

Par-C10 sejtek a parotis szöveti szerveződésének modellezésére

BORI ERZSÉBET, DR. RÁCZ GÁBOR, DR. BURGHARDT BEÁTA, DR. DEMETER IRMA,
DR. HEGYESI ORSOLYA, DR. VARGA GÁBOR, DR. FÖLDES ANNA

A nyálmirigy hipofunkció, amely felléphet fej-nyaki daganatok terápiás besugárzását követően vagy Sjögren-szindróma következtében, drasztikusan rontja a beteg életminőségét. A konvencionális terápiák nem nyújtanak kielégítő megoldást a problémára, ezért teljesen új szemléletű kezelési stratégiák kidolgozása válik egyre sürgetőbbé. Elsősorban az acinusok funkciójának helyreállítása jelent kihívást, ez már régóta a fogorvostudományi kutatások egyik központi kérdése. Számos biológiai alapú beavatkozást vizsgáltak, így a túlélő ductusok génterápiás „átprogramozását” vagy a nyálmirigyben található progenitor sejtek regenerációs potenciálját. A kutatócsoport is dolgozott számos modellel, amelyek segítségével bizonyítást nyert, hogy megfelelő extracelluláris fehérjéket tartalmazó hordozók (pl. bazális membrán extraktum, BME) segítségével acinaris irányú differenciálódás érhető el. Az *in vitro* nyálmirigy modellek jelentős része azonban submandibularis mirigy eredetű, ami azonban fejlődésében és funkciójában eltér a parotistól. A kutatócsoport célul tűzte ki, hogy patkány parotis eredetű sejtvonalon (Par-C10) modellezze a nyálmirigy hipofunkció potenciális kezelési lehetőségeit: a hordozók és bioaktív molekulák irányította differenciációt, valamint a génterápia nyújtotta lehetőségeket. Kísérleteik során a sejtek morfológiai változásait tanulmányozták permeábilis poliészter membránokon, valamint háromdimenziós kultúrában, különböző koncentrációjú BME-t alkalmazva. Emellett rekombináns adenovírus vektor felhasználásával tesztelték, alkalmasak lehetnek-e génterápiás modellnek. Eredményeik azt mutatják, hogy a Par-C10 sejtek alkalmasak a parotis szöveti szerveződésének modellezésére, emellett génterápiás modellrendszerként is szolgálhatnak.

Kulcsszavak: szöveti regeneráció, génterápia, nyálmirigy hipofunkció, parotis, bazális membrán extraktum, BME

Bevezetés

Nyálunk meghatározó szerepet tölt be szájüregünk mechanikai, kémiai, mikrobiológiai védelmében, és segít emésztőrendszerünk felső traktusának integritását fenntartani. Hiánya szembeötlő mindazokban az esetekben, amikor a nyálmirigyek nem képesek ellátni feladatukat [18]. Ez bekövetkezhet a fej-nyaki daganatok sugárterápiáját követően, amikor a folyadék- és elektrolitszekrécióért felelős acinusok elpusztulnak, Sjögren-szindrómában, de akár gyógyszeres kezelés mellékhatásaként is felléphet hiposalivatio [3, 13]. A nyálmirigy hipofunkció következtében a rágás, nyelés nehezített, gondot okozhat a beszéd, a páciensek xerostomiára panaszkodnak, gyakoribbá válnak a szájüregi fertőzések [12]. Kezelésként acetilkolin agonisták jöhetnek szóba, ezek azonban csak az ép acinus sejtekben képesek serkenteni a nyáleválasztást. A tünetek enyhítésére műnyálat alkalmazhatunk, azonban ez nem képes jelentős mértékben ellensúlyozni a betegek életminőségének drasztikus romlását [31]. Az acinusok nagyobb mértékű vagy teljes pusztulása pedig olyan kihívást jelent, mellyel csak teljesen új szövetregenerációs/szövetépítési stratégiák alkalmazásával nézhetünk szembe [5].

A fogorvostudományi kutatások már jó ideje foglalkoz-

nak a nyálmirigyek regenerációjával. Számos lehetőség látott napvilágot, amelyek a ductalis-acinaris transzdiffereenciációban, génterápiában vagy mesterséges nyálmirigy létrehozásában látják a megoldást [2, 7, 8, 37]. A számos lehetőségben közös, hogy az acinaris működés helyreállítása a siker kulcsa, a kevésbé érzékeny ductusok működése általában kisebb mértékben érintett [14]. Az egyik legkézenfekvőbb megoldást az jelenthetné, ha a páciens saját sejtjeivel kezelhetnénk például radioterápiát követően [7]. Az eltávolított szövetből képzett sejt kultúra acinaris tulajdonságait, differenciált állapotát fenntartani/visszaállítani azonban csak akkor lehetséges, ha részleteiben ismerjük a nyálmirigyek fejlődésének mozzanatait.

A nyálmirigyek fejlődésében, elágazódási folyamataiban fontos szerepet tölt be a mesenchyma által termelt extracelluláris mátrix, valamint annak szelektív degradációja. A differenciálódási kísérletekhez ezért gyakran használnak magas extracelluláris fehérje tartalmú ún. bazális membrán extraktumokat (pl. BME, Matrigel). Ezek egyik legfontosabb bioaktív komponense a laminin, emellett pedig nagy mennyiségben tartalmaznak kollagén IV-et és heparán-szulfátot, valamint változó mennyiségben növekedési faktorokat [21].

