

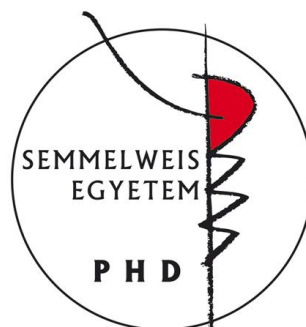
**KÉTDIMENZIÓS NYÁLMIRIGY MODELLEK AKTÍV,
TRANSZEPITELIÁLIS ELEKTROLIT TRANSZPORTJÁNAK
VIZSGÁLATA**

Doktori tézisek

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

BEVEZETÉS

A naponta képződő 1-1,5 liter nyál fontos szerepet játszik a táplálkozásban, beszédben és a szájüreg védelmében. A nyálmirigyekben a végkamra (acinus) az elektrolit- víz- és fehérje szekréció fő színtere. A ductusz sejtek ezzel szemben inkább abszorptív szerepet látnak el és vízzel szemben relatíve átjárhatatlanok. Egyes autoimmun betegségek, mint például a Sjögren szindróma, illetve a fej-nyaki daganatok sugárkezelése a nyálmirigyek acinus állományát permanensen károsítják. Ez a nyáaltermelés nagymértékű csökkenéséhez, szájszárazsághoz vezet, mely az életminőséget jelentősen rontja. A páciensek leggyakoribb panaszai a nehezített rágás, nyelés, beszéd; ezen kívül fokozódhat a fogszuvasodásra és fogágybetegségre való hajlam és növekszik az orális infekciók veszélye is. A szájszárazság tartós, oki kezelése nem megoldott. Az utóbbi években ígéretes terápiás eljárások jelentek meg, melyek célja a károsodott acináris tulajdonságok helyreállítása. Ilyen például a regeneráció őssejtek segítségével, a károsodásokra kevésbé érzékeny ductusz sejtek átalakítása génterápiával, új farmakológiai eljárások kifejlesztése illetve a szövetépítés, a „mesterséges nyálmirigy” létrehozása. Ezen kutatások során a szekréciós működés *in vitro* modellezése nagy segítséget nyújthat. Jelenleg acináris karakterű, modellezésre alkalmas emberi nyálmirigy sejtenyészetek nem állnak rendelkezésre. A HSG humán nyálmirigy sejtvonal nem képes szoros sejtkapcsoló struktúrákat (tight junction) kialakítani, mely az epitheliális szekréció alapja, illetve nem képes szabályozott víztranszportra sem. Az emberi nyálmirigyből izolált primer sejtek, a PTHSG és a huSMG az irodalmi adatok alapján ductális fenotípusúnak mutatkoznak, azonban a sejtek elektrolit szekréciójának jellemzésére ez idáig nem került sor.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Primer sejtenyészet, majd polarizált monolayerek létrehozása humán szubmandibuláris nyálmirigyből, valamint az izolálási és tenyésztési körülmények optimalizálása sejtkultúra 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 sejtvonalak alkalmasak-e zárt monolayer kialakítására és transzepiteliális transzport folyamatok funkcionális vizsgálatára. A sejtvonalakon 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?

