

Az amelogenezisben fontos pH szabályozási mechanizmusok és a szoros sejtkapcsolatok kialakulásának vizsgálata funkcionális *in vitro* modellben

Doktori tézisek

Rácz Róbert Balázs

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Varga Gábor, DSc., egyetemi tanár
Dr. Kerémi Beáta, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Venglovecz Viktória, Ph.D., tud. főmunkatárs
Dr. Köles László, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Fábrián Tibor[†], Ph.D, professor emeritus

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Rakonczay Zoltán, DSc, professor em.

Dr. Darvas Zsuzsa[†], Ph.D, egyetemi docens

Budapest
2020

BEVEZETÉS

A fogzománc az emberi test legkeményebb struktúrája, közel 97% mineralizációs fokkal, amely fő szervetlen alkotója a kalcium-foszfát (hidroxiapatit). Egy többlépcsős folyamatban alakul ki a fogfejlődés során epithelialis és ecto-mesenchymalis sejtcsoportok reciprok interakcióinak hatására. A zománcérés folyamatai morfológiai, hisztológiai szinten jól ismertek, de a kristályképződés szabályozása, a háttérben álló pontos molekuláris mechanizmusok még jórészt ismeretlenek.

A belső zománcchámból származó, magasan specializált ameloblaszt sejtek irányítják a zománcérést. Fő feladatuk a mátrixfehérjék szekréciója és a zománcalkotó ásványi anyagok transzportja, köztük is kiemelten a kalcium transzcelluláris transzportja. **Az amelogenezist két fő funkcionális szakaszra bonthatjuk.** A **szekréciós szakaszban** egy kevésbé mineralizált, proteinekben gazdag mátrixállománnyal a zománc teljes magasságában kialakul. Az **érés szakaszban** a szerves állomány szinte teljesen felszívódik, az ásványi alkotók intenzív transzportja és mineralizációja, a zománc kristályok vastagságban növekedése történik.

A kalcium- és foszfát-transzporton kívül a **pH szabályozásnak** is központi jelentősége van a zománcérés során, ugyanis a

hidroxiapatit kristályok képződése nagy mennyiségű proton felszabadulásával jár, amely semlegesítéséhez bikarbonát-ionok szekréciója szükséges (Racz et al, 2018). A pH szabályozásban érintett egyes transzporterek fontos szerepét bizonyítja az is, hogy bizonyos knock-out (KO) egér modellek jelentős zománcfejlődési defektust mutatnak. Továbbá az érési fázis alatt kiemelt fontosságú a **pH moduláció** jelensége. Ennek során kétféle érési stádiumú ameloblaszt sejthalak, a sima és fodros felszínű formák meghatározott periódussal váltják egymást, egymásba átalakulnak, és ennek megfelelően váltakozó neutrális és savas zománc zónákat eredményeznek. A ciklus során nagyon fontos a kétféle sejtforma között a szoros kapcsolati (TJ - tight junction) struktúrák átrendeződése a proximális elhelyezkedésből disztálisba, majd vissza (Varga et al, 2018). A szoros sejtkapcsolatok nem hermetikusan zárják le az intercelluláris teret, rajtuk bizonyos ionok passzív, de szelektív áramlása lehetséges (paracelluláris transzport). Az utóbbi évtized felismerései szerint ez nem egy statikus képződmény, inkább egyfajta dinamikus ioncsatornaként működik, amely az ionok töltése és mérete szerinti szelektivitást tesz lehetővé. Ezt elsősorban a klaudin fehérjék összetétele határozza meg, de a paracelluláris transzportról ameloblasztokban még csak nagyon kevés információval rendelkezünk.

Az amelogenezis szekréciós folyamatainak **szabályozásáról** még szintén nagyon keveset tudunk. Egy-egy közlemény utal a szteroid hormon (pl. androgén és ösztrogén) receptorok, az extracelluláris ATP (purinerg receptorok), a kalciumérzékelő receptor, illetve bizonyos G-fehérje kapcsolt receptorok (pl. CCK, GRP, PACAP receptorai) fontosságára (Varga et al, 2018), de tényleges szerepük felderítéséhez funkcionális vizsgálatokra lenne szükség.

