroblaszt jellegű sejtet láttunk (8/C és 8/D ábra), melyek fokozatosan dominánssá váltak a tenyészetben. Pár nap elteltével már csak néhány epitél jellegű sejt sziget maradt meg. Ezzel szemben a Hepato-STIMben tenyésztett sejteknél az epiteliális területek voltak az uralkodók és ez 3.-4. passzálásig fenn is maradt. A 4. passzálás után (kb. 3-4 hét elteltével) viszont még Hepato-STIM tápoldatban is a fibroblast sejtek fokozatosan túlnőtték az epitelsejteket, így ezeket a tenyészeteket a továbbiakban nem használtuk. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a Hepato-STIM epiteliális szelekciós faktorként működik a tenyésztés során. A tápoldat részleges cseréjével létrehozott kondicionált médium használatával az előkísérleteinkhez képest mind a PTHSG, mind a huSMG sejtek gyorsabban nőttek be a felületet és Transwell membránon magasabb transzepiteliális ellenállás értékeket értek el.



8. ábra **A sejtenyésztő tápoldat szerepe az epiteliális differenciációban** Fáziskontraszt mikroszkópos képek a PTHSG és a huSMG sejt kultúráról Hepato-STIM tápoldatban (**A, B**), illetve MEM tápoldatban (**C, D**) tenyésztve. Kontrollként a Par-C10 sejtek láthatók: a fáziskontraszt kép a plastik aljzaton kialakuló epiteliális szigeteket (**E**), az inverz fáziskontraszt kép (**F**) pedig a membránra ültetett Par-C10 sejtek által létrehozott konfluens egysejtréteget mutatja. Összevont ábra a [151, 152] számú cikkekből.

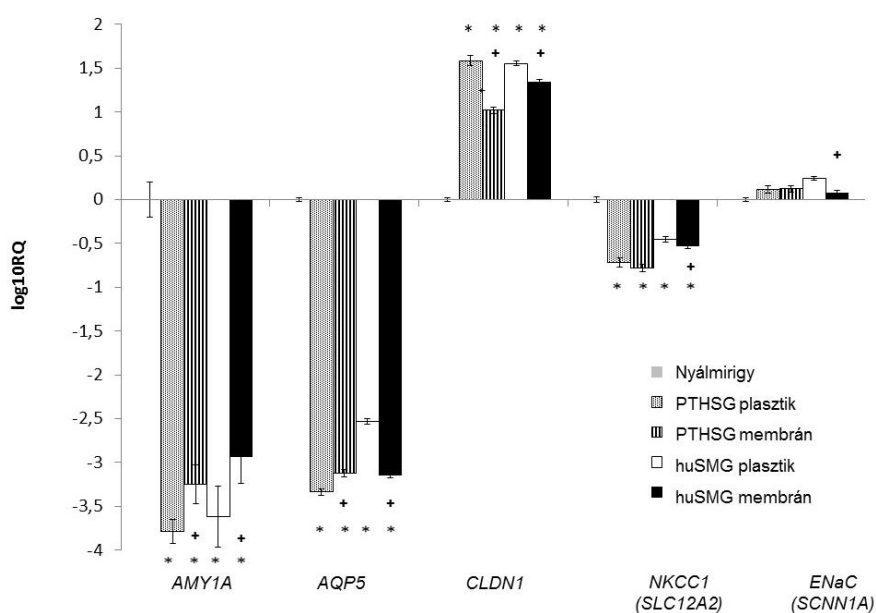
A tight junction rendszer kialakulásával létrejött zárt, polarizált monolayer a normális epiteliális folyadék- és elektrolitzekréció alapja. A transzepiteliális rezisztencia nemcsak a sejtenyészet folytonosságáról, hanem a paracelluláris permeabilitásról is képet ad, mivel a kialakuló sejtkapcsolatok gátolják az extracelluláris ionmozgást. A Hepato-STIM médiumban tenyésztett primer nyálmirigy sejtek a membránra való kiültetés után kb. egy héttel érték el a TER maximumát (PTHSG: $595 \pm 93 \Omega\text{cm}^2$, $n=55$; huSMG: 622 ± 117 , $n=45$) ezt követően az ellenállás elkezdett csökkenni. Ez a növekedési ütem nagyon hasonló a Par-C10 (TER=2500-3000 Ωcm^2) és az HPAF (TER=500-700 Ωcm^2) sejtekéhez. Ezzel szemben a MEM tápoldatban tenyésztett PTHSG és huSMG sejtek ellenállása 200 Ωcm^2 alatt maradt (9. ábra). Ehhez hasonlóan alacsony TER értékeket produkált a SMIE sejtvonal is (TER=150-180 Ωcm^2).



9. ábra **A** transzepiteliális rezisztencia (TER) változása a monolayer kialakulása során A Transwell membránra ültetett PTHSG és huSMG sejtek transzepiteliális ellenállásának időbeli változása Hepato-STIM és MEM tápoldatban (**A**), valamint a Transwell membránra ültetett Par-C10 sejtek transzepiteliális ellenállásának időbeli változása (**B**). A PTHSG és a huSMG sejteknél az adatok 3-62 egyedi mérésből származnak, formátumuk $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,005$ az első naphoz képest. A Par-C10 sejtek grafikonja 6 db Par-C10 monolayer TER adatainak keresztül a TER időbeli változásának jellegzetes ütemét mutatja. Összevont ábra a [151, 152] számú cikkekből.

5.2 AZ ACINÁRIS FENOTÍPUS MEGJELENÉSÉNEK ÉS FENNMARADÁSÁNAK IGAZOLÁSA A PTHSG ÉS A HU5MG SEJTKULTÚRÁKBAN MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATOKKAL

Az általunk kiválasztott öt különböző marker fehérje mRNS expressziójának változását a sejtkultúra kialakulása során qRT-PCR-rel vizsgáltuk. Az acináris fenotípus jellemző markerei, az *AMY1A*, az *AQP5* és az *NKCC1 (SLC12A2)* a natív nyálmirigy szövetben valamint a PTHSG és a huSMG sejtkultúrában egyaránt kimutatható volt. A primer sejtenyészetekben a teljes nyálmirigyhez képest az *AMY1A* és az *AQP5* expressziója ezred részére csökkent, az *NKCC1* mennyisége, bár nem ilyen kifejezetten, de szintén szignifikánsan lecsökkent. Ezzel szemben a sejtkultúrákban a duktális markerként használt *CLDN1* mennyisége szignifikánsan, a *ENaC (SLC12A2)* mennyisége pedig, bár nem szignifikánsan, de mérhetően nőtt. A Transwell membránon tenyésztett sejtekben az *AMY1A* expressziója szignifikánsan nőtt, míg a *CLDN1* expressziója szignifikánsan csökkent (10. ábra).

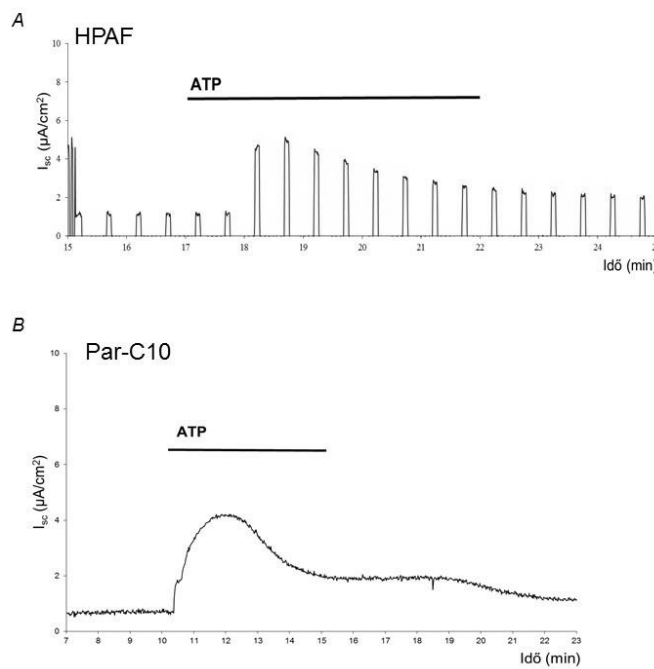


10. ábra **Acináris és duktális sejt markerek expressziója** Az *AMY1A*, *AQP5* és *NKCC1 (SLC12A2)*, mint acináris markerek, a *CLDN1* és az *ENaC (SLC12A2)* mint duktális markerek mRNS expressziójának vizsgálata reverz-transzkriptáz polimeráz láncreakcióval (RT-PCR) emberi szubmandibuláris nyálmirigy szövetben, valamint a plasztikon és Transwell membránon, Hepato-STIM tápoldatban tenyésztett PTHSG és a huSMG sejtkultúrában. Az adatok 5 különböző mintából származnak, formátumuk átlag±SEM *p<0,05 a natív szubmandibuláris nyálmirigy szövet homogenizátumhoz képest, +p<0,05 a plasztik tenyésztőedényben lévő sejtekben mért értékhez képest. *AMY1A*: amiláz, *AQP5*: aquaporin vízcsatorna 5-ös típus, *NKCC1/SLC12A2*: nátrium-kálium-2-klorid kotranszporter, *ENaC/SLC12A2*: epiteliális nátrium ioncsatorna [152]

Amiláz aktivitás mind a plasztikon, mind a Transwell membránon tenyésztett PTHSG és huSMG sejtenyészeteknél kimutatható volt. A Transwell membránra kiültetett sejteknél a plasztikhoz képest a szekretált amiláz mennyisége és az amiláz génjének expressziója is szignifikánsan magasabb volt. A Transwell membránra ültetett, polarizált monolayerek esetén az amiláz csak az apikális oldalon lévő folyadék kompartmentben volt detektálható, a bazolaterális folyadék kompartmentben nem. Ez megerősíti azt, hogy a Transwell membránon kialakult a polarizált sejtszerkezet. (huSMG: 742 ± 214 U/l plasztikon és 5022 ± 1682 U/l Transwell membrán apikális oldalán; PTHSG: 568 ± 193 U/l plasztikon, 3043 ± 882 U/l Transwell membrán apikális oldalán).

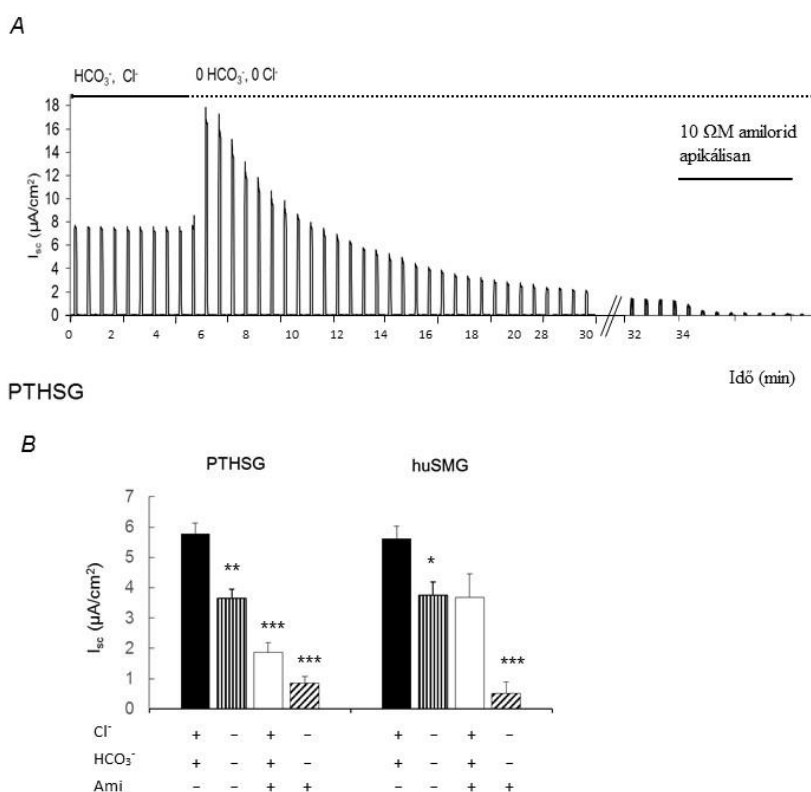
5.3 FUNKCIONÁLIS VIZSGÁLATOK

A SMIE sejtek nem képesek zárt monolayer szerkezet kialakítására, mely az Ussing kamrában való vizsgálat alapvető feltétele. Így az előkísérletekhez a Par-C10 és az HPAF sejteket használtuk. A Par-C10 és az HPAF sejteknél a bikarbonát és klorid jelenlétében, stimuláció nélkül mért rövidzárlati áram értéke meglehetősen alacsony volt (Par-C10: $I_{sc} = 1,01 \pm 0,27$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n=12$; HPAF: $I_{sc} = 0,84 \pm 0,28$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n=6$). Apikálisan adott 50 μM ATP hatására (purinerg stimuláció) az I_{sc} kétfázisos emelkedést mutatott (Par-C10: $\Delta I_{sc} = 2,31 \pm 0,31$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n=12$; HPAF: $\Delta I_{sc} = 3,35 \pm 0,85$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n=6$). A 11. ábrán egy-egy jellegzetes, egyedi regisztrátum látható. Az előkísérletek tapasztalatai alapján a primer sejteknél csak a 4.4.2. fejezetben leírt, „TIMER” beállítást használtuk az I_{sc} mérésénél, mivel tapasztalataink szerint az esetleges perfúziós problémák ennél a típusú regisztrátumnál hamarabb észrevehetőek.