A nyálmirigyek differenciálódásának számos *in vitro* modellje ismert. Egy ilyen viszonylag jól karakterizált,

elfogadott modell a HSG sejtvonal, amely irradiált submandibularis nyálmirigy ductusából származik [34]. Egy másik általunk alkalmazott modell a PTHSG (vagyis Primary Total Human Submandibular Gland) primer sejtkultúra, amely a mirigy enzimes emésztését követően nyert vegyes mesenchymalis-epithelialis kultúra, ennél fogva kiválóan alkalmas a kétféle sejttípus interakcióinak kiválasztására is [35]. A két említett sejtvonal Matrigelben bekövetkező differenciációját kutatócsoportunk korábban már vizsgálta [35, 36].

A submandibularis eredetű modellek vizsgálata azonban nem elegendő, hiszen a parotis a többi miriggyel szemben ectodermális eredetű, fejlődése bizonyos pontokon eltérhet azokétól. Ezért is szeretnénk laboratóriumunkban differenciálódási modellként bevezetni a Par-C10 patkány parotis eredetű sejtvonalat, mellyel epithelialis transzportfolyamatok modellezése során már szereztünk tapasztalatokat [11]. Ez a sejtvonal nagyrészt acinaris tulajdonságokat mutat: muszkarinos és adrenerg receptorokat expresszál, aktív aniontranszporttal rendelkezik, és számos transzporter aktivitása mérhető a sejteken, amelyek érintettek az acinusok elektrolit-transzportjában (Nhe1, Nbc1, Nkcc1, Ae2) [11, 38]. Hasznos lehet tehát annak tisztázására, hogy mi történik az acinusokkal *in vitro* környezetben, hogyan történik dedifferenciálódásuk és hogyan tartható fenn differenciált állapotuk.

Vizsgálati anyag és módszerek

Sejtenyésztés

A Par-C10 patkány parotis sejtvonal Dr. David Quissel (School of Dentistry, University of Colorado Health Sciences Center, Denver) adománya volt. A sejteket Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture Ham F-12 (DMEM/F-12) 1:1 arányú keverék tápfolyadékban (Gibco, 31330) tenyésztettük, amelyet 10% foetalis borjúszérummal (FBS) (Lonza, BW14-502F), 0,1 μM retin-savval (Sigma, R2625), 2 nM trijód-tironinnal (Sigma, T6397), 0,4 $\mu\text{g/ml}$ hidrokortizonnal (Sigma, H0888), és 100 IU/ml penicillinnel, 1 $\mu\text{g/ml}$ streptomycinnel (Sigma, P4333) egészítettük ki. A tápfolyadékot hetente háromszor cseréltük és 80-90% konfluencia elérésekor 1:50 arányban passzáltuk. A passzálás során a sejteket 0,25%-os tripszin-EDTA (TE) (Gibco, 25200) oldattal szedtük fel a tenyészedény aljáról. A sejtvonal tenyésztése minden esetben 37 °C-os, párásított, 5% CO_2 -vel dúsított levegőn, tenyésztőszekrényben történt. Kísérletekhez 3–15 passzázs szám közötti tenyészeteket használtunk.

Kiültetés Tranwell-Clear membránra

A sejteket poliészter membrán (Costar 3460, Transwell-CLEAR; pórusméret: 0,4 μm , átmérő: 12 mm, felület: 1,12 cm^2) felületére ültettük, 5×10^5 sejtszámmal. A plasztikon használt tápfolyadékukban, steril körülmények között inkubáltuk őket. A tápfolyadékot kétnaponta cse-

réltük. A konfluens monolayer létrejöttét a transepithel-resistentia (TER) rendszeres mérésével minden másnap ellenőriztük. A TER értékeket a Precision Instruments erre a célra kifejlesztett epithelialis volt-ohm meter (EVOM) készülékével mértük.

Kiültetés BME felületére

A Par-C10 sejteket különböző koncentrációjú (6 mg/ml, 9 mg/ml, 13,2 mg/ml) csökkentett növekedési faktor tartalmú BME-vel (Basement Membrane Extract, RD-3433-005-01) kezelt felületre ültettük ki. A különböző koncentrációjú BME-vel bevont aljzatokat BME és DMEM/F-12 tápfolyadék keverésével állítottuk elő mindvégig jégen tartva, hűtött pipettaheggyel adagolva. A Par-C10 sejteket a tenyésztőedény felületére dermedt BME rétegére ültettük ki. A 96 lyukú tenyésztőtálcán 5 párhuzamosban 10^5 sejtszámmal kiültetett sejteket vizsgáltuk, különböző passzázs számú fagyasztási felvételből. Kontrollként mindig nem kezelt tenyésztőedény felületére ültettük a sejteket.

A morfológiai változásokat fáziskontraszt mikroszkóppal (Nikon Eclips E600) követtük, a megfigyelést 24 órán át végeztük, a sejteket a kiültetéskor és a kiültetést követően 3, 6, 18, 24 órával fényképeztük (Retiga 2000R Q Imaging Fast 1394). A fényképezések között a megszokott tenyésztési körülményeket tartottuk.