Az amelogenezis genetikai (amelogenesis imperfecta) és környezeti **zavarai** nemcsak fontos információkat szolgáltatnak a zománcképződésben nélkülözhetetlen transzporterek, ioncsatornák és szabályozó molekulák szerepéről, de a folyamatok pontosabb megismerése a különféle zománc hipomineralizációs zavar (pl. dentális fluorózis) elleni védekezésben is új utakat nyithatnak.

Ezeknek a transzport- és szabályozó folyamatoknak a felderítése céljából hoztunk létre az elmúlt években a tanszéken egy **funkcionális vizsgálatokra alkalmas 2D in vitro modellt**. Ennek központi eleme a permeábilis poliészter membránra (Transwell) ültetett és differenciáltatott ún. HAT-7 sejtek. A HAT-7 sejtek egy dentális epithelialis sejtvonal, amit 6 napos patkány metszőfog cervikális hurok („cervical loop”) régiójából, az ameloblaszt sejtek őssejt rezervoárjából izoláltak, és hoztak létre spontán immortalizációval Dr. Hidemitsu Harada és munkatársai. A modell

megfelel azoknak a feltételeknek, amelyeket egy epitheliális transzportfolyamatokat vizsgáló modellnek teljesítenie kell: a szorosan zárt sejtréteg kialakulása és a szoros sejtkapcsolatok kiépülése, amelyek lehetővé teszik a paracelluláris és irányított transzcelluláris transzportfolyamatok megvalósulását, ugyanis megakadályozzák az apikális (AP) és bazolaterális (BL) membrándomének keveredését.

Modellünk funkcionális polarizáltságát munkacsoportunk egy 2016-os közleményében bizonyította (Bori et al, 2016). Immunocitokémiai és PCR vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a HAT-7 sejtek számos ameloblaszt jellegzetességet mutatnak, például az amelogenin, ameloblasztin fehérjék és a kallikrein-4 (Klk4) és amelotin érési ameloblaszt markerek, valamint jellemző ion transzporterek és szoros kapcsolati fehérjék expresszióját. A permeábilis membránokon növesztett HAT-7 sejtréteg magas transzépítél rezisztenciát ér el, és a vektoriális (BL-AP irányú) HCO_3^- transzport kialakulását teszi lehetővé (Bori et al, 2016).

CÉLKITŰZÉSEK

A HAT-7 patkány ameloblaszt sejtvonal felhasználásával létrehoztunk egy *in vitro* modellt, hogy tanulmányozhassuk az amelogenezishez kapcsolódó iontranszport folyamatokat (Bori et al, 2016). Korábbi vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a sejtek a jellemző ameloblaszt markereket expresszálják, membránra ültetve szoros kapcsolatokat alakítanak ki és funkcionális szempontból polarizáltak, továbbá vektoriális HCO_3^- szekrécióra képesek (Bori et al, 2016). A továbbiakban szeretnénk volna megvizsgálni, hogy az ameloblaszt sejtek milyen molekuláris mechanizmussal rendelkeznek a pH szabályozás és a HCO_3^- transzportjának végrehajtására.

1) Ezért célul tűztük ki a HAT-7 sejtekben az intracelluláris pH-szabályozást befolyásoló **bazolaterális transzporterek funkcionális azonosítását:**

- a) van-e a sejtekben a bikarbonát intracelluláris akkumulációját biztosító nátrium-proton cserélő aktivitás
- b) detektálható-e a bikarbonát közvetlen transzportját ellátni képes elektrogén nátrium-bikarbonát kotranszporter aktivitása

- c) van-e a sejtekben a bikarbonát transzportjához nélkülözhetetlen klorid-ion utánpótlását biztosító nátrium-kálium-klorid kotranszporter aktivitás
- d) kimutatható-e a sejtekben a bikarbonát- és klorid-ionok elektroneutrális cseréjét végző anion-cserélő aktivitás

A HAT-7 sejtés *in vitro* modell alkalmas lehet a fluorózishoz köthető néhány mechanizmus vizsgálatához: a fluorid sejtpusztulást okozó közvetlen citotoxikus hatásai, hatása a zárt barrier kialakulásához szükséges szoros sejtkapcsolatok kialakulására, és a fluorid közvetlen gátló hatása a vektoriális kalcium- és/vagy bikarbonát-transzportra. Ezért célul tűztük ki annak felderítését, hogy