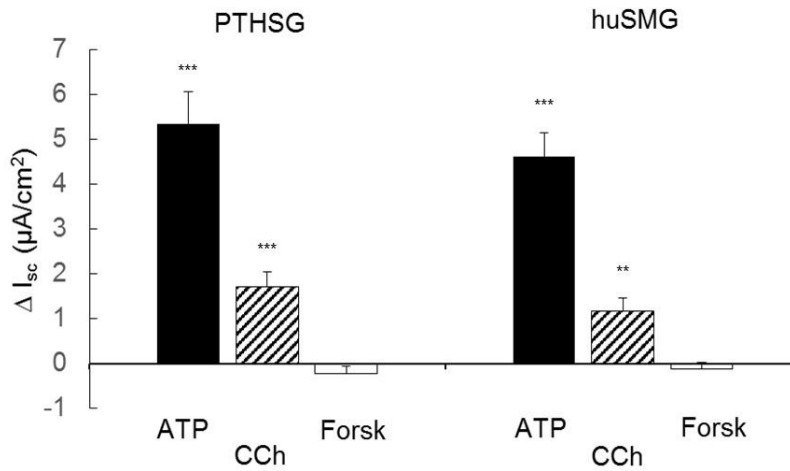
11. ábra Az ATP stimulációt követő rövidzárlati áram (I_{sc}) változások HPAF és Par-C10 sejtvonalakon Az apikális membránhoz adott $50 \mu\text{M}$ -os ATP (adenozin-triszfoszfát) hatása az I_{sc} -re HCO_3^- jelenlétében HPAF (A), illetve Par-C10 (B) sejtmolayereken. A regisztrátumok formai eltérését az Ussing kamra eltérő beállítása okozza. Az (A) ábrán a monolayereket periodikusan, 5 másodperces időtartamokra feszültségzár alá helyeztük (voltage clamp-eltük), az ilyenkor mért kis csúcsértékek reprezentálják az I_{sc} -t, míg a (B) ábra esetében a folyamatos feszültségzár következtében az I_{sc} folyamatos vonalként jelenik meg.

A PTHSG és a huSMG sejtkultúrában bikarbonátot és kloridot is tartalmazó pufferben, stimuláció nélkül jelentős bazális ionmozgást mérhető ($I_{sc}=6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$). A klorid és a bikarbonát elvonása (mind az apikális, mind a bazolaterális oldalon) ezt a bazális áramot jelentősen csökkentette. Az oldat cseréje egy átmeneti I_{sc} növekedést okozott, majd az I_{sc} beállt egy alacsonyabb szintre. Azt feltételeztük, hogy a fennmaradó ionáram a dukális Na^+ reabszorpció eredménye. Ez az ENaC csatornán keresztül megy végbe, ami szelektíven gátolható kis koncentrációjú ($10 \mu\text{M}$) amiloriddal. Az előző kísérleteket megismételtük úgy, hogy folyamatosan $10 \mu\text{M}$ amiloridot juttattunk a sejtek apikális felszínére. Amilorid gátlás mellett a bazális I_{sc} 40-60%-kal csökkent, amikor ezzel egyidőben a HCO_3^- -ot és a Cl^- -ot is elvontuk az oldatból, az ionáram majdnem teljesen megszűnt. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a bazális ionáram részben a HCO_3^- és a Cl^- szekréciójából, részben pedig a Na^+ reabszorpciójából tevődik össze, vagyis mind az acináris, mind a dukális transzport mechanizmusok jelen vannak (12.ábra).



12. ábra Az anion szubsztitúció és az ENaC gátlás hatása a nem stimulált PTHSG és huSMG monolayerek által létrehozott bazális rövidzárlati áramra (I_{sc}) A PTHSG sejtek által létrehozott bazális I_{sc} változása kétoldali Cl^- és HCO_3^- szubsztitúció után és ezt követően apikálisan adott $10 \Omega M$ amilorid (Ami) hatására. (A) A monolayereket periodikusan, 5 másodperces időtartamokra feszültségzár alá helyeztük (voltage clamp-eltük), az ilyenkor mért kis csúcsértékek reprezentálják az I_{sc} -t. (B) Az anion szubsztitúció és az apikális amilorid gátlás PTHSG és huSMG sejteken mért bazális I_{sc} -re gyakorolt hatásának összefoglalása. Az adatok 7-51 egyedi mérésből származnak, formátumuk átlag \pm SEM * $p<0,05$ ** $p<0,01$ *** $p<0,005$ a bikarbonát és klorid tartalmú oldatban, amilorid gátlás nélkül mért I_{sc} -hez képest. [152]

A szekréció stimulálására három agonistát vizsgáltunk: a carbacholt, az ATP-t és a forskolint. A carbachol (CCh) a bazolaterálisan elhelyezkedő muszkarin receptoron keresztül aktiválja az IP_3/DAG jelátviteli útvonalat és intracelluláris kalcium szint ($[Ca^{2+}]_i$) emelkedéshez vezet. Az ATP szintén az $[Ca^{2+}]_i$ -t emeli, de az apikális oldalon lévő purinerg receptorokon keresztül. A forskolin pedig közvetlenül aktiválja az adenilát-ciklázot és így a cAMP szintjét növeli a sejtekben. Vizsgálatainkban mind a $100 \mu M$ bazolaterálisan adott carbachol, mind az $50 \mu M$ apikálisan adott ATP szignifikánsan növelte az I_{sc} mértékét, míg a $10 \mu M$ koncentrációjú forskolin apikális adása az I_{sc} értékét szignifikánsan nem változtatta meg. (13. ábra).

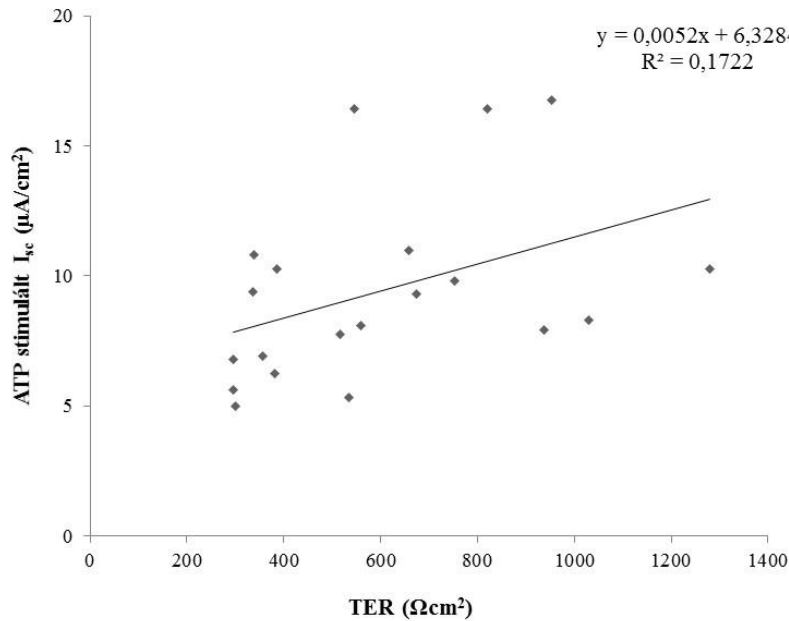


13. ábra A PTHSG és a huSMG monolayerek által létrehozott rövidzárlati áram csúcsértékének változása (ΔI_{sc}) ATP, carbachol és forskolin stimuláció hatására. A monolayereket az apikális oldalra adott 50 μM -os adenosin-triszfózfáttal (ATP), 10 μM -os forskolinnal (Forsk) és a bazolaterális oldalra adott 100 μM -os carbachollal (CCh) stimuláltuk. Az adatok 5-11 egyedi mérésből származnak, formátumuk átlag \pm SEM ** $p < 0,01$ *** $p < 0,005$ a csúcsértékek a bazális I_{sc} -hez képest. [152]

A legnagyobb stimuláló hatást az ATP eredményezte. A beadást követően 2 percen belül az I_{sc} egy csúcsértéket ért el (közel 5 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ -es növekedés a bazális áramhoz képest), majd lassanként visszatért a bazális ionáram mértékére az ATP folyamatos applikációja ellenére. A bikarbonátionok elvonása önmagában nem befolyásolta az ATP stimuláció mértékét, a HCO_3^- és a Cl^- együttes megvonása azonban szignifikánsan csökkentette az ATP hatását (PTHSG: $\Delta I_{sc} = 2,8 \pm 0,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n=5$; huSMG: $\Delta I_{sc} = 1,6 \pm 0,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $p < 0,05$, $n=8$). A kísérleteket megismételtük az ENaC csatorna gátlásával együtt is, az amilorid adása az ATP stimuláló hatását szignifikánsan csökkentette (PTHSG: $\Delta I_{sc} = 3,4 \pm 0,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n=9$; huSMG: $\Delta I_{sc} = 2,4 \pm 0,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $p < 0,05$, $n=5$). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a purinerg stimuláció mind az anion szekréciót, mind a nátrium reabszorpciót fokozza.

Egyedi Transwell preparátumokon vizsgáltuk az ATP stimulációra adott válasz mértéke és a membrán közvetlenül a rövidzárlati áram mérés kezdete előtt mért TER értéke

közötti kapcsolatot. Ahogy a 14. ábrán látható, a két érték között nincs szignifikáns összefüggés.



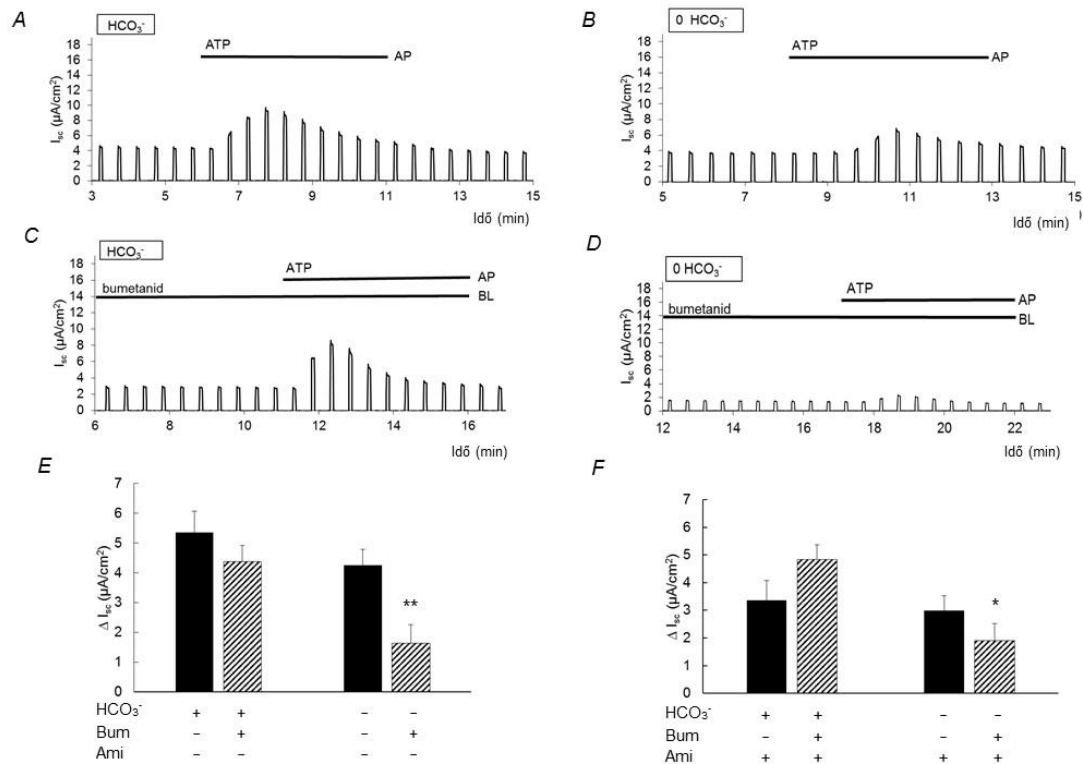
14. ábra A PTHSG és a huSMG monolayerek által létrehozott, ATP-stimulált rövidzárlati áram (I_{sc}) és a TER kapcsolata Transwell membránon tenyésztett monolayerek egyedi I_{sc} és a TER értékeit figyelembe véve, $n=20$. A lineáris regresszió nem mutat szignifikáns összefüggést ezen értékek között. ATP: adenozin-triszfoszfát, TER: transzepiteliális ellenállás [152]

A korábbi, Szlávik és mtsai által végzett tanulmány megállapította, hogy a PTHSG és a huSMG sejt kultúrában az epitél sejt populáció hasonló [116]. Jelen tanulmány során a két sejt kultúra között nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést sem a mikroszkópos megjelenésben, sem a molekuláris jellemzés vagy az alap funkcionális vizsgálatok során. A huSMG sejt kultúra ugyanakkor lényegesen érzékenyebb volt a tenyésztés során, gyakrabban fordult elő a sejtek „felúszása”, leválása az aljzatról és ezt követő pusztulása is. Így a további funkcionális vizsgálatokat csak a PTHSG sejteken végeztük el.