MÓDSZEREK

Izolálás és sejtenyésztés. Mindegyik sejttípus tenyésztése standard körülmények között történt, vagyis 37°C-on, párasított, 5% CO₂-dal dúsított levegőt tartalmazó tenyésztőszekrényben. A Par-C10 (patkány parotisz eredetű acináris) sejteket DMEM-F-12 tápoldatban tenyésztettük, melyet retinsavval, trijód-tironinnal, és hidrokortizonnal egészítettünk ki. Az HPAF (humán hasnyálmirigy eredetű duktális) sejtek tenyésztéséhez MEM tápoldatot használtunk, kiegészítve nem esszenciális aminosavakkal és Na⁺-piruváttal. A SMIE (patkány szubmandibuláris nyálmirigy eredetű) sejt vonalat DMEM tápoldatban tenyésztettük. A PTHSG és a huSMG primer sejteket nyaki disszekció műtéten átesett páciensektől származó szubmandibuláris nyálmirigy mintákból izoláltuk (etikai engedély száma: 67/2005) Tran és mtsai (huSMG), valamint Szlávik és mtsai (PTHSG) által leírt protokollok módosításával. A vizsgálatba bevont páciensek (49 fő, életkor: 40-86 év) előzetesen sem radio- sem kemoterápiában nem részesültek, nyálmirigyükben daganatot nem találtak és nem szenvedtek semmilyen nyálmirigy betegségben, rendellenességben. A nyálmirigy darabok mechanikai tisztítás után szekvenciális enzimatis emésztési folyamaton mentek át. A kész sejtszuszpenziót Hepato-STIM tápoldatban egy éjszakán át inkubáltuk. Másnap a felülúszót átöntöttük egy másik tálkába. A lassabban letapadó epiteliális jellegű sejtek alkotják a huSMG sejt kultúrát, a PTHSG sejt kultúrában pedig gyorsan letapadó fibroblasztszerű és nem letapadó sejtek egyaránt megtalálhatók. A sejtenyésztés során összehasonlítottuk két tápoldat, a Hepato-STIM és MEM hatását a sejtek növekedésére és a monolayer kialakulására. A tápoldatokat hetente háromszor csak részlegesen cseréltük azért, hogy a sejtek által termelt autokrin és parakrin faktorokat megőrizzük. A sejteket 80%-os konfluencia elérésekor (5-6 nap után) passzáltuk. A funkcionális vizsgálatokhoz az 1-3. számú passzázból származó sejteket használtuk. Polarizált, konfluens monolayer

létrehozása céljából mindegyik sejttípust Transwell Clear poliészter membránra ültettük ki. A transzepiteliális rezisztenciát (TER) EVOM készülékkel naponta ellenőriztük.

Génexpresszió vizsgálata. Az acináris marker *NKCC1*, *AMY1A* (amiláz), *AQP5* és dukális marker *ENaC*, valamint a *CLDN1* (claudin-1) mRNA expresszióját RT-PCR-rel vizsgáltuk a natív nyálmirigy mintában, valamint a plastik Petri tenyésztőedényben és a Transwell membránon növő sejtekben. Az RNS izoláláshoz TRI Reagent-et használtunk. A sejt kultúrából a teljes RNS-t a NucleoSpin RNA II kit segítségével vontuk ki a gyártó utasítása szerint. Az RNS koncentráció mérését NanoDrop spektrofotométerrel végeztük, az RNS minőségét gélelektroforézissel ellenőriztük. Ezután egy μg -ot a legjobb minőségű RNS mintákból kivettünk és a High-Capacity RNA-to-cDNAMasterMix segítségével cDNS-sé alakítottuk a kvantitatív vizsgálatokhoz. Az RT-qPCR ampifikációhoz az ABI StepOne készüléket és a TaqMan próbát használtunk. A vizsgálatokban a RPLP0 housekeeping gén szerepelt, a génexpresszió számításához a $\Delta\Delta\text{CT}$ módszert használtuk.

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 m^2 monolayerre lettek normalizálva, mértékegysége U/l 1 óra alatt.

Rövidzárlati áram mérése. A transzepiteliális transzportfolyamatokat rövidzárlati áram (I_{sc}) mérésével vizsgáltuk. A Transwell membránon létrejött konfluens monolayereket egy módosított Ussing kamrába helyeztük. A monolayerek bazolaterális és apikális oldalát

folyamatosan perfundáltattunk a kiválasztott összetételű pufferoldattal, 2 ml/perc sebességgel. A transzepteliális potenciálkülönbséget (V_m) Ag/AgCl elektródokon és agaróz-KCl hidakon keresztül mértük. Az I_{sc} mérése során a transzepteliális potenciálkülönbséget 0 mV-ra állítottuk be (feszültségzár, voltage clamp). Az ehhez szükséges áram mennyisége a rövidzárlati áram. A feszültségzárát közvetlenül a pufferoldatokba merített Ag/AgCl elektródokkal hoztuk létre, az elektródok egy epteliális voltage clamp erősítőhöz kapcsolódtak. 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}), mely az agonista adása után mért csúcs és az alapvonal közötti különbséggel egyenlő.