- 2) az akut **fluorid** expozíció zavarja-e a transzporterek bazolaterális-apikális irányú **HCO₃⁻-transzportot** lehetővé tevő képességét, és
- 3) hogy megvizsgáljuk a fluorid hatását a HAT-7 sejtek **életképességére**, továbbá
- 4) hogy van-e valamilyen hatása a fluoridnak a polarizált sejtek **transzepiteliális rezisztenciájára**, a **szoros sejtkapcsolatok** kialakulására és a szoros sejtkapcsolati fehérjék génexpressziójára.

MÓDSZEREK

Sejtenyésztés és a polarizált sejtmodell előállítása

A HAT-7 sejteket 10% foetalis borjúséríummal (FBS) és penicillin/streptomycin mixxel kiegészített DMEM/F12-Ham médiumban tenyésztettük 5% CO₂ és fenntartott páratartalom mellett, 37°C-on, inkubátorban. A sejtek differenciáltatásához, Transwell membránokon való tenyésztéséhez ezt az alap tápoldatot egészítettük ki CaCl₂-dal (2,1 mM végkoncentrációban), és 10⁻⁵ mM dexametazonnal (differenciáló táp).

A sejteket Transwell membránra ültetve, és differenciáló tápoldatban növesztve egy zárt monolayert hoztunk létre, ilyen módon a membrán két oldalán az AP és BL térfél külön perfundálható, vizsgálható.

A transzeptél elektromos rezisztencia követése

A szoros sejtkapcsolatok kialakulását, a sejt monolayer zártságát a sejtréteg transzeptél elektromos rezisztenciájának (TER) mérésével ellenőriztük. A Transwell membránon növesztett HAT-7 sejtek TER értékeit az epithelialis volt-ohm méter készülékkel (EVOM) követtük, naponta mérve, 5 napon keresztül a mikrofluorometriás mérések előtt, illetve a nátrium-fluoridos (NaF) kezelések alatt.

A TER értékek időbeli követése végső soron a sejtréteg töltéssel rendelkező molekulákkal, elektrolitokkal szembeni paracelluláris permeabilitásáról, és az ezzel közvetlen összefüggésben lévő szoros kapcsolatok kialakulásáról ad információt, amely sejtkapcsolatok a szekréción és abszorpciós feladatokat ellátó epitélisejtek kulcsfontosságú struktúrája.

A többnapos fluorid expozíciós kísérletekben a sejtkiültetés után 24 órával a Transwell membránokon a médiumot lecseréltünk 0 (kontroll); 0,3; 0,6; illetve 1mM NaF-tartalmú médiumra.

Mikrofluorometria

A valós időben történő intracelluláris pH (pH_i) változásokat mikrofluorometriával a pH-érzékeny fluoreszcens indikátor BCECF-AM segítségével monitoroztuk. A festéket a mérésekhez ratiometrikus módon használtuk, azaz két különböző (490nm és 440nm hullámhosszú) gerjesztési fényre adott, 530nm-en detektált, pH-függő (F490) és pH-független (F440) fluoreszcencia intenzitásokat vizsgáltuk. A F490/F440 hányadossal kiküszöbölhetjük az eltérő töltődésből, festék koncentrációból, ürülésből és a "photobleaching"-ből eredő hibákat. A hányadosból az ún. nigericin/magas-kálium módszerrel, kalibrációval határoztuk meg a tényleges pH_i értékeket. A mérőkamrában a

membránra ültetett sejtréteg két oldalán különböző oldatokat áramoltattunk, és a transzporterek aktivitását a külső oldatok megfelelő összetételével és specifikus inhibitorokkal tanulmányoztuk.

A pH szabályozásért felelős transzporterek vizsgálatához az ún. ammónium-pulzus technika során 20mM NH_4Cl tartalmú külső oldat segítségével jelentős intracelluláris savasodást/alkalizációt idéztünk elő („acid/base loading”), hogy a pH_i helyreállítására irányuló, beinduló kompenzációs mechanizmusok, transzporter aktivitások részvételét tanulmányozhassuk.