A kísérletek alapját munkatársam, Bori Erzsébet által végzett szemikvantitatív RT-PCR vizsgálatok adták. Eredményei szerint az ENaC, az NKCC1, az NBC1, az NHE1 és az AE2 transzporterek kimutathatók a natív nyálmirigy szövethomogenizátumban, illetve a plaztik tenyésztőedényben vagy Transwell

membránon tenyésztett PTHSG sejtekben is (a részletes eredmények Bori Erzsébet „A zománcképződés és a nyálszekréció epiteliális transzportfolyamatainak jellemzése” című Ph. D. értekezésében olvashatók).

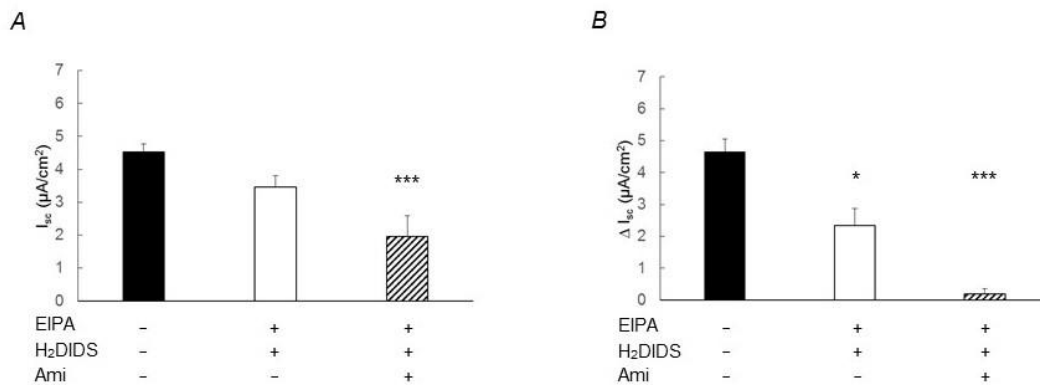
A bazolaterális oldal transzportereinek vizsgálatát az NKCC1-gyel kezdtük. Jelenlegi ismereteink szerint ez a transzporter a Cl^- felvételének fő útja a bazolaterális oldalon. Az NKCC1 szelektíven gátolható bumetaniddal, melyet $100 \mu\text{M}$ koncentrációban adtunk a bazolaterális oldalra. Ha a puffer oldat HCO_3^- -okat tartalmazott, akkor a bumetanid kezelés sem a bazális, sem az ATP által stimulált rövidzárlati áramban nem okozott szignifikáns változást. Bikarbonátió hiányában azonban a bumetanid közel 60 %-os I_{sc} csökkenést eredményezett. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az ATP-stimuláció eredményeként létrejött ionáram egy számottevő része az NKCC1 működésétől független, viszont HCO_3^- -függő mechanizmussal keletkezik. A kísérletet megismételtük $10 \mu\text{M}$ amilorid apikális applikációja mellett is, hogy a mért I_{sc} változásban az ENaC által mediált Na^+ reabszorpció ne jelenjen meg. A bumetanid előkezelés amilorid adása mellett HCO_3^- hiányában szignifikánsan csökkentette az ATP-re adott választ. Ez bumetanidra nem érzékeny, HCO_3^- -függő anion szekréció jelenlétére utal, mely jelenthet HCO_3^- szekréciót vagy HCO_3^- függő Cl^- szekréciót is (15. ábra).



15. ábra Az NKCC1 és az ENaC gátlásának hatása az ATP stimulációt követő rövidzárlati áram (I_{sc}) változásokra bikarbonát jelenlétében és hiányában a PTHSG sejt kultúrában. Az apikális membránhoz adott $50 \mu\text{M}$ -os ATP hatása az I_{sc} -re HCO_3^- jelenlétében (A) és hiányában (B); a bumetanid előkezelés (Bum, $100 \mu\text{M}$, bazolaterálisan) hatása az ATP-stimulált I_{sc} -re HCO_3^- jelenlétében (C) és hiányában (D). (E) Az I_{sc} csúcserőértékeinek változása (ΔI_{sc}) ATP hatására bumetanid és HCO_3^- jelenlétében és hiányában. (F) A ΔI_{sc} érték változása $10 \mu\text{M}$ amilorid (Ami) apikális adása mellett az előzővel megegyező kísérletek során. Az (E) és az (F) adatai 5-14 egyedi mérésből származnak, formátumuk átlag \pm SEM * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ az ugyanazon oldatban, de bumetanid gátlás nélkül mért ΔI_{sc} értékhez képest. [152]

A nyálmirigy acinusok bazolaterális oldalán van egy másodlagos kloridfelvételi út is a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ kicserélő (AE2), a Na^+/H^+ kicserélő (NHE1) és a $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ kotranszporter (NBC1) részvételével [32]. Ez a transzporter rendszer része lehet az előzőekben említett bikarbonátfüggő klorid szekréciónak és egyben a bikarbonát bazolaterális felvételét is ez biztosíthatja. A következő kísérlet sorozattal azt vizsgáltuk, hogy van-e bikarbonát szekréciónak a PTHSG sejtekben, ezért a kísérleteket kloridmentes közegben végeztük. Először szelektív gátlószerekkel gátoltuk az NBC1-et ($500 \mu\text{M}$ H₂DIDS) és az NHE1-et ($30 \mu\text{M}$ EIPA), mely a bazális I_{sc} -t kb 20 %-kal csökkentette. Az ENaC gátlása ($10 \mu\text{M}$ amilorid apikálisan) további I_{sc} csökkenést eredményezett, de az ionáram teljesen nem szűnt meg.

A kloridionok elvonása önmagában az ATP hatását szignifikánsan nem csökkentette ($\Delta I_{sc}=5,35\pm 0,71$; $n=9$ Cl⁻-tartalmú pufferben és $\Delta I_{sc}=4,66\pm 0,40$; $n=12$ Cl⁻-mentes pufferben). Az EIPA és a H₂DIDS együttes adása azonban az ATP által létrehozott ΔI_{sc} -t közel 50 %-kal csökkentette Cl⁻-mentes oldatban. A bazolaterális gátlószerek és az apikálisan adott amilorid együttes adása gyakorlatilag teljesen megszüntette az ATP stimuláció hatását. Ez arra utal, hogy az ATP hatására létrejövő áram jelentős része HCO₃⁻ szekréció eredménye és ez az útvonal a kloridionok jelenlététől függetlenül működik. Ez egyben magyarázatot adhat a korábbiakban ismertetett, bumetanid gátlás mellett is fennmaradó ionáram jelenlétére. (16. ábra)



16. ábra Az NHE1, az NBC1 és az ENaC gátlás hatása a bazális és az ATP-stimulált rövidzárlati áram (I_{sc}) változásokra PTHSG monolayereken, kloridmentes közegben. A bazális I_{sc} értékek (A) és az ATP-stimuláció okozta I_{sc} változások (ΔI_{sc} , B) bazolaterálisan adott 30µM EIPA és 500µM H₂DIDS és apikálisan adott 10 µM amilorid jelenlétében és hiányában. Az adatok 5-43 egyedi mérésből származnak, formátumuk átlag±SEM * $p<0,05$ *** $p<0,005$ a gátlás nélküli I_{sc} -hez és ΔI_{sc} -hez képest. [152]

6. MEGBESZÉLÉS

Egy olyan *in vitro* humán nyálmirigy modell, amely szabályozott, vektoriális szekrécióra képes, nemcsak a mesterséges nyálmirigy létrehozása, de a farmakológiai és génterápiás kutatások szempontjából is fontos előrelépés lehet [110]. Jelen tanulmány legfontosabb megállapítása az, hogy lehetséges humán nyálmirigy sejtekből olyan epiteliális monolayer létrehozni, amely képes a bazolaterálistól az apikális oldal felé ionokat transzportálni. Sikeresen hoztunk létre polarizált nyálmirigy epitél sejteket, melyek nemcsak szoros sejt-kapcsolatokat (tight junction) hoztak létre, hanem vektoriális elektrolit transzportra is képesek voltak.

A sejt-kultúra létrehozása során maga az izolálási és sejttenyésztési protokoll is szelekciós faktorként működhet, biztosítva ezzel az optimális epiteliális differenciációt [153]. A primer sejtek izolálására jelenleg két módszer használatos. Az általunk is használt protokoll során a nyálmirigy darabok mechanikai tisztítás és darabolás után egy enzimátikus emésztési folyamaton mennek át, az így keletkezett sejtszuszpenzió a sejt-kultúra kiindulási alapja. A másik izolálási módszernél a szövetet apró, 1 mm-es darabokra vágják és a darabokat tenyésztőedényekbe helyezik. Ennél a módszernél nincs enzimátikus emésztés, a sejtek a kis szövetdarabokból kiindulva nőnek be a felületet [154]. Ez utóbbi módszer szélesebb körben alkalmazott, mint az enzimátikus emésztéses eljárás [21, 135, 138, 148, 155]. Előnye, hogy az enzimátikus emésztés nélkül gyorsabb az izolálás és elkerülhető az esetleges „túlemésztés”, ami lecsökkentheti a traumatikus hatásokra legérzékenyebb acináris sejtek számát [121]. Ugyanakkor a huSMG protokollnál az epiteliális jellegű sejtszigetek már 2-7 nap múlva megjelennek, szemben az emésztés nélküli technikával, ahol ez az idő 7-14 nap [137]. A vizsgálataink szerint a kíméletesebb, szekvenciális emésztési protokoll több élő sejt kinyeréséhez vezet és csökkenti az enzimátikus károsodás veszélyét. Egyes vizsgálatok azt is kimutatták, hogy a szekvenciális emésztési módszer következtében több ép acináris sejt marad a sejt-kultúrában [115, 121].

A huSMG protokoll egyik meghatározó lépése a gyorsan letapadó, fibroblaszt jellegű sejtek elválasztása az epiteliális, lassabban letapadó sejtektől. Ez a lépés a

PTHSG sejtkultúra izolálása során kimarad, így a PTHSG sejtkultúra tartalmazza a gyorsan letapadó, fibroblaszt szerű sejteket is [116, 137]. A Hepato-STIM-ben tenyésztett PTHSG és huSMG sejtkultúra nagyon hasonló morfológiát és RNS expressziós mintázatot mutatott és nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést sem a monolayerek kialakulása, sem az alap funkcionális vizsgálatok (rövidzárlati áram mérés) során. Ugyanakkor a huSMG sejtkultúrával kapcsolatban már korábban is számos nehézség merült fel: lassan nő, kevés az életképes sejt [116, 119, 139]. Emellett mi a huSMG sejtkultúrájánál jóval gyakrabban tapasztaltunk megmagyarázhatatlan sejthalált, alacsony TER értékeket, mint a PTHSG-nél. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a gyorsabban és lassabban letapadó sejtpopuláció külön választása az izolálás során nem járul hozzá az epiteliális jelleg erősítéséhez, viszont a sejtkultúra életképessége szempontjából hátrányos lépés is lehet. Ezt támasztja alá az a tanulmány is, melyben melyben mezenchimális őssejteket (mesenchymal stem cells, MSCs) nyálmirigy epitél sejtekkel tenyésztettek együtt. A kokultiváció során a kétféle sejttípus nem került közvetlen kapcsolatba, de a tenyésztő tápoldaton keresztül kémiaiilag tudtak egymással kommunikálni. A kialakult mikrokönyezet elősegítette az őssejtek epiteliális differenciációját, a MSC sejtek 20-40%-a epiteliális fenotípusúvá alakult [139]. Vagyis úgy tűnik, hogy optimalizált körülmények között a mezenchimális és epiteliális jellegű sejtek interakciója segíti az epiteliális differenciációt és az epitélium kialakulását. A sejtek által létrehozott mikrokönyezet fontosságát mutatja az is, hogy a kondicionált médium (részleges tápoldat csere) használatával a PTHSG és a huSMG sejtek gyorsabban nőttek be a membránt és magasabb TER értékeket értek el.