Vírus vektor alkalmazása

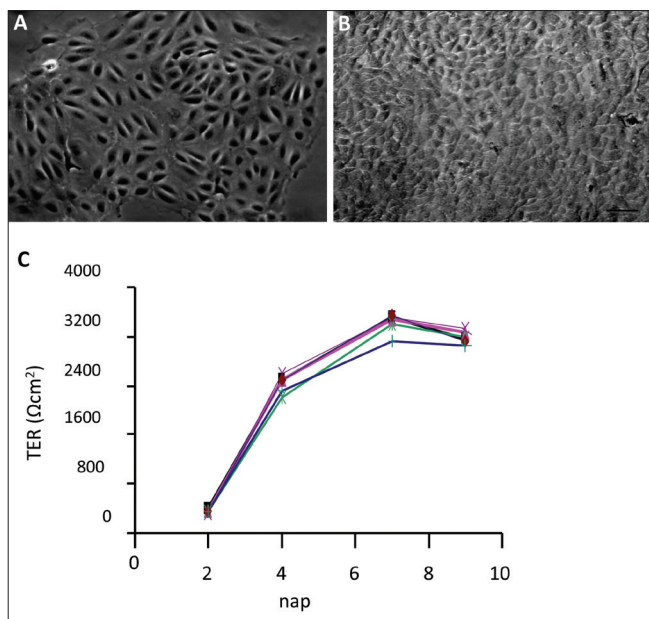
A sárga fluoreszcens proteint (EYFP-Enhanced Yellow Fluorescent Protein) kódoló adenovírust (AdEYFP) a korábban leírtaknak megfelelően készítettük [29]. Röviden, a fluoreszcens fehérjét kódoló génszakaszt CMV promotert és SV40 poliA szignált tartalmazó pACCMVpLpA plazmidba klónoztunk, amelyet HEK 293 sejtekbe kotranszfectáltunk pJM17 5-ös szerotípusú adenovírus segédplazmiddal. A HEK sejtekben a két plazmid rekombinációjával jönnek létre az AdEYFP vírusok. A Par-C10 sejtek transzdukcijához egy éjszakán át inkubáltuk a tenyészetet a vírusokat tartalmazó tápoldattal 37 °C-on.

Eredmények

Polarizált monolayer létrehozása

A Par-C10 parotis eredetű sejtvonal jellegzetes epithel morfológiát mutat, plasztik aljzaton tenyésztve szigetekben egysejtréteggé nő.

A Par-C10 sejtek permeábilis poliészter membránra ültetve polarizált konfluens monolayert alkotnak (1. ábra). A konfluens tenyészet létrejöttét a transepithel ellenállás folyamatos mérésével ellenőriztük. A transepithel ellenállás értéke arányos nem csak a tenyészet konfluenciájával, de a sejtek közötti kapcsolatok zártságával is: hiszen a sejtek közötti szoros kapcsolatok (tight junction) kialakulása korlátozza az extracelluláris ionmozgást. A mért értékeket a membrán sejtmentes ellenállásához hasonlítottuk ($135 \pm 9 \Omega\text{cm}^2$), TER értékek a maximumot ($2500\text{--}3000 \Omega\text{cm}^2$) a 6–9. nap között ér-



1. ábra: Plasztik ajzaton előkezelés nélkül a Par-C10 sejtek egysejtrétegű epithelialis mezős elrendezést mutattak, macskakő-szerűen rendeződtek (A). Az inverz fáziskontraszt kép mutatja, hogy membránra ültetve konfluensen, szintén egysejtrétegben nőttek (B).

A transzepithelialis ellenállás (TER) mérési értékek mutatják, hogy 6 nap elteltével zárt, polarizált, nagy ellenállású sejtréteg jön létre, mely utána napokon át megmarad. A Par-C10 sejteknél a TER-értéke magas, plató-értéke 2500-3000 Ωcm² (C).

ték el, majd ezt követően az ellenállás érték jelentősen csökkent (az 1. ábra nem mutatja). Mivel Par-C10 sejtek képesek membránon tenyésztve polarizált epitheliu-

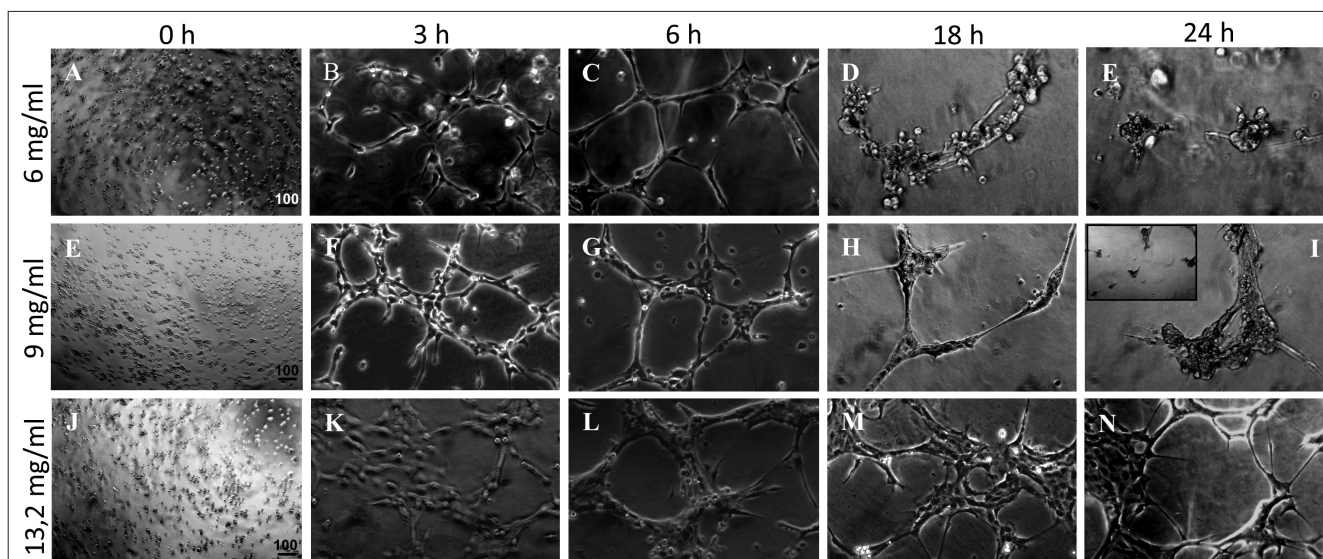
mot képezni, ezért alkalmasak a transzport folyamatok tanulmányozására.

