

# Uloga gvanilinskih peptida u regulaciji transporta iona u izvodnim kanalčićima žlijezda slinovnica

---

Jakovac, Domagoj

Doctoral thesis / Disertacija

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Dental Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:127:123172>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-09**



Repository / Repozitorij:

[University of Zagreb School of Dental Medicine Repository](#)





Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Domagoj Jakovac

**ULOGA GVANILINSKIH PEPTIDA U  
REGULACIJI TRANSPORTA IONA U  
IZVODNIM KANALIĆIMA ŽLIJEZDA  
SLINOVNICA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



Sveučilište u Zagrebu

Stomatološki fakultet

Domagoj Jakovac

**ULOGA GVANILINSKIH PEPTIDA U  
REGULACIJI TRANSPORTA IONA U  
IZVODNIM KANALIĆIMA ŽLIJEZDA  
SLINOVNICA**

DOKTORSKI RAD

Mentori: prof.dr.sc. Ivan Alajbeg  
prof.dr.sc. Aleksandra Dugandžić

Zagreb, 2023



University of Zagreb

School of Dental Medicine

Domagoj Jakovac

**THE ROLE OF GUANYLIN PEPTIDES  
IN THE REGULATION OF ION  
TRANSPORT IN THE EXCRETORY  
DUCTS OF THE SALIVARY GLANDS**

DOCTORAL DISSERTATION

Zagreb, 2023

Rad je ostvaren u: Hrvatski institut za istraživanje mozga, Medicinski fakultet, Zagreb  
Naziv, oznaka i voditelj projekta u okviru kojeg je istraživanje obavljeno:  
Sveučilišna potpora, prof. dr. sc. Aleksandra Dugandžić,  
Godišnja potpora Ministarstva znanosti i obrazovanja i Sveučilišta u Zagrebu za  
znanstveno-istraživački rad za 2022, Stomatološki fakultet, izv. prof. dr. sc. Lea Vuletić

**Lektor hrvatskog jezika:** Kornelija Šakić, mag.educ.philol.croat

**Lektor engleskog jezika:** Sunčica Skakić, univ.bacc.art, bacc.educ.angl

**Sastav Povjerenstva za ocjenu doktorskog rada:**

1. izv. prof. dr. sc. Lea Vuletić, Stomatološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2. prof. dr. sc. Vlaho Brailo, Stomatološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu
3. doc. dr. sc. Nikola Habek, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
4. izv. prof. dr. sc. Ivana Šutej, Stomatološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu

**Sastav Povjerenstva za obranu doktorskog rada:**

1. izv. prof. dr. sc. Lea Vuletić, Stomatološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2. prof. dr. sc. Vlaho Brailo, Stomatološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu
3. doc. dr. sc. Nikola Habek, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
4. izv. prof. dr. sc. Ivana Šutej, Stomatološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu

**Datum obrane rada:** \_\_\_\_\_

Rad sadrži:   100   stranica (upisati broj)

    7     tablica (upisati broj)

   28    slika (upisati broj)

CD

Rad je vlastito autorsko djelo, koje je u potpunosti samostalno napisano uz naznaku izvora drugih autora i dokumenata korištenih u radu. Osim ako nije drukčije navedeno, sve ilustracije (tablice, slike i dr.) u radu su izvorni doprinos autora poslijediplomskog doktorskog rada. Autor je odgovoran za pribavljanje dopuštenja za korištenje ilustracija koje nisu njegov izvorni doprinos, kao i za sve eventualne posljedice koje mogu nastati zbog nedopuštenog preuzimanja ilustracija odnosno propusta u navođenju njihovog podrijetla.

## Zahvala

Prvo želim zahvaliti svom mentoru prof. dr. sc. Ivanu Alajbegu. Zatim, od srca zahvaljujem svojoj komentorici prof. dr. sc. Aleksandri Dugandžić, koja je ljubazno otvorila vrata svog laboratorija i podijelila svoje veliko znanje u području u kojem je izrađena ova disertacija. Svoje dragocjeno vrijeme, trud i strpljenje posvetila je svakom detalju vezanom uz moj doktorski studij.