Vizsgálataink szerint a primer sejtkultúra fenntartására a Hepato-STIM és egy általános tápoldat, a MEM is alkalmas. Azonban a MEM-ben tartott kultúrában a fibroblasztszerű sejtek rövid idő alatt dominánssá váltak és túlnőttek az epiteliális sejteket. A Hepato-STIM tápoldatban tenyésztett PTHSG és huSMG sejtkultúrák morfológiailag nagyon hasonló képet mutattak a Par-C10 sejtkultúrával, melyet epiteliálisan jól differenciált, acináris fenotípusú sejtek alkotnak [124]. Transwell membránra ültetve a Hepato-STIM tápoldatban növesztett sejtek magas TER értékeket értek el, szemben a MEM-ben tenyésztett sejtekkel, melyek TER értéke a SMIE-hez hasonlóan alacsony maradt. A TER értéke a tight junction rendszer kialakulásáról ad

képet, így megállapítható, hogy csak a Hepato-STIM tápoldat volt képes a PTHSG és a huSMG sejteket segíteni abban, hogy epitéliumszerű, zárt, polarizált monolayer hozzanak létre. Ez a kialakult zárt epitél struktúra a Par-C10 és az HPAF sejtekhez hasonlóan alkalmassá teszi a huSMG és a PTHSG sejteket az Ussing kamrában való iontranszport vizsgálatokra. A Hepato-STIM tartalmaz inzulint, hidrokortizont és EGF-et, transzferrint és kalciumot, melyek az epiteliális fenotípus fenntartásában fontos szerepet játszanak [137, 138]. A tápoldat kalcium tartalma kiemelkedő jelentőségű a differenciáció szempontjából [148]. Egy nemrégiben megjelent tanulmány kimutatta, hogy az alacsonyabb kalcium tartalom a sejtek növekedését, passzálhatóságát, a tenyészet fenntartását segíti elő, míg a magasabb kalciumszint az acináris differenciációnak kedvez [138]. Mindez arra utal, hogy jelen tenyésztési technikai során a Hepato-STIM tápoldat epiteliális szelektív faktorként működik. A tápoldat összetételének további optimalizálása pedig hozzájárulhat a primer sejtenyészet hosszútávú fenntartásához, funkcióképességének megtartásához [116, 135, 137].

A Transwell preparátumok TER értéke és az általuk produkált aktív transzport folyamatok között szoros összefüggés nem mutatható ki. Ennek az az oka, hogy a TER érték a tight junction rendszer állapotáról és így a paracelluláris permeabilitásról ad képet, ami közvetlenül a transzcelluláris aktív transzport folyamatokat nem befolyásolja. Ezt alátámasztják az HPAF és Par-C10 sejtvonalakon végzett rövidzárlati áram mérések, melyekben az HPAF ($TER \approx 5-600 \Omega \text{cm}^2$) és a Par-C10 ($TER \approx 2500 \Omega \text{cm}^2$), egyaránt közel $1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ bazális rövidzárlati áramot hozott létre.

A szabályozott folyadék- és víztranszport a nyálmirigyekben az acinus sejtekre jellemző tulajdonság. A huSMG sejtkultúra azonban az első morfológiai (transzmissziós elektron mikroszkópos vizsgálat) és funkcionális (víztranszport) vizsgálatok alapján duktális karakterűnek mutatkozott [137]. A PTHSG az eddigi vizsgálatok alapján alapvetően szintén duktális fenotípusú, bár mutat valamennyi acináris jelleget is [116]. Jelen tanulmány bemutatta, hogy az acináris fenotípus jellemző markerei, az *AMY1A* (amiláz), az *AQP5* és az *NKCC1 (SLC12A2)* fennmaradnak az izolálás és a sejtenyésztés során mind a PTHSG és a huSMG sejtkultúrában. Ugyanakkor az acináris markerek expressziója a natív szövethez képest erőteljesen csökkent, vagyis a

sejtkultúra kialakulása közben némi dedifferenciáció ment végbe. Ez a jelenség más primer sejtkultúrák tenyésztése során is megfigyelhető volt [156]. A Transwell membránra való kiültetést követően a claudin-1 génexpressziója csökkent, az amiláz génexpressziója nőtt, és a sejtek szignifikánsan több amilázt termeltek, mint a tenyésztő flaskában lévők. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az acináris fenotípus, bár a natív nyálmirigyhez képest csökkent mértékben, de fennmaradt mind a PTHSG, mind a huSMG sejteknél. Bár a polarizáció és a monolayer képzés még nem vezetett automatikusan acináris differenciációhoz, mégis mind a PTHSG, mind a huSMG karaktere kismértékben acináris irányba tolódott el. A polarizált felépítés kialakulását bizonyítja, hogy a Transwell membránon lévő sejtek csak az apikális folyadéktérbe választottak ki amilázt, a bazolaterális oldalon lévőbe nem. A claudin-1 ezen vizsgálatok során dukális markerként szerepelt. Ugyanakkor a claudin-1 kvalitatív vizsgálatok szerint nem csak a duktusokban, hanem a szerózus acinusok egy részében is kimutatható [18, 137]. A claudin-1 elengedhetetlen a normál epiteliális barrier funkció kialakulásához [15], jelenléte markere a működőképes tight junction rendszernek [79]. Azonban a kvantitatív vizsgálatok azt mutatják, hogy a claudin-1 mennyisége a duktusokban lényegesen magasabb, mint az acinusokban [6, 16, 17]. Így a claudin-1 kvantitatív markernek tekinthető, a mennyisége alapján lehet elkülöníteni az acináris és dukális fenotípust.

A transzepteliális elektrolit szekréciót rövidzárlati áram méréssel vizsgáltuk. A sejtvonalak előnye a primer sejtkultúrákkal szemben, hogy hosszú ideig tárolhatók és sok (a Par-C10 esetében akár 50-80 [124]) passzálás után is vizsgálhatók Ussing kamrában. Ezzel szemben a PTHSG és huSMG sejtkultúra a mi vizsgálatainkban a 3. passzálásig volt használható funkcionális vizsgálatokra, mások szintén a 3. vagy maximum a 6. passzálásig használták a sejteket [116, 137]. A Par-C10 és az HPAF sejteken végzett előkísérletek során a módosított Ussing kamrát a lehető legpontosabban be tudtuk állítani. Ez lehetővé tette, hogy az eleve korlátozott mennyiségben rendelkezésünkre álló mintákból minél kevesebbet veszítsünk el technikai hibák miatt. Az HPAF hasnyálmirigy eredetű, dukális sejtvonal. A hasnyálmirigyben a duktusok a folyadék- és elektrolitszekréció fő színterei, míg az acinusok felelősek a protein szekrécióért. A nyál- és hasnyálmirigyben végbemenő elektrolitszekréció a

részt vevő transzporterek és molekuláris mechanizmusok szempontjából nagyon hasonló [157-161] és a két szervet érintő patológiás állapotok között is sok hasonlóság figyelhető meg [77]. Ez indokolja egy hasnyálmirigy eredetű sejtvonal kontrollként való használatát a nyálmirigy szekréciós vizsgálata során.

A humán sejteken végzett rövidzárlati áram mérések alátámasztják azt, hogy a PTHSG és a huSMG sejtek kevert, dukális/acináris karakterűek. A legnagyobb mértékű dukális ionmozgásért felelős csatornát, az ENaC-et szelektíven blokkoltuk kis koncentrációjú amiloriddal. Így a kevert (dukális és acináris) fenotípus ellenére lehetőség nyílt a monolayerek acináris működésének karakterizálására [49, 162]. Megfigyeléseink alapján az elektrolit szekréció Cl^- és HCO_3^- -függő, ez utóbbi komponensre a bumetanid kezelés nincs hatással. Ezek az adatok arra utalnak, hogy ezekben a sejtekben jelen van a bazolaterális oldalon az NKCC1 mellett egy másodlagos kloridion felvételi út is, melyet az NHE1 és az AE2 együttes működése hoz létre [26, 36, 44, 163, 164]. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a nyálmirigy acinus sejteinek bazolaterális membránjában jelen van az NBC1 $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ kotranszporter [42, 43, 165]. Arra azonban, hogy az így felvett bikarbonátionok recirkulálnak a bazolaterális oldalon az AE2 transzporterén keresztül vagy ez az útvonal biztosítja a bikarbonát utánpótlást a a transzepiteliális bikarbonát szekrécióhoz, ezek a tanulmányok nem adtak választ. Kísérleteinkben a kloridionok elvonása (és ily módon a Cl^- -felvétel és szekréció gátlása) mellett is számottevő anion szekréciót mértünk, ez az anion szekréció szignifikánsan csökkent az NBC1 szelektív gátlását (H_2DIDS) követően. Mindezek az adatok arra utalnak, hogy a PTHSG és a huSMG sejtekben a transzepiteliális ionáram három fő komponensből tevődik össze. Körülbelül 50%-ért felel a HCO_3^- és Cl^- mozgása bazolaterálistól apikális irányba, a másik 50%-ot pedig a duktusokra jellemző, apikálistól bazolaterális irányba mutató Na^+ -áram hozza létre.

A bazális ionáram kloridmentes környezetben, az NBC1, az NHE1 és az ENaC gátlása után sem szűnt meg teljesen. A fennmaradó áram eredete nem tisztázott, hiszen minden ismert Na^+ és HCO_3^- felvételi utat blokkoltunk, a Cl^- függő transzport útvonalakat pedig a Cl^- hiánya gátolta. Nakamoto és mtsai hasonló jelenséget írtak le humán parotisz sejteken végzett kísérletek során [33]. Feltételezésük szerint a

fennmaradó ion transzport háttérében az áll, hogy az AE2 mellett jelen lehet egy másik anion kicserélő is, melyet az SLC26 géncsalád valamelyik tagja kódol. zt alátámasztja, hogy az emberi parotisban kimutatható az SLC26 géncsalád néhány tagja, az SLC26A1, 2, 4, 8 és 10-es altípus. Az SLC26A1 és az SLC26A4 anion kicserélők, melyek feltételezhetően képesek HCO_3^- szállítására és nem érzékenyek sem DIDS-re, sem EIPA-ra [166, 167]. Ennek a kérdésnek a tisztázása további, az SLC26 jelenlétét és működését célzó vizsgálatokat igényel.

Jelenlegi ismereteink szerint, bár az intracelluláris Ca^{2+} - és cAMP mediálta jelátviteli útvonal nem független egymástól [70], a nyálmirigyekben az intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedése inkább az elektrolit- és víz szekrécióját, míg a cAMP szint emelkedése inkább a protein szekréciót fokozza [4, 26, 160, 168]. A munkánk során azt tapasztaltuk, hogy a Ca^{2+} -mediálta útvonalon ható ATP és carbachol fokozta a transzepiteliális ion szekréciót, míg a forskolin, mely az intracelluláris cAMP szintet növeli, nem okoz mérhető I_{sc} változást. A paraszimpatikus stimuláció M3 muszkarinerg receptorhoz kötött [4, 160, 168, 169]. Ez magyarázza a kolinerg agonista carbachol hatását. A purinerg jelátvitel jelenlétéről, vagyis az ATP transzepiteliális szekréciót fokozó hatásáról számos korábbi, sejtvonalakon végzett tanulmány is beszámolt [170-172]. A méréseink szerint az ATP stimuláció eredményezte a legnagyobb I_{sc} növekedést. Az, hogy a purinerg stimuláció a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ szint növelése szempontjából hatékonyabb a muszkarinerg stimulációnál, az irodalomból nem ismeretlen, de a mechanizmusa nem tisztázott [70, 173]. Kísérleteink során az ENaC csatorna gátlása csökkentette az ATP kiváltotta I_{sc} növekedést. Ez arra utal, hogy az ATP az ENaC működését is fokozza. Ezzel szemben az irodalmi adatok azt mutatják, hogy a purinerg stimuláció az ENaC működését gátolja [57, 174, 175]. Wildman és mtsai megfigyelései alapján a vesében alacsony (50 mM) luminális Na^+ koncentráció esetén a purinerg stimuláció az ENaC-et stimulálja. Azonban ez a tanulmány is kiemeli, hogy az általunk is használt, 140 mM körüli apikális Na^+ koncentrációnál a gátló hatás érvényesül [57]. Így az általunk tapasztalt jelenség magyarázata további vizsgálatokat igényel.