Par-C10 sejtek szerveződése és migrációjának vizsgálata

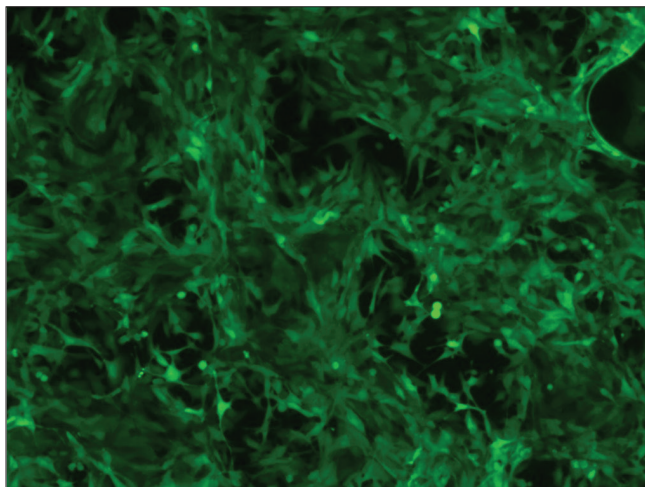
Par-C10 sejtek szerveződését 6; 9; 13,2 mg/ml összfehérje koncentrációjú, csökkentett növekedési faktor tartalmú bazális membrán extraktumon vizsgáltuk. A különböző koncentrációjú BME felületére ültetett sejteknél inverz fáziskontraszt mikroszkóppal követtük időben a morfológiai változásokat (2. ábra). A kiültetést követően 3 órával már minden általunk alkalmazott koncentrációban reticularis struktúra alakult ki. A szerveződés 6 óra elteltével sem különbözött szignifikánsan a három BME koncentrációnál. Míg az alkalmazott nagy koncentrációjú BME (13,2 mg/ml) esetében 24 óra elteltével is 2D reticularis struktúrát, addig a közepes (9 mg/ml) koncentrációt alkalmazva ekkor már inkább acino-tubularis struktúrákat láthatunk. Sőt, alacsony (6 mg/ml) koncentrációjú BME alkalmazása esetén a 18. órában már megjelennek az acino-tubularis struktúrák és a kiültetést követően 24 óra elteltével 3D acino-tubularis, illetve diszkrét acinus-szerű struktúrák is megjelennek.

Par-C10 sejtek transzdukálhatósága

A Par-C10 sejtek nagyrésze (80%) fluoreszcensen világít az AdEYFP vírusfertőzés hatására, így ez a laboratóriumunkban létrehozott adenovírus, amelybe sárga fluoreszcens fehérjét (EYFP) csomagoltunk, alkalmas riporter a géntranszfernek mind *in vitro*, mind *in vivo* kísérletek esetében (3. ábra). A mérce 100 μm-t jelöl.



2. ábra: A Par-C10 sejtek a kiültetés pillanatában (0 időpontban) még lekerekedettek a különböző koncentrációjú BME aljzaton (A, E, J). A fáziskontraszt mikroszkópos felvételek, már 3 óra elteltével mutatják, hogy a BME fontos szerepet játszik a térbeli szerkezet kialakításában, hiszen mind alacsony, mind magas koncentrációjú BME alkalmazásakor retikuláris struktúrák alakulnak ki (B, F, K). Hat óra elteltével hasonló a kép, bár a sejtek egyre inkább göcspontokban helyezkednek el (C, G, L). A kiültetést követően 18-24 órával alacsony (6mg/ml) koncentrációjú BME felületen a sejtek már egyre inkább 3D acino-tubularis vagy diszkrét acinus-szerű struktúrát mutatnak (E, I), míg nagy koncentráció (13,2 mg/ml) esetén a struktúráldás megreked a 2D retikuláris forma kialakulásánál (K, L). A mérce 100 μm-t jelöl.



3. ábra: A Par-C10 sejteket egy éjszakán át inkubáltuk AdEYFP rekombináns adenovírus vektorral. A fluoreszcens mikroszkópos felvételen jól látható, hogy a sejtek legalább 80%-a kifejezi a transzgént.

Megbeszélés

A nyálmirigy hipofunkció igen drasztikusan csökkenti a betegek életminőségét, a jelenleg elérhető kezelésekkel pedig kizárólag a tünetek csillapíthatóak. Különböző biológiai terápiák bevezetése hozhat áttörést ezen a területen. Számos *in vitro* modell létezik, amelyek segítségével ezek a beavatkozások modellezhetőek: ilyen például a regenerációs kísérletekben gyakran alkalmazott HSG sejtvonal, vagy a PTHSG primer submandibularis nyálmirigy tenyészet [25]. Mivel azonban a parotis és a submandibularis mirigy mind fejlődésében, mind funkciójában különbözik, ezért kutatócsoportunk olyan parotidból származó sejtet használt, amelyen a nyálmirigy-funkció visszaállítását célzó technológiák tesztelhetőek. Ilyen potenciális modell a Par-C10 sejtvonal.