Statisztika. Az adatok formátuma: átlag \pm SEM. 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, ott nem parametrikus teszteket használtunk.

Szignifikancia szintek: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

EREDMÉNYEK

A felhasznált sejtek és primer tényezetek jellemzése, molekuláris vizsgálata

A PTHSG és a huSMG sejt kultúra Hepato-STIM tápoldatban tenyésztve mikroszkóposan a Par-C10 sejtekhez hasonló, epitél jellegű sejtszigeteket hozott létre, melyeket fibroblasztszerű vékony sávok választottak el egymástól. A huSMG sejteknél a kiültetést követő napokban a PTHSG-hez képest lényegesen több nem, vagy csak részlegesen letapadt sejtet, sejtaggregátumot figyeltünk meg, melyek a passzálások során fokozatosan eltűntek. A MEM tápoldatban tenyésztett sejteknél kezdetektől több fibroblaszt jellegű sejtet láttunk, melyek jelenléte fokozatosan dominánssá vált a tényezetekben. A 4. passzálás után (3-4 hét elteltével) a fibroblaszt sejtek Hepato-STIM tápoldatban is fokozatosan túlnőtték az epitélsejteket.

A szoros kapcsolatok (tight junction) kialakulásával létrejött zárt, polarizált monolayer a normális epiteliális folyadék- és elektrolitszekréció alapja. A transzepiteliális rezisztencia nemcsak a sejttényészet folytonosságáról, hanem a paracelluláris permeabilitásról is képet ad, mivel a kialakuló sejtkapcsolatok gátolják az extracelluláris ionmozgást. A Hepato-STIM médiumban tenyésztett sejtek a membránra való kiültetés után 6-7 nappal érték el a TER maximumát (PTHSG: $595 \pm 93 \Omega \text{cm}^2$, $n=55$; huSMG: $622 \pm 117 \Omega \text{cm}^2$, $n=45$). 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. Ehhez hasonlóan alacsony TER értékeket produkált a SMIE sejtvonal is (TER=150-180 Ωcm^2). A primer sejteknél a kondicionált Hepato-STIM médium használata gyorsabb növekedést és magasabb TER értékeket eredményezett.

Az általunk kiválasztott öt különböző marker fehérje mRNA expressziójának változását a sejt kultúra 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 sejt kultúrában egyaránt kimutatható volt. A primer sejttenyészetekben 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 sejt kultúrákban a dukális 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. Amiláz aktivitás mind a plasztikon, mind a Transwell membránon tenyésztett PTHSG és huSMG sejttenyészeteknél 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). Összefoglalva tehát 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. A polarizáció során a sejtek acináris fenotípusa kismértékben erősödött.

Funkcionális vizsgálatok

A SMIE sejtek nem képesek zárt monolayer szerkezet kialakítására, mely az Ussing kamrában való vizsgálat alapvető feltétele. 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 $50 \mu\text{M}$ 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 PTHSG és a huSMG sejt kultúrában 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 a bazális áramot jelentősen csökkenti, de teljesen nem szünteti meg. Azt feltételeztük, hogy a fennmaradó ionáram a duktális Na^+ reabszorpció eredménye, mely a duktusz sejtek apikális oldalán található epiteliális nátrium csatornán (ENaC) keresztül megy végbe. Az ENaC szelektíven gátolható kis koncentrációjú ($10 \mu\text{M}$) amiloriddal. 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 duktális transzport mechanizmusok jelen vannak. 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 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) emelkedéshez vezet. Az ATP szintén az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -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 $100 \mu\text{M}$ bazolaterálisan adott carbachol, mind az $50 \mu\text{M}$ apikálisan adott ATP szignifikánsan növelte az I_{sc} mértékét, míg a $10 \mu\text{M}$ koncentrációjú forskolin apikális adása az I_{sc} értékét szignifikánsan nem változtatta meg. A legnagyobb stimuláló hatást az ATP eredményezte. A beadást követően 2 percen belül az I_{sc} egy csúcserőértékét 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 HCO_3^- elvonása önmagában nem, míg a HCO_3^- és a Cl^- együttes megvonása 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 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. A két érték csak gyenge kapcsolatban áll egymással, melynek oka az, hogy a TER érték a sejtek közötti sejt-kapcsoló struktúrák állapotáról és így a paracelluláris permeabilitásról ad képet, ami közvetlenül a transzcelluláris aktív transzport folyamatokat nem befolyásolja.