A transzportfolyamatok szempontjából fontos, gradienst meghatározó ionok (Na^+ és Cl^-) extracelluláris megvonásával is tanulmányoztuk az egyes, pH kompenzációban részt vevő transzporterek szerepét.

Az anion cserélők blokkolásához 100 μM DIDS-et (4,4'-diizotiocianatostilbén- 2,2'-diszulfonsav), a Na^+/H^+ cserélők gátlásához 300 μM amiloridot, a $\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^{3-}$ kotranszporter gátlásához 500 μM H_2DIDS -et, és az NKCC gátlásához 100 μM bumetanidot használtunk. A bikarbonát szekréción transzportfolyamatok stimulálása érdekében 50 μM ATP-t használtunk az intracelluláris kalcium-szint emelésére, míg 10 μM

forskolint és 500 μ M IBMX-et (3-isobutyl-1-methylxanthine) az intracelluláris cAMP-szint emelésére.

Sejtéletképesség teszt

A fluoridos kezeléseket 24 órával a sejtkiültetés után kezdtük meg, majd 48 és 96 óra kezelés után a sejtek metabolikus aktivitását az AlamarBlue esszé (Thermo Scientific) segítségével határoztuk meg az 590nm-en mért fluoreszcencia intenzitások mérésével.

Kvantitatív RT-PCR vizsgálat

A szoros kapcsolati fehérjék expressziójának vizsgálatát kvantitatív real-time PCR módszerrel végeztük. A kontroll és fluorid tartalmú médiumokban növesztett sejtekből teljes sejt RNS-t izoláltunk, ennek 1-2 μ g-jából cDNS-t írtunk, amely amplifikációját az ABI StepOne készülékkel végeztük előregyártott primerekkel (AppliedBiosystems). Belső kontrollként az ún. acidic ribosomal protein P0-t (Rplp0) használtuk.

Statisztikai analízis

Két csoport összehasonlításához kétmintás t-próbát használtunk, több csoporthoz egyszempontos variancia-analízist illetve ismételt méréseket variancia-analízist, Dunnett post-hoc teszttel. A TER értékek összehasonlításához nem-parametrikus Kruskal-Wallis tesztet használtunk Dunn post-hoc teszttel.

EREDMÉNYEK

A HAT-7 sejtek intracelluláris pH szabályozásában szerepet játszó fő bazolaterális transzporterek

2016-os közleményünkben bizonyítékkal szolgáltunk arra, hogy a Transwell membránon differenciált HAT-7 ameloblaszt sejtek polarizált, zárt sejtréteget alkotnak, és vektoriális, bazolaterális-apikális irányú bikarbonát transzportra képesek (Bori et al., 2016), de a pH szabályozásért felelős egyes transzporterek lokalizált aktivitását nem vizsgáltuk.

a) Nátrium-proton cserélő aktivitás a bazolaterális oldalon

Az ammónium-pulzus technika, azaz 20mM NH_4Cl tartalmú mérőoldat rövid ideig tartó perfúziója segítségével jelentős intracelluláris acidifikációt érhetünk el a HAT-7 sejtekben, így a pH_i savterhelésből való helyreállításának sebességét mikrofluorimetriás módszerrel mérve vizsgálhatjuk a pH kompenzációban szerepet játszó transzportereket. $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -mentes HEPES oldatban vizsgálva, a külső Na^+ ionok mindkét oldali megvonása az ammónium pulzus után teljes mértékben blokkolta a sejtek pH_i helyreállítási képességét, ami arra utal, hogy Na^+ -függő transzporterek felelősek az acidifikáció utáni pH emelkedésért. A Na^+ visszaadása a bazolaterális oldalon a

pH_i gyors emelkedését, helyreállítását okozta, ami 300μM amiloriddal nagymértékben gátolható volt (p<0,05 vs. kontroll), bazolaterális nátrium-proton cserélő aktivitásra utalva. Az NHE1 izotípus jelenlétét erősíti, hogy egy erre az izotípusra nagyobb specifitással rendelkező inhibitor, a kariporid használatával szintén szignifikáns gátlást tudunk kimutatni (a Transwell membránon növesztett HAT-7 sejtek savterhelés utáni pH kompenzációs képességében).