A nyálmirigy szerkéciós működésének jelenlegi modellje különböző laboratóriumi állatokon (egereken, patkányokon, nyulakon) végzett molekuláris és funkcionális vizsgálaton alapul [32, 44]. Az utóbbi években a sejtvonalakból és

sejtkultúrákból tenyésztett monolayereken végzett vizsgálatok fokozatosan kiszorították a duktusz izolálási technikát. Azonban polarizált monolayeret alkotó humán nyálmirigy sejtek eddig nem álltak rendelkezésre a szekréció vizsgálatára [132, 176].

Jelen tanulmány igazolja, hogy a PTHSG és a huSMG sejtkultúrák a zárt, polarizált monolayerek kialakítására képesek, hanem szabályozott, transzepiteliális anion szekrécióra is.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

1. A PTHSG és a huSMG primer nyálmirigy kultúrák csak Hepato-STIM tápoldatban tenyésztve voltak képesek Transwell Clear membránon zárt, polarizált monolayer létrehozni. A konvencionális összetételű MEM tápoldat sem a sejt-kultúra epiteliális fenotípusának megtartásához, sem a zárt monolayer kialakulásához nem biztosított megfelelő környezetet. A Hepato-STIM tápoldatban tenyésztett PTHSG és huSMG sejt-kultúrák építéssel jellemezhető sejt-populációja hasonló tulajdonságokkal rendelkezett. A PTHSG sejt-kultúrában a gyorsan letapadó mezenchimális sejtek jelenléte ellenére is képesek voltak epiteliális fenotípust megjeleníteni. Ez arra utal, hogy a Hepato-STIM tápoldat a tenyésztés során epiteliális szelekciós faktorként működött. A tápoldat részleges cseréje és a kíméletesebb, szekvenciális emésztési protokoll több életképes sejtet és gyorsabb növekedést eredményezett.
2. Az alkalmazott izolálási-tenyésztési módszer következtében a PTHSG és a huSMG sejt-kultúra acináris és duktális tulajdonságokat is mutatott. Az acináris fenotípust igazoló markerek (AQP5, AMY1A, NKCC1) expressziója a natív szövethez képest szignifikánsan alacsonyabb szinten, de az izolált sejt-kultúrában is kimutatható volt. Az izolált sejtek képesek voltak amiláz szekrécióra, ami szintén az acináris jelleget igazolja. A polarizált monolayer szerkezet kialakulása után mind az amiláz génexpressziója, mind az amiláz termelés fokozódott. A Transwell membránon tenyésztett sejtek amilázt csak az apikális folyadéktérbe szekretáltak, ami alátámasztja a polarizált szerkezet létrejöttét.
3. A SMIE sejtek nem voltak képesek zárt, polarizált monolayer létrehozására. Ezzel szemben a Par-C10 és az HPAF sejtek Transwell membránra kiültetve konfluens, polarizált monolayer hoztak létre. Így Ussing kamrában vizsgálható volt a sejtek vektorialis elektrolitszekréciója.

4. A Hepato-STIMben tenyésztett PTHSG és huSMG monolayerek képesek voltak vektoriális elektrolitranszportra.
 - a. A teljes transzeptiteliális ionmozgást a bazolaterálistól apikális irányba mutató HCO_3^- és Cl^- transzport és az apikálistól bazolaterális irányba mutató Na^+ -áram együttesen hozta létre.
 - b. A transzeptiteliális ionáram purinerg (ATP) és kolinerg (CCh) agonisták hatására szignifikánsan nőtt, ezzel szemben az intracelluláris cAMP szintet növelő forskolin adása mérhető I_{sc} változást nem eredményezett.
 - c. A PTHSG sejtekben az ATP stimulált anion transzport HCO_3^- mentes közegben csökkenthető volt bazolaterálisan adott bumetaniddal, Cl^- mentes közegben EIPA és H_2DIDS együttes, bazolaterális applikációjával. Ez arra utal, hogy a PTHSG sejtek bazolaterális membránjában NKCC1, NHE1 és NBC1 transzporterek működnek.

Összegezve a humán szubmandibuláris nyálmirigyből izolált PTHSG és huSMG sejt kultúrákból létrehozott monolayerek képesek szabályozott, vektoriális ionszokréción, így alkalmasak a nyálmirigy működés kétdimenziós modellezésére.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A huSMG és a PTHSG primer emberi szubmandibuláris nyálmirigy sejt kultúrák az irodalmi adatok alapján duktális fenotípusúak. Azonban részletes funkcionális vizsgálatot ezeken a sejteken nem végeztek. A tanulmány célja a PTHSG és a huSMG monolayer képzési adottságait és a sejtek acináris jellegének megtartottságát vizsgálni molekuláris biológiai és ion transzport vizsgálatokkal. A metodika megalapozására és kontrollként sejtvonalakat használtunk (SMIE patkány szubmandibuláris és Par-C10 patkány parotisz eredetű acináris sejtvonalak; HPAF humán hasnyálmirigy eredetű duktális sejtvonal). A huSMG és a PTHSG sejtek Transwell Clear poliészter membránon, Hepato-STIM tápoldatban képesek konfluens, polarizált monolayer létrehozására, míg MEM tápoldatban nem. A sejtekben kimutatható az acináris markerként használt NKCC1, AQP5 és amiláz, valamint a duktális markerként használatos ENaC és CLDN1 génexpressziója. A sejtek amiláz termelésére képesek és ez a Transwell membránra ültetve fokozódik. A monolayerek bazális rövidzárlati áram (I_{sc}) mennyisége a Cl^- és HCO_3^- elvonása vagy az epiteliális Na^+ csatornát (ENaC) gátló kis koncentrációjú amilorid adása után szignifikánsan csökken. Cl^- és HCO_3^- mentes közegben az amilorid hatására az I_{sc} majdnem teljesen megszűnik. Az I_{sc} növelhető az $[Ca^{2+}]_i$ szint növelésével purinerg (ATP) és kolinerg (carbachol) stimulációval, míg a cAMP szint növelésével (forskolin) nem. A PTHSG sejtekben az ATP hatása HCO_3^- -mentes közegben csökkenthető bumetaniddal, mely a bazolaterálisan elhelyezkedő $Na^+-K^+-2Cl^-$ kotranszportert (NKCC1) gátolja. Cl^- -mentes közegben a $Na^+-HCO_3^-$ kotranszporter (NBC1) inhibitor H_2DIDS és a Na^+/H^+ kicserélő (NHE1) inhibitor EIPA együttes adása az ATP stimuláció hatását majdnem teljesen megszünteti. A bazális I_{sc} -t a Cl^- elvonása, a H_2DIDS és az EIPA együttesen sem tudta teljesen megszüntetni. A huSMG és a PTHSG sejtekből Transwell membránon létrehozott monolayerek képesek aktív, transzepiteliális ionszekréción. A transzepiteliális ionáram a Cl^- és HCO_3^- szekréciónból és Na^+ reabszorpciónból együttesen jön létre. A PTHSG sejtek bazolaterális oldalán a Par-C10-hez és az HPAF-hoz hasonlóan NBC1, NHE1, AE2 és NKCC1 transzporter működik. Jelen tanulmány bemutatta, hogy sikeresen létrehoztunk egy, bár duktális és acináris karaktert egyaránt megjelenítő, de vektoriális elektrolit szekréciónra képes kétdimenziós emberi nyálmirigy szekrécións modellt.

9. SUMMARY

The huSMG and PTHSG human submandibular primary cell cultures are known to be of ductal phenotype. However, these cells have never been functionally characterized. The purpose of this study was to investigate whether these cells can maintain any acinar function during cell culturing and monolayer formation on Transwell Clear polyester membranes. To set experimental conditions for functional preliminary experiments, and also as control, we used two acinar rat salivary cell lines (SMIE from a submandibular gland and Par-C10 from parotis) and a human pancreatic ductal cell line (HPAF). The huSMG and PTHSG cells are capable of forming confluent, polarized monolayers on Transwell Clear membranes when culturing in Hepato-STIM medium, but not in MEM medium. The cells express acinar markers (NKCC1, AQP5 and AMY1A) and ductal markers (ENaC and CLDN1) as well. Cells are capable of amylase secretion; the amount of amylase in the medium is higher when the cells are grown on Transwell membranes. Transepithelial ion transport was estimated by short-circuit current (I_{sc}) measurements. The I_{sc} was substantially reduced by either Cl^- and HCO_3^- withdrawal or by the blockade of apical epithelial sodium channel (ENaC) by amiloride. An almost complete inhibition was observed following a simultaneous ENaC block and the withdrawal of the two anions. I_{sc} was enhanced by Ca^{2+} -activated regulatory pathways (purinergic stimulation by ATP and cholinergic stimulation by carbachol), but not by cAMP elevating forskolin. In PTHSG cells the inhibition of basolateral $Na^+K^+2Cl^-$ cotransporter NKCC1 by bumetanide reduced the response to ATP in the absence of HCO_3^- . In the absence of Cl^- , the application of H₂DIDS and EIPA (inhibitors of $Na^+HCO_3^-$ cotransporter NBC1 and Na^+/H^+ exchanger NHE1, respectively) almost completely abolished the I_{sc} changes evoked by ATP but could only partially reduce basal I_{sc} . PTHSG and huSMG monolayers grown on Transwell membranes are capable of achieving transepithelial ion transport, which has two major components: a basolateral-to-apical anion secretion and an apical-to-basolateral Na^+ flux. The NBC1, NHE1, AE2 and NKCC1 are presented in the basolateral membrane of PTHSG cells. In summary, we successfully created a human salivary secretion model, although in some parameters it shows a mixed acinar/ductal phenotype.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Eliasson L, Carlen A. (2010) An update on minor salivary gland secretions. *Eur J Oral Sci*, 118: 435-442.
2. Fehér E. A nyálmirigyek anatómiája és szöveti szerkezete. In: Fehér E (szerk.), *Maxillofaciális anatómia*. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2001: 88-94.
3. Humphrey SP, Williamson RT. (2001) A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent*, 85: 162-169.
4. Varga G. (2012) Physiology of the salivary glands. *Surgery - Oxford International Edition*, 30: 578-583.
5. Steward MC, Case RM. Principles of ion and water transport across epithelia. In: Davison JS (szerk.), *Gastrointestinal Secretion*. John Wright Publishing Inc., London, 1989: 1-9.
6. Baker OJ. (2010) Tight junctions in salivary epithelium. *J Biomed Biotechnol*, 2010: 278948.
7. Lafrenie RM, Yamada KM. (1996) Integrin-dependent signal transduction. *J Cell Biochem*, 61: 543-553.
8. Danen EH, Lafrenie RM, Miyamoto S, Yamada KM. (1998) Integrin signaling: cytoskeletal complexes, MAP kinase activation, and regulation of gene expression. *Cell Adhes Commun*, 6: 217-224.
9. Goodenough DA, Paul DL. (2009) Gap junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1: a002576.
10. Dbouk HA, Mroue RM, El-Sabban ME, Talhouk RS. (2009) Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. *Cell Commun Signal*, 7: 4.
11. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 285-293.
12. Walker JL, Menko AS, Khalil S, Rebutini I, Hoffman MP, Kreidberg JA, Kukuruzinska MA. (2008) Diverse roles of E-cadherin in the morphogenesis of the submandibular gland: insights into the formation of acinar and ductal structures. *Dev Dyn*, 237: 3128-3141.

13. Baum BJ. (1993) Principles of saliva secretion. *Ann N Y Acad Sci*, 694: 17-23.
14. Anderson JM. (2001) Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol Sci*, 16: 126-130.
15. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. (2002) Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol*, 156: 1099-1111.
16. Peppi M, Ghabriel MN. (2004) Tissue-specific expression of the tight junction proteins claudins and occludin in the rat salivary glands. *J Anat*, 205: 257-266.
17. Lourenco SV, Coutinho-Camillo CM, Buim ME, Uyekita SH, Soares FA. (2007) Human salivary gland branching morphogenesis: morphological localization of claudins and its parallel relation with developmental stages revealed by expression of cytoskeleton and secretion markers. *Histochem Cell Biol*, 128: 361-369.
18. Maria OM, Kim JW, Gerstenhaber JA, Baum BJ, Tran SD. (2008) Distribution of tight junction proteins in adult human salivary glands. *J Histochem Cytochem*, 56: 1093-1098.
19. Mandell KJ, Parkos CA. (2005) The JAM family of proteins. *Adv Drug Deliv Rev*, 57: 857-867.
20. Kriegs JO, Homann V, Kinne-Saffran E, Kinne RK. (2007) Identification and subcellular localization of paracellin-1 (claudin-16) in human salivary glands. *Histochem Cell Biol*, 128: 45-53.
21. Joraku A, Sullivan CA, Yoo J, Atala A. (2007) In-vitro reconstitution of three-dimensional human salivary gland tissue structures. *Differentiation*, 75: 318-324.
22. Xiang RL, Mei M, Cong X, Li J, Zhang Y, Ding C, Wu LL, Yu GY. (2014) Claudin-4 is required for AMPK-modulated paracellular permeability in submandibular gland cells. *J Mol Cell Biol*, 6: 486-497.
23. Cong X, Zhang Y, Li J, Mei M, Ding C, Xiang RL, Zhang LW, Wang Y, Wu LL, Yu GY. (2015) Claudin-4 is required for modulation of paracellular permeability by muscarinic acetylcholine receptor in epithelial cells. *J Cell Sci*, 128: 2271-2286.