Zahvaljujem se dr.sc. Martini Ratko, koja mi je pokazala osnovne rada u laboratoriju i pružala potrebnu podršku tijekom svih pokusa povezanih s ovom disertacijom. Također, zahvaljujem svojoj kolegici, dr.sc. Ivi Marolt, na pomoći pri izvođenju samih pokusa, kao i na savjetima vezanim s osmišljavanjem samih eksperimentalnih postupaka.

Na kraju, zahvaljujem svojoj obitelji što su me podržavali i podizali kad mi je bilo najpotrebnije, kao i uvijek.

## Sažetak

### ULOGA GVANILINSKIH PEPTIDA U REGULACIJI TRANSPORTA IONA U IZVODNIM KANALIĆIMA ŽLIJEZDA SLINOVNICA

Gvanilinski peptidi smatraju se unutrašnjim regulatorima funkcija žlijezda slinovnica. Cilj ove disertacije jest odrediti učinak intraperitonealno primijenjenog urogvanilina (UGN) na količinu i ionski sastav stvorene sline nakon stimulacije pilokarpinom. Istraživanje je provedeno na miševima C57Bl6NCrl (divlji tip, WT) te miševima kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C GC-C (GC-C KO) i WT miševima iz istog legla (GC-C WT) starosti 7 mjeseci. Izražaj mRNA za kanale za vodu i ionske transportere je određen u submandibularnoj žlijezdi slinovnici, duodenumu, kori bubrega i plućima. Nakon primjene UGN-a došlo je do smanjenja stvaranja sline stimulirane pilokarpinom te porasta koncentracije  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$  i  $\text{Cl}^-$ . Učinak UGN-a na stvaranje sline ovisan je o GC-C-u (izvodni kanalići žlijezda slinovnica), dok je učinak na ionski sastav neovisan ( $\text{Ca}^{2+}$  signalni put u stanicama acinusa). UGN je povećao izražaj mRNA za Slc26a6 u submandibularnim žlijezdama slinovnicama, a taj izražaj također je bio viši u duodenumu i bubrežnoj kori GC-C KO životinja, što ukazuje na organski nespecifičnu i široko rasprostranjenu ulogu GC-C-a u fiziološkoj regulaciji ovih ionski izmjenjivača. Prikazani rezultati upućuju na mogućnost sistemnog djelovanja UGN-a, a ne kako se do sada smatralo, da je UGN samo unutarnji regulator funkcije žlijezda slinovnica.

**Ključne riječi:** gvanilat-ciklaza C neovisni signalni put, stimulirana proizvodnja sline, brzina stvaranja sline, pH, qPCR

## Summary

### THE ROLE OF GUANYLIN PEPTIDES IN THE REGULATION OF ION TRANSPORT IN THE EXCRETORY DUCTS OF THE SALIVARY GLANDS

**Aim:** Guanylin peptides are intrinsic regulators of salivary glands secretion and their existence along with their signalling pathway in salivary glands has been known for more than two decades. Uroguanylin (UGN) is a small peptide and it is a member of the guanylin peptides family. UGN is widely expressed in the intestine. This peptide is secreted in gut lumen and blood after a meal. UGN and its guanylate cyclase C (GC-C) dependent signalling pathway are expressed in many tissues (central nervous, urinary, cardiovascular, respiratory, reproductive, immunological system as well as in salivary glands (parotid and submandibular)). GC-C is located at the apical membrane of the ducts of salivary glands. GC-C agonists are found in intralobular and interlobular ducts. In addition to the GC-C dependent signalling pathway, UGN activates another signalling pathway. This GC-C/cGMP independent signalling pathway exists in the kidneys, intestine, and brain. Its activation leads to an increase in intracellular  $Ca^{2+}$  concentration and a decrease in intracellular cAMP concentration. Since agonists of GC-C are considered to be only intrinsic regulators of salivary glands function, the aim of this study was to determine the effects of systemic UGN on the salivary flow and ion composition. By performing experiments on mice lacking GC-C (GC-C KO mice) we wanted to clarify if the UGN functions via GC-C or other signalling pathway.