b) Nátrium-bikarbonát kotranszporter aktivitás a bazolaterális oldalon

Az ammónium-pulzus technikát HCO_3^-/CO_2 tartalmú HEPES oldatban alkalmazva, az ammónium-pulzus utáni Na⁺ kétoldali megvonása szintén gátolta a pH_i kompenzációját. Ez arra utal, hogy a pH szabályozásban résztvevő bikarbonát transzporterek Na⁺-függőek. A bazolaterális oldali Na⁺ visszaadására gyors pH_i emelkedés történt, ami részlegesen gátolható volt 300μM amiloriddal (p<0,05 vs. kontroll). A nátrium-bikarbonát kotranszporter inhibitor H₂DIDS (500μM) a kompenzáció további szignifikáns gátlását eredményezte (p<0,05 vs. amilorid egyedül), tehát HAT-7 sejtekben a pH kiegyenlítő mechanizmusokban mind az NBCe1 által közvetített bikarbonát felvételnek, mind az NHE1 által közvetített H⁺ leadásnak szerepe lehet.

c) Nátrium-kálium-klorid kotranszporter aktivitás a bazolaterális oldalon

A szakirodalomban ismert, hogy a nátrium-kálium-klorid kotranszporter (NKCC1) a K^+ helyén képes NH_4^+ transzportjára is, továbbá az NH_3 szabadon átjut a sejtmembránon, ezért az ammónium-pulzus technika alkalinizációs szakasza alkalmas az NKCC1 vizsgálatára. A 20 mM NH_4Cl -dal való expozíció alatt megindul a sejtekben egy pH kompenzációs mechanizmus, amely acidifikációs folyamatért részlegesen az NH_4^+ felvétele lehet felelős. *HCO₃⁻/CO₂ tartalmú* HEPES oldatban HAT-7 sejtekben az NKCC1 inhibitor bumetanid (100 μ M) bazolaterális alkalmazása, szignifikánsan csökkentette az ammónium expozíció alatti lassú acidifikáció sebességét ($p < 0,05$ vs. kontroll). Ez a NKCC1 jelenlétére utal HAT-7 sejtekben, ami konzisztens korábbi RT-PCR adatainkkal (Bori et al., 2016).

d) Anion-cserélő aktivitás a bazolaterális oldalon

A bazolaterális Cl^- megvonás *HCO₃⁻/CO₂ tartalmú* HEPES oldatban egy szignifikáns pH_i emelkedést okozott a HAT-7 sejtekben a megfordult gradiens következtében HCO_3^- beáramlás eredményeként. Ez az emelkedés szignifikánsan gátolhatóan bizonyult az anion cserélő inhibitor DIDS (100 μ M)

alkalmazásával ($p < 0.05$ vs. kontroll), ami egy anion cserélő (valószínűleg az AE2) bazolaterális jelenlétére utal a HAT-7 ameloblaszt sejtekben.

Az akut fluorid expozíció hatása a HAT-7 sejtek bikarbonát szekréciójára

A sejtek szekréciójához elengedhetetlenek a bikarbonát intracelluláris akkumulációját eredményező folyamatok. Ezt alapvetően két fontos mechanizmus láthatja el: a bazolaterális membránon keresztüli direkt bikarbonát felvétel (az NBCe1 által megvalósított szimport folyamaton keresztül), illetve a CO₂ diffúziója a sejtekbe majd a szénsavanhidrázok katalizálta szénsav disszociációja HCO₃⁻ és H⁺ ionokra, és ezt kísérően a H⁺ ionok extrúziója (elsődlegesen a nátrium-proton cserélő NHE1 által megvalósított antiport folyamaton keresztül), amely szintén a bikarbonát ionok intracelluláris növekedését okozza.

2016-os közleményünkben leírtuk, hogy ha a HCO₃⁻ bazolaterális oldali felvételét, intracelluláris akkumulációját gátoljuk az NBCe1 és NHE1 transzporterek inhibitoraival a Transwell membránon növesztett HAT-7 sejtekben, a folytatódó apikális HCO₃⁻ efflux egy lassú intracelluláris acidifikáció formájában mikrofluorometriával detektálható, és hogy ez az alap szekréció

jelentősen fokozható Ca^{2+} - és cAMP-mobilizáló stimulátorokkal (Bori et al., 2016).