A nyálmirigy szekrécióhoz nélkülözhetetlen, hogy a sejtek között szoros kapcsolatok alakuljanak ki, enélkül ugyanis nem valósulhat meg az irányított elektrolit-, és folyadéktranszport [1]. A Par-C10 sejtek Transwell Clear poliészter membránra ültetve tipikus epithel morfológiát mutatnak és polarizált monolayer formálnak. A sejtek közötti szoros kapcsolatok kialakulásának bizonyítéka a magas transzepithel ellenállás. Ugyanez nem mondható el számos más nyálmirigy szekréció/szerveződés modellezésére használt sejtvonalról: legtöbbjük nem vagy csak mérsékelt ellenállás elérésére képes, így például a gyakran alkalmazott HSG sejtek nem képeznek szoros kapcsolatokat, a SMIE sejtek (Submandibular Immortalized Epithelial cell line, submandibularis nyálmirigy ductusból létrehozott immortalizált sejtvonal) pedig nagyrészt átteresztő, ún. „leaky” epitheliumot alkotnak [1, 15]. A használatban lévő sejtvonalak közül Dr. David Quissel laboratóriumából származik a legtöbb magas transzepithel ellenállást mutató klón, ezek a sub-

mandibularis eredetű SMG-C6 és SMG-C10, valamint a parotis eredetű Par-C5 és Par-C10, ezek közül is a legmagasabb TER értéket a Par-C10 mutatja [27, 28]. Az utóbbi években az is kezd világossá válni, hogy az extracelluláris anyagáramlást befolyásolni tudjuk, a sejtek közötti kapcsolatok átteresztő képessége módosítható: mind a háromdimenziós mátrix struktúra segítheti a sejtek differenciálódását, mind transzfekció révén a szoros kapcsolatok összetételének változtatásával elérhető a kívánt permeabilitás [21, 24]. Mivel a Par-C10 sejtek könnyen tenyészthetőek polarizált epitheliumként, ezért igen jól használhatóak modellként, gyakran használják őket a nyálmirigyek elektrolittranszportjának vizsgálatára is [11, 38].

A nyálmirigyek regenerációjának egyik legkézenfekvőbb módja saját progenitor sejtjeinek aktiválása. Ezek a sejtek megfelelő szignálok hatására újraalkothatják a károsodott mirigyet. Ez képezheti alapját egy mesterséges nyálmirigy modell kidolgozásának is. A szignálok valószínűleg megegyeznek azokkal, amelyek a nyálmirigyek embrionális fejlődése során irányítják a proliferációt, a szerveződést és az apoptózist [9]. A nyálmirigy fejlődésben fontos szerepe van a bazális membránnak, amely elválasztja a kölcsönhatásban lévő epitheliumot és mesenchymat [17]. Ezért is használnak bazális membrán extraktumot a szöveti szerveződés és differenciálódás vizsgálatához. A BME egy Engelbreth-Holm-Swarm nevű tumorsejt terméke, szolubilis formában tartalmazza a bazális membránok fontos alkotóit. Különböző szövetek differenciálódásának vizsgálatára használják, például csont-, pankreas-, prosztata-, máj-, porc sejtvonalak és primer sejt kultúrák differenciálódását vizsgálták már ebben a mátrix környezetben. A BME pontos hatásmechanizmusa nem ismert, valószínűleg több mechanizmus együttes jelenlétéről van szó és mind az extracelluláris mátrix fehérjék háromdimenziós fizikai jelenléte, mind a növekedési faktorok lokális koncentrációja jelentős szerepet játszik a sejtek differenciálódásának elősegítésében és a differenciált állapot fenntartásában [19]. A BME komponensei közül a laminin hatásáról áll rendelkezésünkre a legtöbb irodalmi adat. Erről az extracelluláris mátrix fehérjéről kimutatták, hogy szerepet játszik a sejtadhézió, a migráció, a differenciáció, a proliferáció, az idegnyúlvány-növekedés és a tumorigenezis folyamataiban [16, 20]. Egér submandibularis nyálmirigy morfogenezisében a laminin $\alpha 5$ szerepét mutatták ki, amely $\beta 1$ integrin receptoron keresztül az fibroblaszt növekedési faktor receptor (FGFR) expresszióját szabályozza [32]. A laminin mellett a BME másik nagy mennyiségben előforduló komponense a heparán-szulfát, amely a nyálmirigy fejlődésben fontos szerepet betöltő FGF-10 aktivitását szabályozza, a sejt felszínen koreceptoroként az FGF-FGFR kötés affinitását változtatja meg [26]. A BME számos növekedési faktort is tartalmaz, azonban ezek mennyisége/összetétele a preparátumtól függően eltérő lehet. Éppen ezért fontos lehet a későbbiekben meghatározni, hogy nyálmirigyek esetében a bazális membrán extraktum mely kompo-