24. Ichikawa-Tomikawa N, Sugimoto K, Satohisa S, Nishiura K, Chiba H. (2011) Possible involvement of tight junctions, extracellular matrix and nuclear receptors in epithelial differentiation. *J Biomed Biotechnol*, 2011: 253048.
25. Thaysen JH, Thorn NA, Schwartz IL. (1954) Excretion of sodium, potassium, chloride and carbon dioxide in human parotid saliva. *Am J Physiol*, 178: 155-159.
26. Melvin JE, Yule D, Shuttleworth T, Begenisich T. (2005) Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. *Annu Rev Physiol*, 67: 445-469.
27. Matsuzaki T, Tajika Y, Ablimit A, Aoki T, Hagiwara H, Takata K. (2004) Aquaporins in the digestive system. *Med Electron Microsc*, 37: 71-80.
28. Gresz V, Kwon TH, Hurley PT, Varga G, Zelles T, Nielsen S, Case RM, Steward MC. (2001) Identification and localization of aquaporin water channels in human salivary glands. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 281: G247-254.
29. Matsuzaki T, Susa T, Shimizu K, Sawai N, Suzuki T, Aoki T, Yokoo S, Takata K. (2012) Function of the membrane water channel aquaporin-5 in the salivary gland. *Acta Histochem Cytochem*, 45: 251-259.
30. Ma T, Song Y, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS. (1999) Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels. *J Biol Chem*, 274: 20071-20074.
31. Krane CM, Melvin JE, Nguyen HV, Richardson L, Towne JE, Doetschman T, Menon AG. (2001) Salivary acinar cells from aquaporin 5-deficient mice have decreased membrane water permeability and altered cell volume regulation. *J Biol Chem*, 276: 23413-23420.
32. Catalan MA, Nakamoto T, Melvin JE. (2009) The salivary gland fluid secretion mechanism. *J Med Invest*, 56 Suppl: 192-196.
33. Nakamoto T, Srivastava A, Romanenko VG, Ovitt CE, Perez-Cornejo P, Arreola J, Begenisich T, Melvin JE. (2007) Functional and molecular characterization of the fluid secretion mechanism in human parotid acinar cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 292: R2380-2390.

34. Nehrke K, Quinn CC, Begenisich T. (2003) Molecular identification of Ca²⁺-activated K⁺ channels in parotid acinar cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284: C535-546.
35. Romanenko V, Nakamoto T, Srivastava A, Melvin JE, Begenisich T. (2006) Molecular identification and physiological roles of parotid acinar cell maxi-K channels. *J Biol Chem*, 281: 27964-27972.
36. Bell SM, Schreiner CM, Schultheis PJ, Miller ML, Evans RL, Vorhees CV, Shull GE, Scott WJ. (1999) Targeted disruption of the murine *Nhe1* locus induces ataxia, growth retardation, and seizures. *Am J Physiol*, 276: C788-795.
37. Sterling D, Reithmeier RA, Casey JR. (2001) Carbonic anhydrase: in the driver's seat for bicarbonate transport. *JOP*, 2: 165-170.
38. Li J, Koo NY, Cho IH, Kwon TH, Choi SY, Lee SJ, Oh SB, Kim JS, Park K. (2006) Expression of the Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter and its role in pH_i regulation in guinea pig salivary glands. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 291: G1031-1040.
39. Szucs A, Demeter I, Burghardt B, Ovari G, Case RM, Steward MC, Varga G. (2006) Vectorial bicarbonate transport by Capan-1 cells: a model for human pancreatic ductal secretion. *Cell Physiol Biochem*, 18: 253-264.
40. Demeter I, Hegyesi O, Nagy AK, Case MR, Steward MC, Varga G, Burghardt B. (2009) Bicarbonate transport by the human pancreatic ductal cell line HPAF. *Pancreas*, 38: 913-920.
41. Demeter I, Szucs A, Hegyesi O, Foldes A, Racz GZ, Burghardt B, Steward MC, Varga G. (2009) Vectorial bicarbonate transport by Par-C10 salivary cells. *J Physiol Pharmacol*, 60 Suppl 7: 197-204.
42. Luo X, Choi JY, Ko SB, Pushkin A, Kurtz I, Ahn W, Lee MG, Muallem S. (2001) HCO₃⁻ salvage mechanisms in the submandibular gland acinar and duct cells. *J Biol Chem*, 276: 9808-9816.
43. Roussa E, Romero MF, Schmitt BM, Boron WF, Alper SL, Thevenod F. (1999) Immunolocalization of anion exchanger AE2 and Na⁽⁺⁾-HCO⁽⁻⁾(3) cotransporter in rat parotid and submandibular glands. *Am J Physiol*, 277: G1288-1296.

44. Turner RJ, Sugiya H. (2002) Understanding salivary fluid and protein secretion. *Oral Dis*, 8: 3-11.
45. Evans RL, Park K, Turner RJ, Watson GE, Nguyen HV, Dennett MR, Hand AR, Flagella M, Shull GE, Melvin JE. (2000) Severe impairment of salivation in Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter (NKCC1)-deficient mice. *J Biol Chem*, 275: 26720-26726.
46. Catalan MA, Kondo Y, Pena-Munzenmayer G, Jaramillo Y, Liu F, Choi S, Crandall E, Borok Z, Flodby P, Shull GE, Melvin JE. (2015) A fluid secretion pathway unmasked by acinar-specific Tmem16A gene ablation in the adult mouse salivary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: 2263-2268.
47. Huang F, Rock JR, Harfe BD, Cheng T, Huang X, Jan YN, Jan LY. (2009) Studies on expression and function of the TMEM16A calcium-activated chloride channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 21413-21418.
48. Romanenko VG, Catalan MA, Brown DA, Putzier I, Hartzell HC, Marmorstein AD, Gonzalez-Begne M, Rock JR, Harfe BD, Melvin JE. (2010) Tmem16A encodes the Ca²⁺-activated Cl⁻ channel in mouse submandibular salivary gland acinar cells. *J Biol Chem*, 285: 12990-13001.
49. Catalan MA, Nakamoto T, Gonzalez-Begne M, Camden JM, Wall SM, Clarke LL, Melvin JE. (2010) Cftr and ENaC ion channels mediate NaCl absorption in the mouse submandibular gland. *J Physiol*, 588: 713-724.
50. Shcheynikov N, Yang D, Wang Y, Zeng W, Karniski LP, So I, Wall SM, Muallem S. (2008) The Slc26a4 transporter functions as an electroneutral Cl⁻/I⁻/HCO₃⁻ exchanger: role of Slc26a4 and Slc26a6 in I⁻ and HCO₃⁻ secretion and in regulation of CFTR in the parotid duct. *J Physiol*, 586: 3813-3824.
51. Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman JJ. (2002) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cyst Fibros*, 1: 13-29.
52. Nakamoto T, Romanenko VG, Takahashi A, Begenisich T, Melvin JE. (2008) Apical maxi-K (KCa1.1) channels mediate K⁺ secretion by the mouse submandibular exocrine gland. *Am J Physiol Cell Physiol*, 294: C810-819.

53. Manganel M, Turner RJ. (1990) Agonist-induced activation of Na⁺/H⁺ exchange in rat parotid acinar cells is dependent on calcium but not on protein kinase C. *J Biol Chem*, 265: 4284-4289.
54. Nguyen HV, Stuart-Tilley A, Alper SL, Melvin JE. (2004) Cl⁻/HCO₃⁻ exchange is acetazolamide sensitive and activated by a muscarinic receptor-induced [Ca²⁺]_i increase in salivary acinar cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 286: G312-320.
55. Ishikawa Y, Eguchi T, Skowronski MT, Ishida H. (1998) Acetylcholine acts on M3 muscarinic receptors and induces the translocation of aquaporin5 water channel via cytosolic Ca²⁺ elevation in rat parotid glands. *Biochem Biophys Res Commun*, 245: 835-840.
56. Drury AN, Szent-Gyorgyi A. (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol*, 68: 213-237.
57. Wildman SS, Kang ES, King BF. (2009) ENaC, renal sodium excretion and extracellular ATP. *Purinergic Signal*, 5: 481-489.
58. Schwiebert EM, Zsembery A. (2003) Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 1615: 7-32.
59. Wang J, Haanes KA, Novak I. (2013) Purinergic regulation of CFTR and Ca²⁺-activated Cl⁻ channels and K⁺ channels in human pancreatic duct epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol*, 304: C673-684.
60. Novak I. (2003) ATP as a signaling molecule: the exocrine focus. *News Physiol Sci*, 18: 12-17.
61. Burnstock G. (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol Rev*, 24: 509-581.
62. Taylor AL, Kudlow BA, Marrs KL, Gruenert DC, Guggino WB, Schwiebert EM. (1998) Bioluminescence detection of ATP release mechanisms in epithelia. *Am J Physiol*, 275: C1391-1406.
63. Braunstein GM, Roman RM, Clancy JP, Kudlow BA, Taylor AL, Shylonsky VG, Jovov B, Peter K, Jilling T, Ismailov, II, Benos DJ, Schwiebert LM, Fitz JG, Schwiebert EM. (2001) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator facilitates ATP release by stimulating a separate ATP release channel for autocrine control of cell volume regulation. *J Biol Chem*, 276: 6621-6630.

64. Schwiebert EM, Egan ME, Hwang TH, Fulmer SB, Allen SS, Cutting GR, Guggino WB. (1995) CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell*, 81: 1063-1073.
65. Cantiello HF. (2001) Electrodifusional ATP movement through CFTR and other ABC transporters. *Pflugers Arch*, 443 Suppl 1: S22-27.
66. Fitz JG. (2007) Regulation of cellular ATP release. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 118: 199-208.
67. Stout CE, Costantin JL, Naus CC, Charles AC. (2002) Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem*, 277: 10482-10488.
68. Kaebisch C, Schipper D, Babczyk P, Tobiasch E. (2015) The role of purinergic receptors in stem cell differentiation. *Comput Struct Biotechnol J*, 13: 75-84.
69. Nguyen TD, Meichle S, Kim US, Wong T, Moody MW. (2001) P2Y(11), a purinergic receptor acting via cAMP, mediates secretion by pancreatic duct epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 280: G795-804.
70. Brown DA, Bruce JJ, Straub SV, Yule DI. (2004) cAMP potentiates ATP-evoked calcium signaling in human parotid acinar cells. *J Biol Chem*, 279: 39485-39494.
71. Amerongen AV, Veerman EC. (2002) Saliva--the defender of the oral cavity. *Oral Dis*, 8: 12-22.
72. Wickstrom C, Davies JR, Eriksen GV, Veerman EC, Carlstedt I. (1998) MUC5B is a major gel-forming, oligomeric mucin from human salivary gland, respiratory tract and endocervix: identification of glycoforms and C-terminal cleavage. *Biochem J*, 334 (Pt 3): 685-693.
73. Situ H, Wei G, Smith CJ, Mashhoon S, Bobek LA. (2003) Human salivary MUC7 mucin peptides: effect of size, charge and cysteine residues on antifungal activity. *Biochem J*, 375: 175-182.
74. <http://www.oralcancerfoundation.org/> letöltve: 2016.02.20.
75. Napenas JJ, Brennan MT, Fox PC. (2009) Diagnosis and treatment of xerostomia (dry mouth). *Odontology*, 97: 76-83.
76. Ship JA, Pillemer SR, Baum BJ. (2002) Xerostomia and the geriatric patient. *J Am Geriatr Soc*, 50: 535-543.