**Materials and methods:** This study was conducted on 7 months old C57Bl6NCrl (wild type, WT) and GC-C knockout (KO) mice and their WT littermates (GC-C WT). The tip of the tail was taken from each animal to determine the genotype and to separate heterozygous animals that was not used in experiments. After induction of anesthesia, the experimental group of WT mice was administered human UGN (30  $\mu$ g/animal in 250  $\mu$ l saline) i.p., while the control group of WT mice was administered i.p. 250  $\mu$ l of saline solution. GC-C WT and GC-C KO mice received the same amount of UGN as the experimental group of WT mice. Fifteen minutes after application of UGN or saline solution the cholinergic agonist, pilocarpine hydrochloride (0.001 mg/g) was administered i.p. to stimulate salivation. Stimulated saliva collection test lasted 15 minutes. The amount of secreted saliva was determined by the gravimetric method, and



the flow rate was expressed as the absolute flow of stimulated saliva in ml over 15 minutes. For the analyte determination, test tubes were centrifuged and concentrations of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , and  $\text{Cl}^-$  in saliva were measured by indirect potentiometry, while pH was determined by potentiometry on a blood gas analyzer using dedicated pH-sensors. During anesthesia, and after saliva collection, the animals were sacrificed by cervical dislocation in order to isolate submandibular glands, duodenum and kidney cortex. GoScript™ Reverse Transcription System (ThermoFisher Scientific, Madison, Wisconsin, USA) was used to transcribe RNA into complementary DNA. In order to determine the expression of ion transporters and water channels in the gastrointestinal tract, duodenum and renal cortex, we used polymerase chain reaction in real time (qPCR). For this purpose, we used the TaqMan Real-Time PCR test (ThermoFisher Scientific) to determine quantitatively gene expression. Used probes used were specific for the genes of interest (ThermoFisher Scientific).

**Results:** When applied i.p., UGN decreased the pilocarpine stimulated saliva flow rate and increased concentration of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$  and  $\text{Cl}^-$ . In GC-C KO mice, UGN showed no effect on saliva flow rate, while the concentrations of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$  and  $\text{Cl}^-$  were the same in GC-C KO littermates when compared to WT mice. Therefore, effect of UGN on saliva flow rate was GC-C dependent (salivary ducts), while effects on ion concentrations were not dependent ( $\text{Ca}^{2+}$  signalling pathway in acinar cells). UGN increased expression of Slc26a6. Slc26a6 expression was found to be higher in GC-C KO mice in comparison to WT suggesting involvement of GC-C independent signalling pathway for UGN. The difference in Slc26a6 in GC-C KO mice was not unique for salivary glands because it was found also in duodenum and kidney cortex.

**Conclusions:** The effects of systemic UGN via basolateral membrane of salivary glands cells have not been considered so far. In our study, UGN, when applied i.p., decreased salivary flow rate, pH, and changed composition of other ions. Therefore, plasma UGN an hour after a meal could have physiological and pathological importance (development of cavities, inflammations or demineralisations) and inhibition of systemic UGN effects could be considered as a new approach in treatment of those conditions.

**Key words:** guanylate cyclase C independent signaling pathway; stimulated saliva production; saliva flow rate; pH; qPCR