Ezt a stimulált HCO_3^- szekréciót jellemző kezdeti acidifikációs rátát használtuk annak tesztelésére, hogy vajon az akut fluorid expozíció közvetve vagy közvetlenül hatással van-e a vektoriális bikarbonát transzportra HAT-7 sejtekben. Eredményeink azt mutatják, hogy a fluorid, a 0,03–1 mM koncentráció tartományban akut módon adva nem volt hatással az 50 μM ATP, 10 μM forskolin, és 500 μM IBMX együttes adásával stimulált bikarbonát szekrécióra.

A fluorid hatása a HAT-7 sejtek életképességére, transzpitél rezisztenciájára és a szoros kapcsolati fehérjék génkifejeződésére

A nátrium-fluorid citotoxikus hatásait az AlamarBlue életképesség teszttel vizsgálva azt kaptuk, hogy a fluorid a HAT-7 sejtek metabolikus aktivitását nem zavarta 0,6 mM koncentrációig, míg 1 mM fluorid kezelés kis mértékben csökkentette, de nem bizonyult citotoxikusnak, azaz a sejtek 1 mM fluoridkoncentráció mellett is benőtték a membránok felületét. Ezzel szemben 3 mM fluorid toxikusnak bizonyult, már 48 óra után elpusztítva a sejteket.

A szoros kapcsolatok (TJ-k) kialakulását és a sejtek polarizációját folyamatosan követtük 5 napon át, naponta mérve a Transwell membránon tenyésztett HAT-7 sejtek transzepitél elektromos rezisztenciáját (TER) mialatt különböző koncentrációjú nátrium-fluorid tartalmú médiumokban differenciáltattuk őket. 3-5 nap után a sejtek konfluens módon a membránok teljes felületét benőtték mind a kontroll, mind a nátrium-fluoriddal kezelt sejtek esetében 1 mM fluorid koncentrációig. Ez alatt a TER értékek elkezdtek emelkedni a TJ-k kialakulásának köszönhetően. Az 5 napos időszak alatt a TER növekedését nem befolyásolta szignifikánsan a 0,3-0,6 mM nátrium-fluoridos kezelés a kontrollhoz viszonyítva, míg 1 mM hatására a TER fejlődése jelentősen gátlódott ($p < 0,05$ vs. fluoridmentes kontroll).

A szoros kapcsolati fehérjék expresszióját kvantitatív PCR módszerrel vizsgálva, kis meglepetésre, a fluorid expozíció nem csökkentette a TJ-komplex legfontosabb tagjainak (a Tjp1, Cldn1, Cldn4, Cldn8, Cldn16 és Cldn19 fehérjék) génkifejeződését, sőt egy kismértékű, de szignifikáns növekedés volt tapasztalható.

KÖVETKEZTETÉSEK

- 1) A Transwell membránon polarizált módon, egysejt-rétegben növesztett, ameloblaszt-jellegű HAT-7 sejtekben az intracelluláris pH-szabályozást befolyásoló, funkcionálisan aktív bazolaterális transzporterek azonosíthatóak.
 - a) A sejtek bazolaterális oldalán Na^+ -tól függő nátrium-proton cserélő aktivitás mutatható ki. A transzporter a protonok bazolaterális oldali leadásával a bikarbonát intracelluláris akkumulációját biztosíthatja az ameloblaszt sejtekben. Ez az aktivitás az izotípus-specifikus, szelektívebb káriporid gátlószerre is érzékeny, ami az NHE-1 izotípus funkcionális jelenlétére utal.
 - b) Külső bikarbonát jelenléte mellett, az elektrogén nátrium-bikarbonát kotranszporter bazolaterális aktivitása is detektálható, amely mechanizmus a bikarbonát-ionok közvetlen transzportjához járulhat hozzá az ameloblaszt sejtekben.
 - c) A sejtek bazolaterális oldalán a nátrium-kálium-klorid kotranszporter aktivitása is kimutatható, amely a klorid-ionok utánpótlását biztosíthatja az ameloblasztokban.