nensei esszenciálisak a differenciálódáshoz. A különböző összfehérje (6; 9; 13,2 mg/ml) koncentrációjú BME felületeken tenyésztett Par-C10 sejtekkel kapott eredményeink összhangban az irodalmi adatokkal azt mutatták, hogy míg az alacsonyabb fehérje koncentráció a diszkrét acinus-szerű struktúrák kialakulásának kedvez, addig a magasabb összfehérje koncentráció inkább az acino-tubularis, a legmagasabb pedig reticularis hálózat szerveződését segíti. Hasonló acinus-szerű struktúrák kialakulását és differenciálódását korábban már vizsgálták munkatársaink, a HSG sejteket 4,55 mg/ml fehérje koncentrációjú Matrigelen tenyésztve amiláz expressziót, lumen formálódást is tapasztaltunk, bár a differenciált állapot nem volt hosszú távon fenntartható [36, 39]. *Maria és mtsai* [21] szintén a HSG sejtvonalat alkalmazták, vizsgálataik során 2 mg/ml fehérje koncentrációjú bazális membrán extraktumot használtak és szintén a sejtek acinaris irányú differenciálódását írták le. Par-C10 sejtekből is képeztek már acinusokra emlékeztető szférákat, amelyek számos acinaris fehérje expresszióját (szoros kapcsolati fehérjék, vízcsatornák, transzporterek), valamint feltételezhetően klorid áramot mutattak [4], de BME összfehérje koncentráció függvényében történő struktúra kialakulást nem vizsgáltak. Magasabb fehérje koncentrációjú BME használatát jóval kevesebb közleményben alkalmazták. A HSG sejtvonal hasonlóan a Par-C10 sejtekhez képes acino-tubularis és reticularis hálózatot is kialakítani növekvő fehérje koncentrációjú BME mátrixban tenyésztve, azonban a Par-C10 sejtek feltételezhetően érzékenyebbek az összfehérje tartalomra: már jóval alacsonyabb, 13,2 mg/ml BME koncentráció elérésékor is hálózatot alkotnak, szemben a HSG sejtekkel, amelyek csak 17,1 mg/ml koncentráció esetén [30, 39]. Szintén többféle összfehérje tartalmú bazális membrán készítményt alkalmaztak *Szlávik és mtsai* primer submandibularis nyálmirigy eredetű sejt kultúra differenciáltatására. Tapasztalataik szerint a heterogén, valószínűsíthetően progenitorokat is tartalmazó sejtenyészet kevésbé volt érzékeny a koncentrációra 9–17,1 mg/ml tartományban, sokkal inkább a donor páciens életkora befolyásolta a differenciálódási képességet. A sejtek itt acino-tubularis struktúrát vettek fel és amilázt expresszáltak az acinus-szerű részekben [35]. Szintén emberi nyálmirigy sejtek differenciálódását érték el *Maria és mtsai* [22].

A BME csak mint extracelluláris mátrix modell használható fel, a humán alkalmazása biztonsági problémákat vet fel, ezért próbálkozások folynak kiváltására, azonban az optimális mátrix megtalálása még vár magára. Neutralizált kollagén mátrix használata csak akkor vezetett acinaris és ductalis struktúrák kialakulásához, ha 40%-ban Matrigelt is tartalmazott. Növekedési faktorokkal együtt polimerizáltatott fibrin gélben differenciált amilázt expresszáló, háromdimenziós szerveződésű nyálmirigy sejtek tarthatóak fenn [23].

A sejterápiáknál és a teljes szövetregenerációnál egyszerűbb alternatívát kínálhat, ha a daganatos beteg besugárzását követően maradnak ductusok, amelyek funkciója genetikai szinten átprogramozható. A ductusok génterápiás átalakítása vízáteresztő epitheliummá részben pótolhatja az elpusztult acinusok funkcióját, hiszen a ductusokban végbemenő kisebb mértékű elektrolit szekréció elegendő hajtóerőt biztosít a víz mozgásához [10]. A ductusokba a vízcsatornákat *aquaporin 1* gént kódoló rekombináns adenovírus segítségével építik be. A módszert ma már fázis I klinikai vizsgálat keretében alkalmazzák az Amerikai Egyesült Államokban és bár az alkalmazott génterápiás vektor pusztán tranzienst hatás elérésére alkalmas, az első eredmények alapján a koncepció helyesnek bizonyult [6]. A Par-C10 sejtek transzdukciója sárga fluoreszcens proteint kódoló AdEYFP adenovírusral sikeres volt. A sejtek igen nagy hányada kifejezte a transzgént, igazolva hogy különböző genetikai módosítások modelljeként is szolgálhatnak. Mint korábban közöltük a sejtek humán AQP1 génnel is transzdukálhatóak voltak, így közvetlenül felhasználhatjuk modellünket folyadék-szekréciós vizsgálatokhoz, ezen kívül további genetikai módosítások hatását is tanulmányozhatjuk [40]. Mivel a ductalis-acinaris fenotípust számos transzkripció faktor befolyásolja, ezeket transzdukálva a sejtekbe a fenotípus további módosítását érhetjük el. Ilyen transzkripció faktorok a homeobox vagy a bázikus hélix-loop-hélix családba tartozó Hmx3 és Sgn1 (Mash3), amelyek a ductalis fenotípus kialakításában vesznek részt, míg a Mist1 az acinusokra jellemző [33, 41].

A nyálmirigyek szöveti szerveződésének és az acinaris és ductalis differenciálódás vizsgálatának jelentős szerepe van regenerációs eljárások kidolgozásában. Különböző hordozók, bioaktív molekulák és szükség esetén genetikai módosítások állnak rendelkezésünkre a fejlődési folyamat modellezésére, befolyásolására. A Par-C10 sejtek ideális modelljei lehetnek a nyálmirigy szövet (újra)szerveződésének, hiszen mind polarizált egysejtréteg, mind különböző háromdimenziós acinaris, acinotubularis és reticularis szerkezetek kialakítására alkalmasak. Parotis eredetűek, a legtöbb ma elérhető modellel ellentétben, így segíthetnek rávilágítani az apró különbségekre a submandibularis és fültömriagy fejlődése, regenerációja között. Genetikailag könnyen módosíthatók, így mind génterápiás beavatkozások, mind az acinaris-ductalis differenciálódás optimális körülményeinek modellezésére szolgálhatnak.