77. Rakonczay Z, Jr., Vag J, Foldes A, Nagy K, Nagy A, Hegyi P, Varga G. (2014) Chronic inflammation in the pancreas and salivary glands--lessons from similarities and differences in pathophysiology and treatment modalities. *Curr Pharm Des*, 20: 1104-1120.
78. Zhang LW, Cong X, Zhang Y, Wei T, Su YC, Serrao AC, Brito AR, Jr., Yu GY, Hua H, Wu LL. (2016) Interleukin-17 Impairs Salivary Tight Junction Integrity in Sjogren's Syndrome. *J Dent Res*, 95(7): 784-92
79. Baker OJ, Camden JM, Redman RS, Jones JE, Seye CI, Erb L, Weisman GA. (2008) Proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma alter tight junction structure and function in the rat parotid gland Par-C10 cell line. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295: C1191-1201.
80. Atkinson JC, Fox PC. (1993) Sjogren's syndrome: oral and dental considerations. *J Am Dent Assoc*, 124: 74-76, 78-82, 84-86.
81. Ramaekers BL, Joore MA, Grutters JP, van den Ende P, Jong J, Houben R, Lambin P, Christianen M, Beetz I, Pijls-Johannesma M, Langendijk JA. (2011) The impact of late treatment-toxicity on generic health-related quality of life in head and neck cancer patients after radiotherapy. *Oral Oncol*, 47: 768-774.
82. Jensen SB, Pedersen AM, Reibel J, Nauntofte B. (2003) Xerostomia and hypofunction of the salivary glands in cancer therapy. *Support Care Cancer*, 11: 207-225.
83. Valdez IH, Wolff A, Atkinson JC, Macynski AA, Fox PC. (1993) Use of pilocarpine during head and neck radiation therapy to reduce xerostomia and salivary dysfunction. *Cancer*, 71: 1848-1851.
84. Seikaly H, Jha N, McGaw T, Coulter L, Liu R, Oldring D. (2001) Submandibular gland transfer: a new method of preventing radiation-induced xerostomia. *Laryngoscope*, 111: 347-352.
85. Rieger JM, Jha N, Lam Tang JA, Harris J, Seikaly H. (2012) Functional outcomes related to the prevention of radiation-induced xerostomia: oral pilocarpine versus submandibular salivary gland transfer. *Head Neck*, 34: 168-174.
86. Daly-Schveitzer N, Julieron M, Tao YG, Moussier A, Bourhis J. (2011) Intensity-modulated radiation therapy (IMRT): toward a new standard for

- radiation therapy of head and neck cancer? *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*, 128: 241-247.
87. Shiboski CH, Hodgson TA, Ship JA, Schiodt M. (2007) Management of salivary hypofunction during and after radiotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 103 Suppl: S66 e1-19.
 88. Melcher AH. (1976) On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol*, 47: 256-260.
 89. Kagami H, Wang S, Hai B. (2008) Restoring the function of salivary glands. *Oral Dis*, 14: 15-24.
 90. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. (2000) Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*, 343: 230-238.
 91. Sugito T, Kagami H, Hata K, Nishiguchi H, Ueda M. (2004) Transplantation of cultured salivary gland cells into an atrophic salivary gland. *Cell Transplant*, 13: 691-699.
 92. Tran SD, Pillemer SR, Dutra A, Barrett AJ, Brownstein MJ, Key S, Pak E, Leakan RA, Kingman A, Yamada KM, Baum BJ, Mezey E. (2003) Differentiation of human bone marrow-derived cells into buccal epithelial cells in vivo: a molecular analytical study. *Lancet*, 361: 1084-1088.
 93. Lombaert IM, Wierenga PK, Kok T, Kampinga HH, deHaan G, Coppes RP. (2006) Mobilization of bone marrow stem cells by granulocyte colony-stimulating factor ameliorates radiation-induced damage to salivary glands. *Clin Cancer Res*, 12: 1804-1812.
 94. Tran SD, Liu Y, Xia D, Maria OM, Khalili S, Wang RW, Quan VH, Hu S, Seuntjens J. (2013) Paracrine effects of bone marrow soup restore organ function, regeneration, and repair in salivary glands damaged by irradiation. *PLoS One*, 8: e61632.
 95. Delporte C, Hoque AT, Kulakusky JA, Braddon VR, Goldsmith CM, Wellner RB, Baum BJ. (1998) Relationship between adenovirus-mediated aquaporin 1 expression and fluid movement across epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 246: 584-588.

96. Delporte C, O'Connell BC, He X, Lancaster HE, O'Connell AC, Agre P, Baum BJ. (1997) Increased fluid secretion after adenoviral-mediated transfer of the aquaporin-1 cDNA to irradiated rat salivary glands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 3268-3273.
97. Shan Z, Li J, Zheng C, Liu X, Fan Z, Zhang C, Goldsmith CM, Wellner RB, Baum BJ, Wang S. (2005) Increased fluid secretion after adenoviral-mediated transfer of the human aquaporin-1 cDNA to irradiated miniature pig parotid glands. *Mol Ther*, 11: 444-451.
98. Perez P, Rowzee AM, Zheng C, Adriaansen J, Baum BJ. (2010) Salivary epithelial cells: an unassuming target site for gene therapeutics. *Int J Biochem Cell Biol*, 42: 773-777.
99. O'Connell AC, Baccaglini L, Fox PC, O'Connell BC, Kenshalo D, Oweisy H, Hoque AT, Sun D, Herscher LL, Braddon VR, Delporte C, Baum BJ. (1999) Safety and efficacy of adenovirus-mediated transfer of the human aquaporin-1 cDNA to irradiated parotid glands of non-human primates. *Cancer Gene Ther*, 6: 505-513.
100. Zheng C, Goldsmith CM, Mineshiba F, Chiorini JA, Kerr A, Wenk ML, Vallant M, Irwin RD, Baum BJ. (2006) Toxicity and biodistribution of a first-generation recombinant adenoviral vector, encoding aquaporin-1, after retroductal delivery to a single rat submandibular gland. *Hum Gene Ther*, 17: 1122-1133.
101. Zheng C, Voutetakis A, Kok MR, Goldsmith CM, Smith GB, Elmore S, Nyska A, Vallant M, Irwin RD, Baum BJ. (2006) Toxicity and biodistribution of a first-generation recombinant adenoviral vector, in the presence of hydroxychloroquine, following retroductal delivery to a single rat submandibular gland. *Oral Dis*, 12: 137-144.
102. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT00372320?term=irradiation-induced+parotid&rank=2> letöltve: 2016.02.20.
103. Samuni Y, Baum BJ. (2011) Gene delivery in salivary glands: from the bench to the clinic. *Biochim Biophys Acta*, 1812: 1515-1521.
104. Baum BJ, Wang S, Cukierman E, Delporte C, Kagami H, Marmary Y, Fox PC, Mooney DJ, Yamada KM. (1999) Re-engineering the functions of a terminally differentiated epithelial cell in vivo. *Ann N Y Acad Sci*, 875: 294-300.

105. Baum BJ, Tran SD. (2006) Synergy between genetic and tissue engineering: creating an artificial salivary gland. *Periodontol* 2000, 41: 218-223.
106. Aframian DJ, Cukierman E, Nikolovski J, Mooney DJ, Yamada KM, Baum BJ. (2000) The growth and morphological behavior of salivary epithelial cells on matrix protein-coated biodegradable substrata. *Tissue Eng*, 6: 209-216.
107. Aframian DJ, Redman RS, Yamano S, Nikolovski J, Cukierman E, Yamada KM, Kriete MF, Swaim WD, Mooney DJ, Baum BJ. (2002) Tissue compatibility of two biodegradable tubular scaffolds implanted adjacent to skin or buccal mucosa in mice. *Tissue Eng*, 8: 649-659.
108. O'Dell NL, Sharawy M, Richardson MC, Pennington CB. (1987) Regeneration of submandibular gland autografts in sympathectomized rats. *Anat Rec*, 218: 373-379, 392-393.
109. Baum BJ. (2000) Prospects for Re-engineering Salivary Glands. *Advances in Dental Research*, 14: 84-88.
110. Nelson J, Manzella K, Baker OJ. (2013) Current cell models for bioengineering a salivary gland: a mini-review of emerging technologies. *Oral Dis*, 19: 236-244.
111. Fong P, Argent BE, Guggino WB, Gray MA. (2003) Characterization of vectorial chloride transport pathways in the human pancreatic duct adenocarcinoma cell line HPAF. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285: C433-445.
112. Baker OJ, Schulz DJ, Camden JM, Liao Z, Peterson TS, Seye CI, Petris MJ, Weisman GA. (2010) Rat parotid gland cell differentiation in three-dimensional culture. *Tissue Eng Part C Methods*, 16: 1135-1144.
113. Peters SB, Naim N, Nelson DA, Mosier AP, Cady NC, Larsen M. (2014) Biocompatible tissue scaffold compliance promotes salivary gland morphogenesis and differentiation. *Tissue Eng Part A*, 20: 1632-1642.
114. Leigh NJ, Nelson JW, Mellas RE, McCall AD, Baker OJ. (2014) Three-dimensional cultures of mouse submandibular and parotid glands: a comparative study. *J Tissue Eng Regen Med*: Epub ahead of print, PMID: 25186108
115. Pradhan S, Liu C, Zhang C, Jia X, Farach-Carson MC, Witt RL. (2010) Lumen formation in three-dimensional cultures of salivary acinar cells. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 142: 191-195.

116. Szlavik V, Szabo B, Vicsek T, Barabas J, Bogdan S, Gresz V, Varga G, O'Connell B, Vag J. (2008) Differentiation of primary human submandibular gland cells cultured on basement membrane extract. *Tissue Eng Part A*, 14: 1915-1926.
117. Vag J, Byrne EM, Hughes DH, Hoffman M, Ambudkar I, Maguire P, O'Connell BC. (2007) Morphological and functional differentiation of HSG cells: role of extracellular matrix and trpc 1. *J Cell Physiol*, 212: 416-423.
118. Pradhan-Bhatt S, Harrington DA, Duncan RL, Jia X, Witt RL, Farach-Carson MC. (2013) Implantable three-dimensional salivary spheroid assemblies demonstrate fluid and protein secretory responses to neurotransmitters. *Tissue Eng Part A*, 19: 1610-1620.
119. Maria OM, Maria O, Liu Y, Komarova SV, Tran SD. (2011) Matrigel improves functional properties of human submandibular salivary gland cell line. *Int J Biochem Cell Biol*, 43: 622-631.
120. Maria OM, Zeitouni A, Gologan O, Tran SD. (2011) Matrigel improves functional properties of primary human salivary gland cells. *Tissue Eng Part A*, 17: 1229-1238.
121. Pradhan S, Zhang C, Jia X, Carson DD, Witt R, Farach-Carson MC. (2009) Perlecan domain IV peptide stimulates salivary gland cell assembly in vitro. *Tissue Eng Part A*, 15: 3309-3320.
122. Limesand KH, Barzen KA, Sanders LA, Sclafani RA, Reynolds MV, Reyland ME, Anderson SM, Quissell DO. (2003) Characterization of rat parotid and submandibular acinar cell apoptosis in primary culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 39: 170-177.
123. Royce LS, Kibbey MC, Mertz P, Kleinman HK, Baum BJ. (1993) Human neoplastic submandibular intercalated duct cells express an acinar phenotype when cultured on a basement membrane matrix. *Differentiation*, 52: 247-255.
124. Turner JT, Redman RS, Camden JM, Landon LA, Quissell DO. (1998) A rat parotid gland cell line, Par-C10, exhibits neurotransmitter-regulated transepithelial anion secretion. *Am J Physiol*, 275: C367-374.