- d) Szignifikáns bazolaterális anion-cserélő aktivitása van a sejteknek, amely mechanizmus fontos eleme lehet az ameloblaszt sejtek pH szabályozásának.
- 2) A Transwell membránon növesztett HAT-7 sejtekben a fluorid akut expozíciója (egy széles koncentráció tartományban) nem befolyásolja szignifikánsan a sejtek stimulált bazolaterális-apikális irányú HCO_3^- -szekrécióját, tehát a fluoridnak a szekrécióra feltehetően közvetlen nincs hatása.
- 3) A fluorid a mikromoláris tartományban (egészen 1 mM-ig) nincs szubsztanciális hatással a HAT-7 sejtek életképességére, de 3 mM koncentrációban már toxikusnak bizonyul.
- 4) A még nem toxikus 1 mM fluorid koncentráció szignifikánsan késlelteti a Transwell membránon differenciált HAT-7 sejtek magas transzepiteliális elektromos rezisztenciájának kialakulását. Ez a szoros sejtkapcsolatok kialakulásának fluorid általi gátlódását jelzi. Ezzel ellentétben az 1 mM fluorid nem csökkenti (inkább kicsit növeli) a Tjp1, Cldn1, Cldn4, Cldn8, Cldn16 és Cldn19 szoros sejtkapcsolati fehérjék génexpresszióját HAT-7 sejtekben. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy fehérjekifejeződés helyett a fluorid összeszerelődésükben és/vagy membránba való

kihelyeződésükben akadályozhatja a szoros sejtkapcsolatok kialakulását, így munkánk további érdekes vizsgálati irányokat nyit a zománc fluorózissal kapcsolatos kutatásokban.

Adataink nem csökkentik a dentális fluorózis kialakulásában eddig feltételezett mechanizmusok fontosságát, és bizonyos mértékig e mechanizmusok közül több is hozzájárulhat a hypomineralizációhoz a fluorid tényleges helyi koncentrációtól függően. Mindazonáltal a fluorid szoros sejtkapcsolatok kialakulásának késleltetésében feltételezett szerepe is nagy jelentőséggel bírhat, ha figyelembe vesszük az ameloblasztok szerkezeti és funkcionális változásainak ciklusait a zománcérés során (az ameloblaszt formák, TJ átrendeződés és pH moduláció patkányokban körülbelül 8 órás ciklusát).

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

1. **Racz R.** Nagy A, Rakonczay Z, Dunavari EK, Gerber G, Varga, G. *Defense mechanisms against acid exposure by dental enamel formation, saliva and pancreatic juice production.* CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN 24 : 18 pp. 2012-2022. (2018)
2. Varga G, DenBesten P, **Racz R.** Zsembery A. *Importance of bicarbonate transport in pH control during amelogenesis - need for functional studies.* ORAL DISEASES 24 : 6 pp. 879-890. (2018)
3. **Racz R.** Foldes A, Bori E, Zsembery A, Harada H, Steward MC, DenBesten P, Bronckers ALJJ, Gerber G, Varga, G. *No Change in Bicarbonate Transport but Tight-Junction Formation Is Delayed by Fluoride in a Novel Ameloblast Model.* FRONTIERS IN PHYSIOLOGY 8 : 940. pp 1-12. (2017)
4. Bori E, Guo J, **Racz R.** Burghardt B, Földes A, Kerémi B, Harada H, Steward MC, DenBesten P, Bronckers ALJJ, Varga G. *Evidence for Bicarbonate Secretion by Ameloblasts in a Novel Cellular Model.* JOURNAL OF DENTAL RESEARCH 95 : 5 pp. 588-596. (2016)

Egyéb közlemények:

1. Farkasdi S, Pammer D, **Racz R.** Hriczó-Koperdák G, Szabó BT, Dobó-Nagy Cs, Kerémi B, Blazsek J, Cuisinier F, Wu G, Varga G. *Development of a quantitative preclinical screening model for implant osseointegration in rat tail vertebra.* CLINICAL ORAL INVESTIGATIONS 23 : 7 pp. 2959-2973. (2019)