Köszönetnyilvánítás

Kutatómunkánkat az OTKA–NKTH-CK80928 és OTKA-K83915 kutatási pályázatok támogatásával végeztük.

Irodalom

1. AFRAMIAN DJ, TRAN SD, CUKIERMAN E, YAMADA KM, BAUM BJ: Absence of tight junction formation in an allogeneic graft cell line used for developing an engineered artificial salivary gland. *Tissue Eng* 2002; 8: 871–878.
2. ATKINSON JC, BAUM BJ: Salivary enhancement: current status and future therapies. *J Dent Educ* 2001; 65: 1096–1101.
3. ATKINSON JC, FOX PC: Sjogren's syndrome: oral and dental considerations. *J Am Dent Assoc* 1993; 124: 74–76.
4. BAKER OJ, SCHULZ DJ, CAMDEN JM, LIAO Z, PETERSON TS, SEYE CI és mtsai: Rat parotid gland cell differentiation in three-dimensional culture. *Tissue Eng Part C Methods* 2010; 16: 1135–1144.
5. BAUM BJ: Prospects for re-engineering salivary glands. *Adv Dent Res* 2000; 14: 84–88.
6. BAUM BJ, ALEVIZOS I, ZHENG C, COTRIM AP, LIU S, McCULLAGH L és mtsai: Early responses to adenoviral-mediated transfer of the aquaporin-1 cDNA for radiation-induced salivary hypofunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 19403–19407.
7. BAUM BJ, TRAN SD: Synergy between genetic and tissue engineering: creating an artificial salivary gland. *Periodontol* 2000 2006; 41: 218–223.
8. BAUM BJ, ZHENG C, COTRIM AP, McCULLAGH L, GOLDSMITH CM, BRAHIM JS és mtsai: Aquaporin-1 gene transfer to correct radiation-induced salivary hypofunction. *Handb Exp Pharmacol* 2009: 403–418.
9. CARPENTER GH, COTRONEO E: Salivary gland regeneration. *Front Oral Biol* 2010; 14: 107–128.
10. DELPORTE C, O'CONNELL BC, HE X, LANCASTER HE, O'CONNELL AC, AGRE P és mtsai: Increased fluid secretion after adenoviral-mediated transfer of the aquaporin-1 cDNA to irradiated rat salivary glands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 3268–3273.
11. DEMETER I, SZUCS A, HEGYESI O, FOLDES A, RACZ GZ, BURGHARDT B és mtsai: Vectorial bicarbonate transport by Par-C10 salivary cells. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60 Suppl 7: 197–204.
12. DIAZ-ARNOLD AM, MAREK CA: The impact of saliva on patient care: A literature review. *J Prosthet Dent* 2002; 88: 337–343.
13. FOX PC: Acquired salivary dysfunction. Drugs and radiation. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 842: 132–137.
14. GRUNDMANN O, MITCHELL GC, LIMESAND KH: Sensitivity of salivary glands to radiation: from animal models to therapies. *J Dent Res* 2009; 88: 894–903.
15. HE X, KUIJPERS GA, GOPING G, KULAKUSKY JA, ZHENG C, DELPORTE C és mtsai: A polarized salivary cell monolayer useful for studying transepithelial fluid movement in vitro. *Pflugers Arch* 1998; 435: 375–381.
16. HOFFMAN MP, NOMIZU M, ROQUE E, LEE S, JUNG DW, YAMADA Y és mtsai: Laminin-1 and laminin-2 G-domain synthetic peptides bind syndecan-1 and are involved in acinar formation of a human submandibular gland cell line. *J Biol Chem* 1998; 273: 28633–28641.
17. KADOYA Y, YAMASHINA S: Salivary gland morphogenesis and basement membranes. *Anat Sci Int* 2005; 80: 71–79.
18. KAPLAN I, ZUK-PAZ L, WOLFF A: Association between salivary flow rates, oral symptoms, and oral mucosal status. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 106: 235–241.
19. KLEINMAN HK, MARTIN GR: Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol* 2005; 15: 378–386.
20. MALINDA KM, KLEINMAN HK: The laminins. *Int J Biochem Cell Biol* 1996; 28: 957–959.
21. MARIA OM, MARIA O, LIU Y, KOMAROVA SV, TRAN SD: Matrigel improves functional properties of human submandibular salivary gland cell line. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43: 622–631.
22. MARIA OM, ZEITOUNI A, GOLOGAN O, TRAN SD: Matrigel improves functional properties of primary human salivary gland cells. *Tissue Eng Part A* 2011; 17: 1229–1238.
23. MCCALL AD, NELSON JW, LEIGH NJ, DUFFEY ME, LEI P, ANDREADIS ST és mtsai: Growth factors polymerized within fibrin hydrogel promote amylase production in parotid cells. *Tissue Eng Part A* 2013; 19: 2215–2225.
24. MICHIKAWA H, FUJITA-YOSHIGAKI J, SUGIYA H: Enhancement of barrier function by overexpression of claudin-4 in tight junctions of submandibular gland cells. *Cell Tissue Res* 2008; 334: 255–264.
25. NELSON J, MANZELLA K, BAKER O: Current cell models for bioengineering a salivary gland: a mini-review of emerging technologies. *Oral Dis* 2012.
26. PATEL VN, KNOX SM, LIKAR KM, LATHROP CA, HOSSAIN R, EFTEKHARI S és mtsai: Heparanase cleavage of perlecan heparan sulfate modulates FGF10 activity during ex vivo submandibular gland branching morphogenesis. *Development* 2007; 134: 4177–4186.
27. QUISSELL DO, BARZEN KA, GRUENERT DC, REDMAN RS, CAMDEN JM, TURNER JT: Development and characterization of SV40 immortalized rat submandibular acinar cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1997; 33: 164–173.
28. QUISSELL DO, BARZEN KA, REDMAN RS, CAMDEN JM, TURNER JT: Development and characterization of SV40 immortalized rat parotid acinar cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1998; 34: 58–67.
29. RACZ GZ, PEREZ-RIVEROS P, ADRIAANSEN J, ZHENG C, BAUM BJ: In vivo secretion of the mouse immunoglobulin G Fc fragment from rat submandibular glands. *J Gene Med* 2009; 11: 580–587.
30. RAKONCZAY Z, VAG J, FOLDES A, NAGY K, NAGY A, HEGYI P és mtsai: Chronic inflammation in the pancreas and salivary glands – lessons from similarities and differences in pathophysiology and treatment modalities. *Curr Pharm Des* 2014; 20(7):1104–1120.
31. RAM S, KUMAR S, NAVAZESH M: Management of xerostomia and salivary gland hypofunction. *J Calif Dent Assoc* 2011; 39: 656–659.
32. REBUSTINI IT, PATEL VN, STEWART JS, LAYVEY A, GEORGES-LABOUESSE E, MINER JH és mtsai: Laminin alpha5 is necessary for submandibular gland epithelial morphogenesis and influences FGFR expression through beta1 integrin signaling. *Dev Biol* 2007; 308: 15–29.
33. SHAW PA, ZHANG X, RUSSO AF, AMENDT BA, HENDERSON S, WILLIAMS V: Homeobox protein, Hmx3, in postnatally developing rat submandibular glands. *J Histochem Cytochem* 2003; 51: 385–396.
34. SHIRASUNA K, SATO M, MIYAZAKI T: A neoplastic epithelial duct cell line established from an irradiated human salivary gland. *Cancer* 1981; 48: 745–752.
35. SZLAVIK V, SZABO B, VICSEK T, BARABAS J, BOGDAN S, GRESZ V és mtsai: Differentiation of primary human submandibular gland cells cultured on basement membrane extract. *Tissue Eng Part A* 2008; 14: 1915–1926.
36. SZLAVIK V, VAG J, MARKO K, DEMETER K, MADARASZ E, OLAH I és mtsai: Matrigel-induced acinar differentiation is followed by apoptosis in HSG cells. *J Cell Biochem* 2008; 103: 284–295.
37. TRAN SD, WANG J, BANDYOPADHYAY BC, REDMAN RS, DUTRA A, PAK E és mtsai: Primary culture of polarized human salivary epithelial cells for use in developing an artificial salivary gland. *Tissue Eng* 2005; 11: 172–181.
38. TURNER JT, REDMAN RS, CAMDEN JM, LONDON LA, QUISSELL DO: A rat parotid gland cell line, Par-C10, exhibits neurotransmitter-regulated transepithelial anion secretion. *Am J Physiol* 1998; 275: C367–374.
39. VAG J, BYRNE EM, HUGHES DH, HOFFMAN M, AMBUDKAR I, MAGUIRE P és mtsai: Morphological and functional differentiation of HSG cells: role of extracellular matrix and trpc 1. *J Cell Physiol* 2007; 212: 416–423.
40. VARGA G, BORI E, KALLO K, NAGY K, TARJAN I, RACZ GZ: Novel possible pharmaceutical research tools: stem cells, gene delivery and their combination. *Curr Pharm Des* 2013; 19: 133–141.
41. YOSHIDA S, OHBO K, TAKAKURA A, TAKEBAYASHI H, OKADA T, ABE K és mtsai: Sgn1, a basic helix-loop-helix transcription factor delineates the salivary gland duct cell lineage in mice. *Dev Biol* 2001; 240: 517–530.