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Žlijezde slinovnice.....	2
1.1.1. Građa i podjela.....	2
1.1.2. Regulacija izlučivanja sline.....	4
1.1.2.1. Neuralna regulacija.....	4
1.1.2.1.1. Neuropeptid Y.....	4
1.1.2.1.2. Vazoaktivni crijevni peptid.....	5
1.1.2.1.3. Tvar P.....	5
1.1.2.1.4. Peptid povezan s kalcitoninским genom.....	5
1.1.2.2. Endokrina/parakrina regulacija.....	6
1.1.2.2.1. Inzulin.....	6
1.1.2.2.2. Kolecistokinin.....	6
1.1.2.2.3. Aktivacija purinoreceptora.....	6
1.1.2.2.4. Gvanilinski peptidi.....	7
1.1.3. Sastav sline.....	7
1.1.4. Stvaranje primarnog sekreta.....	9
1.1.4.1. Bazolateralna membrana acinusnih stanica.....	10
1.1.4.1.1. Elektroneutralni kotransporter za $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ izoforma 1.....	10
1.1.4.1.2. Izmjenjivač $\text{Cl}^-$ i $\text{HCO}_3^-$ .....	10
1.1.4.1.3. Izmjenjivač $\text{Na}^+$ i $\text{H}^+$ .....	10
1.1.4.2. Luminalna (apikalna) membrana acinusnih stanica.....	11
1.1.4.2.1. Obitelj anoktamina (transmembranski proteini 16).....	11
1.1.4.2.2. Akvaporini.....	11
1.1.4.3. Mehanizam stvaranja primarnog sekreta.....	12
1.1.5. Obrada primarne sline u izvodnim kanalićima.....	13
1.1.5.1. Ionski transporteri i kanali za vodu u izvodnim kanalićima žlijezda slinovnica.....	13
1.1.5.1.1. Kinaza bez lizina i kinaza bogata prolinom/alanimom.....	13
1.1.5.1.2. Protein koji se veže na receptor za inozitol-3-fosfat.....	13
1.1.5.1.3. Elektrogeni $\text{Na}^+$ i $\text{HCO}_3^-$ kotransporter izoforme.....	14
1.1.5.1.4. Elektroneutralni $\text{Na}^+$ i $\text{HCO}_3^-$ kotransporter izoforme 1.....	14
1.1.5.1.5. Obitelj 26 transportera otopljenih tvari.....	15
1.1.5.1.6. Transmembranski regulator provodljivosti za cističnu fibrozu.....	15

1.1.5.1.7. Akvaporini.....	16
1.1.5.1.8. Epitelni natrijski kanal.....	16
1.1.5.1.9. Izmjenjivač Na <sup>+</sup> i H <sup>+</sup> .....	16
1.1.5.2. Obrada primarne sline u duktusu.....	16
1.2. Pankreas.....	18
1.2.1. Mehanizam izlučivanja u pankreasu.....	18
1.2.2. Usporedba izlučivanja pankreasa i žlijezda slinovnica.....	20
1.3. Gvanilinski peptidi.....	20
1.3.1. Termo-stabilni enterotoksin <i>E.coli</i> .....	22
1.3.2. Urogvanilin.....	23
1.3.3. Gvanilin.....	24
1.3.4. Receptori natrijuretskih peptida – gvanilat-ciklaze.....	24
1.3.4.1. Gvanilat-ciklaza A.....	25
1.3.4.2. Gvanilat-ciklaza B.....	26
1.3.4.3. Gvanilat-ciklaza C.....	26
1.3.5. Stanični signalni mehanizmi cikličkog gvanozin-monofosfata.....	27
1.3.5.1. Protein-kinaza G.....	27
1.3.5.2. Fosfodiesteraze.....	28
1.3.6. Signalni put natrijuretskih peptida neovisan o gvanilat-ciklazama.....	28
1.3.6.1. Receptor natrijuretskih peptida C.....	28
1.3.6.2. Signalni put gvanilinskih peptida neovisan o gvanilat-ciklazi C.....	29
1.3.7. Gvanilinski peptidi u gastrointestinalnom sustavu.....	30
1.3.7.1. Lokalizacija gvanilinskih peptida.....	30
1.3.7.2. Signalni mehanizmi gvanilinskih peptida.....	30
1.3.7.3. Žlijezde slinovnice i pankreas.....	31
1.3.8. Gvanilinski peptidi u bubregu.....	32
1.3.9. Gvanilinski peptidi u plućima.....	33
<b>2. CILJEVI I HIPOTEZE.....</b>	<b>34</b>
<b>3. MATERIJALI I POSTUPCI.....</b>	<b>36</b>
3.1. Model korišten u pokusima.....	37
3.2. Genotipizacija.....	37
3.2.1. Izolacija DNA.....	37
3.2.2. Lančana reakcija polimerazom.....	38
3.2.3. Elektroforeza na agaroznom gelu.....	39