125. Quissell DO, Barzen KA, Redman RS, Camden JM, Turner JT. (1998) Development and characterization of SV40 immortalized rat parotid acinar cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 34: 58-67.
126. Onizawa K, Muramatsu T, Matsuki M, Ohta K, Matsuzaka K, Oda Y, Shimono M. (2009) Low-level (gallium-aluminum-arsenide) laser irradiation of Par-C10 cells and acinar cells of rat parotid gland. *Lasers Med Sci*, 24: 155-161.
127. Vasquez MM, Mustafa SB, Choudary A, Seidner SR, Castro R. (2009) Regulation of epithelial Na⁺ channel (ENaC) in the salivary cell line SMG-C6. *Exp Biol Med (Maywood)*, 234: 522-531.
128. Castro R, Barlow-Walden L, Woodson T, Kerecman JD, Zhang GH, Martinez JR. (2000) Ion transport in an immortalized rat submandibular cell line SMG-C6. *Proc Soc Exp Biol Med*, 225: 39-48.
129. Quissell DO, Barzen KA, Gruenert DC, Redman RS, Camden JM, Turner JT. (1997) Development and characterization of SV40 immortalized rat submandibular acinar cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 33: 164-173.
130. Sato M, Hayashi Y, Yoshida H, Yanagawa T, Yura Y, Nitta T. (1984) Search for specific markers of neoplastic epithelial duct and myoepithelial cell lines established from human salivary gland and characterization of their growth in vitro. *Cancer*, 54: 2959-2967.
131. Shirasuna K, Sato M, Miyazaki T. (1981) A neoplastic epithelial duct cell line established from an irradiated human salivary gland. *Cancer*, 48: 745-752.
132. Aframian DJ, Tran SD, Cukierman E, Yamada KM, Baum BJ. (2002) Absence of tight junction formation in an allogeneic graft cell line used for developing an engineered artificial salivary gland. *Tissue Eng*, 8: 871-878.
133. Delporte C, Steinfeld S. (2006) Distribution and roles of aquaporins in salivary glands. *Biochim Biophys Acta*, 1758: 1061-1070.
134. Aiba-Masago S, Masago R, Vela-Roch N, Talal N, Dang H. (2001) Fas-mediated apoptosis in a rat acinar cell line is dependent on caspase-1 activity. *Cell Signal*, 13: 617-624.
135. Okura M, Shirasuna K, Hiranuma T, Yoshioka H, Nakahara H, Aikawa T, Matsuya T. (1993) Characterization of growth and differentiation of normal

- human submandibular gland epithelial cells in a serum-free medium. *Differentiation*, 54: 143-153.
136. Quissell DO, Flaitz CM, Redman RS, Barzen KA. (1994) Primary culture of human labial salivary gland acini. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 30A: 736-740.
 137. Tran SD, Wang J, Bandyopadhyay BC, Redman RS, Dutra A, Pak E, Swaim WD, Gerstenhaber JA, Bryant JM, Zheng C, Goldsmith CM, Kok MR, Wellner RB, Baum BJ. (2005) Primary culture of polarized human salivary epithelial cells for use in developing an artificial salivary gland. *Tissue Eng*, 11: 172-181.
 138. Jang SI, Ong HL, Gallo A, Liu X, Illei G, Alevizos I. (2015) Establishment of functional acinar-like cultures from human salivary glands. *J Dent Res*, 94: 304-311.
 139. Maria OM, Tran SD. (2011) Human mesenchymal stem cells cultured with salivary gland biopsies adopt an epithelial phenotype. *Stem Cells Dev*, 20: 959-967.
 140. Patel VN, Rebutini IT, Hoffman MP. (2006) Salivary gland branching morphogenesis. *Differentiation*, 74: 349-364.
 141. Tucker AS. (2007) Salivary gland development. *Semin Cell Dev Biol*, 18: 237-244.
 142. Szlavik V, Vag J, Marko K, Demeter K, Madarasz E, Olah I, Zelles T, O'Connell BC, Varga G. (2008) Matrigel-induced acinar differentiation is followed by apoptosis in HSG cells. *J Cell Biochem*, 103: 284-295.
 143. Farach-Carson MC, Brown AJ, Lynam M, Safran JB, Carson DD. (2008) A novel peptide sequence in perlecan domain IV supports cell adhesion, spreading and FAK activation. *Matrix Biol*, 27: 150-160.
 144. Rajasekaran SA, Gopal J, Espineda C, Ryazantsev S, Schneeberger EE, Rajasekaran AK. (2004) HPAF-II, a cell culture model to study pancreatic epithelial cell structure and function. *Pancreas*, 29: e77-83.
 145. He X, Kuijpers GA, Goping G, Kulakusky JA, Zheng C, Delporte C, Tse CM, Redman RS, Donowitz M, Pollard HB, Baum BJ. (1998) A polarized salivary cell monolayer useful for studying transepithelial fluid movement in vitro. *Pflugers Arch*, 435: 375-381.
 146. <http://www.sigmaldrich.com/> letöltve: 2016.04.20.

147. Schonthal AH, Warren DW, Stevenson D, Schecter JE, Azzarolo AM, Mircheff AK, Trousdale MD. (2000) Proliferation of lacrimal gland acinar cells in primary culture. Stimulation by extracellular matrix, EGF, and DHT. *Exp Eye Res*, 70: 639-649.
148. Hiraki A, Shirasuna K, Ikari T, Shinohara M, Garrod DR. (2002) Calcium induces differentiation of primary human salivary acinar cells. *J Cell Physiol*, 193: 55-63.
149. Masters JR, Stacey GN. (2007) Changing medium and passaging cell lines. *Nat Protoc*, 2: 2276-2284.
150. Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*, 25: 402-408.
151. Bori E, Racz G, Burghardt B, Demeter I, Hegyesi O, Varga G, Foldes A. (2014) [ParC-10 cells for modelling parotid gland tissue reorganization]. *Fogorv Sz*, 107: 99-105.
152. Hegyesi O, Foldes A, Bori E, Nemeth Z, Barabas J, Steward MC, Varga G. (2015) Evidence for Active Electrolyte Transport by Two-Dimensional Monolayers of Human Salivary Epithelial Cells. *Tissue Eng Part C Methods*, 21: 1226-1236.
153. Bajaj P, Schweller RM, Khademhosseini A, West JL, Bashir R. (2014) 3D biofabrication strategies for tissue engineering and regenerative medicine. *Annu Rev Biomed Eng*, 16: 247-276.
154. Joraku A, Sullivan CA, Yoo JJ, Atala A. (2005) Tissue engineering of functional salivary gland tissue. *Laryngoscope*, 115: 244-248.
155. Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Abu-Helu RF, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. (2002) Establishment of a convenient system for the long-term culture and study of non-neoplastic human salivary gland epithelial cells. *Eur J Oral Sci*, 110: 21-30.
156. Elaut G, Henkens T, Papeleu P, Snykers S, Vinken M, Vanhaecke T, Rogiers V. (2006) Molecular mechanisms underlying the dedifferentiation process of isolated hepatocytes and their cultures. *Curr Drug Metab*, 7: 629-660.

157. Ishiguro H, Naruse S, San Roman JI, Case M, Steward MC. (2001) Pancreatic ductal bicarbonate secretion: past, present and future. *JOP*, 2: 192-197.
158. Ishiguro H, Steward MC, Wilson RW, Case RM. (1996) Bicarbonate secretion in interlobular ducts from guinea-pig pancreas. *J Physiol*, 495 (Pt 1): 179-191.
159. Marino CR, Jeanes V, Boron WF, Schmitt BM. (1999) Expression and distribution of the Na(+)-HCO⁻(3) cotransporter in human pancreas. *Am J Physiol*, 277: G487-494.
160. Lee MG, Ohana E, Park HW, Yang D, Muallem S. (2012) Molecular mechanism of pancreatic and salivary gland fluid and HCO₃ secretion. *Physiol Rev*, 92: 39-74.
161. Steward MC, Ishiguro H, Case RM. (2005) Mechanisms of bicarbonate secretion in the pancreatic duct. *Annu Rev Physiol*, 67: 377-409.
162. Schneyer LH. (1970) Amiloride inhibition of ion transport in perfused excretory duct of rat submaxillary gland. *Am J Physiol*, 219: 1050-1055.
163. Evans RL, Bell SM, Schultheis PJ, Shull GE, Melvin JE. (1999) Targeted disruption of the *Nhe1* gene prevents muscarinic agonist-induced up-regulation of Na(+)/H(+) exchange in mouse parotid acinar cells. *J Biol Chem*, 274: 29025-29030.
164. Novak I, Young JA. (1986) Two independent anion transport systems in rabbit mandibular salivary glands. *Pflugers Arch*, 407: 649-656.
165. Kim YB, Yang BH, Piao ZG, Oh SB, Kim JS, Park K. (2003) Expression of Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter and its role in pH regulation in mouse parotid acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 304: 593-598.
166. Alper SL, Chernova MN, Stewart AK. (2001) Regulation of Na⁺-independent Cl⁻/HCO₃⁻ exchangers by pH. *JOP*, 2: 171-175.
167. Boron WF. (2001) Sodium-coupled bicarbonate transporters. *JOP*, 2: 176-181.
168. Hong JH, Park S, Shcheynikov N, Muallem S. (2014) Mechanism and synergism in epithelial fluid and electrolyte secretion. *Pflugers Arch*, 466: 1487-1499.
169. Watson EL, Abel PW, DiJulio D, Zeng W, Makoid M, Jacobson KL, Potter LT, Dowd FJ. (1996) Identification of muscarinic receptor subtypes in mouse parotid gland. *Am J Physiol*, 271: C905-913.

170. Hedden L, Benes CH, Soltoff SP. (2011) P2X(7) receptor antagonists display agonist-like effects on cell signaling proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1810: 532-542.
171. Nakamoto T, Brown DA, Catalan MA, Gonzalez-Begne M, Romanenko VG, Melvin JE. (2009) Purinergic P2X7 receptors mediate ATP-induced saliva secretion by the mouse submandibular gland. *J Biol Chem*, 284: 4815-4822.
172. Ryu SY, Peixoto PM, Won JH, Yule DI, Kinnally KW. (2010) Extracellular ATP and P2Y2 receptors mediate intercellular Ca(2+) waves induced by mechanical stimulation in submandibular gland cells: Role of mitochondrial regulation of store operated Ca(2+) entry. *Cell Calcium*, 47: 65-76.
173. McMillian MK, Soltoff SP, Lechleiter JD, Cantley LC, Talamo BR. (1988) Extracellular ATP increases free cytosolic calcium in rat parotid acinar cells. Differences from phospholipase C-linked receptor agonists. *Biochem J*, 255: 291-300.
174. Kunzelmann K, Bachhuber T, Regeer R, Markovich D, Sun J, Schreiber R. (2005) Purinergic inhibition of the epithelial Na⁺ transport via hydrolysis of PIP₂. *FASEB J*, 19: 142-143.
175. Kunzelmann K, Schreiber R, Boucherot A. (2001) Mechanisms of the inhibition of epithelial Na⁽⁺⁾ channels by CFTR and purinergic stimulation. *Kidney Int*, 60: 455-461.
176. Nagy K, Szlavik V, Racz G, Ovari G, Vag J, Varga G. (2007) Human submandibular gland (HSG) cell line as a model for studying salivary gland Ca²⁺ signalling mechanisms. *Acta Physiol Hung*, 94: 301-313.

11. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

A doktori értekezés alapját képező közlemények:

Hegyesi O, Foldes A, Bori E, Nemeth Z, Barabas J, Steward MC, Varga G. (2015) Evidence for Active Electrolyte Transport by Two-Dimensional Monolayers of Human Salivary Epithelial Cells. *Tissue Eng Part C Methods*, 21: 1226-1236.

Bori E, Racz G, Burghardt B, Demeter I, Hegyesi O, Varga G, Foldes A. (2014) [ParC-10 cells for modelling parotid gland tissue reorganization]. *Fogorv Sz*, 107: 99-105.

Demeter I, Szucs A, Hegyesi O, Foldes A, Racz GZ, Burghardt B, Steward MC, Varga G. (2009) Vectorial bicarbonate transport by Par-C10 salivary cells. *J Physiol Pharmacol*, 60 Suppl 7: 197-204.

Demeter I, Hegyesi O, Nagy AK, Case MR, Steward MC, Varga G, Burghardt B. (2009) Bicarbonate transport by the human pancreatic ductal cell line HPAF. *Pancreas*, 38: 913-920.

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm a témavezetőmnek, Dr. Varga Gábornak, hogy már diákéveim alatt lehetőséget adott a kutatómunkába való becsatlakozásra. Szakmai irányítása nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el.

Köszönöm dr. Földes Annának és Martin. C. Stewardnak a rengeteg szakmai segítséget és támogatást.

Kegyelettel és hálával emlékezem Barabás Kornéliára, a Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetének munkatársára, aki megismertetett a sejttenyésztés alapjaival. Külön köszönet illeti dr. Burghardt Beátát, dr. Demeter Irmát és dr. Szlávik Vandát, akiktől a laboratóriumi kísérleti módszereket tanultam.

Köszönöm az Arc- Állcsont- Szájsebészeti és Fogászati Klinika orvosainak és dolgozóinak az együttműködést, különösen dr. Barabás Józsefnek, dr. Bogdán Sándornak, dr. Huszár Tamásnak, dr. Németh Zsoltnak és dr. Vaszilkó Mihálynak.

Köszönöm az Orálbiológiai Tanszék egykori és jelenlegi dolgozóinak a pótolhatatlan segítséget a kutatómunka és a dolgozat megírása során, különösen Bori Erzsébetnek, Jobbágy-Óvári Gabriellának, dr. Kádár Kristófnak, dr. Kerémi Beátának, dr. Rác Gábornak és dr. Szűcs Ákosnak. Hálával tartozom dr. Simon György Professzor Úrnak, hogy meggyőzött a kutatások fontosságáról és szépségéről és mindvégig mellettem állt mind szakmailag mind emberileg.

Végül köszönöm a Családomnak, hogy velem vannak és támogatnak az élet minden területén.