A bazolaterális oldal transzportereit a PTHSG kultúrán vizsgáltuk. 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 plasztik 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 kloridion felvétel fő útját, az $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ kotranszporter NKCC1-et szelektíven gátoltuk 100 μM bumetaniddal. 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. Bikarbonátionok 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 μM 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 szekréciónak utal, mely jelenthet HCO_3^- szekréciónak vagy HCO_3^- függő Cl^- szekréciónak is.

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. Ez a transzporter rendszer része lehet az előzőekben említett bikarbonátfüggő klorid szekréciónak és egyben a bikarbonát bazolaterális felvételét is 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 μM H_2DIDS) és az NHE1-et (30 μM EIPA), mely a bazális I_{sc} -t kb 20 %-kal csökkentette. Az ENaC gátlása további I_{sc} csökkenést eredményezett, de az ionáram teljesen nem szűnt meg. A kloridionok elvonása önmagában az ATP hatását szignifikánsan nem csökkentette ($\Delta I_{\text{sc}}=5,35\pm 0,71$; $n=9$ Cl^- -tartalmú pufferben és $\Delta I_{\text{sc}}=4,66\pm 0,40$; $n=12$ Cl^- -mentes pufferben). Az EIPA és a H_2DIDS együttes adása azonban az ATP által létrehozott ΔI_{sc} -t közel 50 %-kal csökkentette kloridmentes 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 HCO_3^- szekréciónak eredménye és ez az útvonal a kloridionok jelenlététől függetlenül működik.

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 epitél jellegű 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 szelektív 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 vektoriális elektrolitszekréciója.
4. A Hepato-STIMben tenyésztett PTHSG és huSMG monolayerek képesek voltak vektoriális elektrolittranszportra.

- a. A teljes transzepiteliális ionmozgást a bazolaterálistól apikális irányba mutató HCO_3^- és Cl^- transzport és az apikálistól bazolaterális irányba mutató Na^+ -áram együttesen hozta létre.
- b. A transzepiteliális 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 ionszekrécióra, így alkalmasak a nyálmirigy működés kétdimenziós modellezésére

PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

A doktori értekezés alapját képező közlemények:

Hegyesi O, Foldes A, Bori E, Nemeth Z, Barabas J, Steward MC, Varga G

Evidence for Active Electrolyte Transport by Two-Dimensional Monolayers of Human Salivary Epithelial Cells.

TISSUE ENGINEERING PART C METHODS 21:(12) pp. 1226-1236. (2015); IF: 4,25

Bori E, Rácz G, Burghardt B, Demeter I, Hegyesi O, Varga G, Földes A

Par-C10 sejtek a parotis szöveti szerveződésének modellezésére

FOGORVOSI SZEMLE 107:(3) pp. 99-105. (2014)

Demeter I, Szucs A, Hegyesi O, Foldes A, Racz GZ, Burghardt B, Steward MC, Varga G

Vectorial bicarbonate transport by Par-C10 salivary cells.

JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY 60:(Suppl 7) pp. 197-204. (2009); IF: 1,489

Demeter I, Hegyesi O, Nagy Á K, Case M R, Steward M C, Varga G, Burghardt B

Bicarbonate transport by the human pancreatic ductal cell line HPAF

PANCREAS 38:(8) pp. 913-920. (2009); IF: 2,733