3.3. Sijalometrija.....	39
3.4. Postupak mjerenja pH i elektrolita u slini.....	41
3.5. Određivanje izražaja mRNA za ionske transportere i kanale za vodu.....	42
3.5.1. Izolacija RNA.....	42
3.5.2. Prepisivanje RNA u komplementarnu DNA.....	43
3.5.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu.....	43
3.6. Statistička analiza.....	44
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>45</b>
4.1. Uzgoj životinja kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C iz istog legla kao i kontrolne životinje.....	46
4.2. Sistemni urogvanilin mijenja sastav i brzinu stvaranja sline.....	47
4.2.1. Urogvanilin smanjuje stvaranje sline stimulirane pilokarpinom.....	47
4.2.2. Urogvanilin mijenja pH i ionski sastav sline stimulirane pilokarpinom.....	48
4.2.3. Promjena odnosa protoka i ionskog sastava sline nakon primjene urogvanilina.....	50
4.3. Urogvanilin mijenja izražaj mRNA za ionske transportere neovisno o gvanilat-ciklazi C u submandibularnim žlijezdama slinovnicama.....	51
4.3.1. Urogvanilin povećava izražaj mRNA za član 6 obitelji 26 transportera otopljenih tvari u submandibularnim žlijezdama slinovnicama.....	51
4.3.2. Izražaj mRNA za član 6 obitelji 26 transportera otopljenih tvari i $\text{Na}^+/\text{H}^+$ izmjenjivač izoforme 3 je viši u submandibularnim žlijezdama slinovnicama životinja kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C.....	52
4.3.3. Odnos protoka i ionskog sastava sline s izražajem transportera i kanala u submandibularnim žlijezdama slinovnicama.....	56
4.4. Urogvanilin primijenjen sistemno mijenja izražaj ionskih transportera i u drugim organima.....	56
4.4.1. Duodenum.....	56
4.4.1.1. Sistemna primjena urogvanilina u duodenumu povećava izražaj mRNA za transportere hidrogenkarbonata i klora.....	57
4.4.1.2. Izražaj mRNA za članove 3 i 6 obitelji 26 transportera otopljenih tvari, izmjenjivače $\text{Na}^+$ i $\text{H}^+$ te kanale za vodu je viši u životinja kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C.....	58
4.4.2. Bubrež.....	59
4.4.2.1. Sistemna primjena urogvanilina u kori bubrega ne mijenja izražaj ionskih transportera niti kanala za vodu.....	59

4.4.2.2. Izražaj mRNA za član 6 obitelji 26 transportera otopljenih tvari i transmembranski regulator provodljivosti za cističnu fibrozu je viši u kori bubrega životinja kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C .....	60
4.4.3. Pluća .....	60
4.4.3.1. Urogvanilin primijenjen sistemno povećava izražaj mRNA za kanale za vodu 3 .....	61
4.4.3.2. Izražaj mRNA za kanale za vodu i ionske transportere nije promijenjen u životinja kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C .....	61
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>63</b>
5.1. Urogvanilin smanjuje stvaranje sline stimulirane pilokarpinom te u slini povećava koncentraciju $H^+$ , $Na^+$ i $Cl^-$ .....	64
5.2. Urogvanilin povećava izražaj mRNA za izmjenjivače $Cl^-$ i $HCO_3^-$ .....	66
5.3. Sistemni urogvanilin mijenja izražaj ionskih transportera i u ostalim organskim sustavima .....	67
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>70</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>72</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>98</b>