BORI E, RÁCZ GZ, BURGHARDT B, DEMETER I, HEGYESI O, VARGA G, FÖLDES A.

ParC-10 cells for modelling parotid gland tissue reorganization

Salivary gland hypofunction, which may occur in head and neck cancers following therapeutic irradiation or in Sjogren's syndrome, drastically impair the patient's quality of life. Conventional treatments do not provide a satisfactory solution to the problem, therefore it is becoming increasingly urgent to develop completely new management approaches in particular, the challenge of restoring the function of acini. Many biologically based interventions studied, thus „reprogramming” with gene therapy of survivor ducts or regeneration potential of progenitor cells in the salivary gland. Our research group has been working on several models, which have shown that by using appropriate media containing extracellular proteins (e.g. BME, basal membrane extract) can be achieved acinar differentiation. A significant proportion of in vitro models of salivary gland are submandibular of origin, which however is different from the development and function of parotid. Our research group aimed to model the potential treatment options for salivary gland hypofunction, the carrier or bioactive molecules directed differentiation, as well as the potential of gene therapy on rat parotid-derived cell line (Par-C10). In our experiments, we have studied the morphological changes of Par-C10 cells cultured on permeable polyester membrane, or in three-dimensional cultures, using varying concentrations of BME. In addition, we have tested the use of recombinant adenovirus vectors that could modify Par-C10 cells and make them useful in gene therapy models. Our data suggest that Par-C10 cell line is suitable for modelling parotid gland tissue organization and may also serve as a useful gene therapy model system.

Key words: tissue regeneration, gene therapy, salivary hypofunction, parotid, basement membrane extract, BME