## POPIS SKRAĆENICA:

<b>Ach</b>	Acetilkolin (engl., <i>acetylcholine</i> )
<b>AE2</b>	Izmjenjivač $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (engl., <i>Anion exchange protein 2</i> )
<b>ANP</b>	Atrijski natrijuretski peptid
<b>AQP</b>	Akvaporini (engl., <i>aquaporins</i> )
<b>ATP</b>	Adenozin-3-fosfat
<b>BL</b>	Bazolateralna
<b>BNP</b>	Moždani natrijuretski peptid (engl., <i>Brain natriuretic peptide</i> )
<b>cAMP</b>	Ciklički adenozin-monofosfat
<b>CCK</b>	Kolecistokinin
<b>cDNA</b>	Komplementarna DNA (engl., <i>complementary DNA</i> )
<b>CF</b>	Cistična fibroza
<b>CFTR</b>	Transmembranski regulator provodljivosti za cističnu fibrozu (engl., <i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> )
<b>cGMP</b>	Ciklički gvanozin-monofosfat
<b>CGRP</b>	Peptid povezan s kolecistokininskim genom (engl., <i>Calcitonin gene-related peptide</i> )
<b>CNP</b>	Natrijuretski peptid tip C (engl., <i>C-type natriuretic peptide</i> )
<b>ENaC</b>	Epitelni kanal za $\text{Na}^+$ (engl., <i>Epithelial <math>\text{Na}^+</math> channel</i> )
<b>GC-A</b>	Gvanilat-ciklaza A
<b>GC-B</b>	Gvanilat-ciklaza B
<b>GC-C</b>	Gvanilat-ciklaza C
<b>GC-C KO</b>	Životinje kojima nedostaje gen za GC-C (engl., <i>GC-C knock out animals</i> )
<b>GC-C WT</b>	Divlji tip životinja iz istog legla kao i GC-C KO životinja
<b>GI</b>	Gastro-intestinalni sustav
<b>GN</b>	Gvanilin
<b>GP</b>	Gvanilinski peptid
<b>GTP</b>	Gvanozin-trifosfat
<b>i.p.</b>	Intraperitonealna
<b>IP3</b>	Inozitol-3-fosfat
<b>IRBIT</b>	Protein koji se natječe s inozitol-3-fosfatom
<b>NBCe1</b>	Elektrogeni $\text{Na}^+$ i $\text{HCO}_3^-$ kotransporter izoforme 1 (engl., <i>Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter</i> )
<b>NBCn1</b>	Elektroneutralni $\text{Na}^+$ i $\text{HCO}_3^-$ kotransporter izoforme 1 (engl., <i>Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter</i> )

<b>NHE</b>	Natrij-proton izmjenjivač (engl., <i>Sodium proton exchanger</i> )
<b>NKCC1</b>	Kotransporter za $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ izoforma 1 (engl., <i><math>\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-</math> co-transporter 1</i> )
<b>NPR-C</b>	Receptor natrijuretskih peptida C (Receptor čistač) (engl., <i>Natriuretic peptide receptor C</i> )
<b>OSR1</b>	Kinaza koja se aktivira kao odgovor na oksidativni stres (engl., <i>Oxidative stress responsive kinase 1</i> )
<b>PA</b>	Parotidna
<b>pb</b>	Parovi baza
<b>PCR</b>	Lančana reakcija polimerazom (engl., <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PDE</b>	Fosfodiesteraza
<b>PKA</b>	Protein-kinaza A
<b>PKC</b>	Protein-kinaza C
<b>PKG</b>	Protein-kinaza G
<b>PLC</b>	Fosfolipaza C (engl., <i>Phospholipase C</i> )
<b>qPCR</b>	Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl., <i>Quantitative polymerase chain reaction</i> )
<b>SEM</b>	Standardna pogreška (engl., <i>standard error mean</i> , SEM)
<b>SL</b>	Sublingvalna
<b>SLC26A3</b>	Član 3 obitelji 26 transportera otopljenih tvari (SLC26, engl., <i>Solute Carrier Family 26</i> )
<b>SLC26A6</b>	Član 6 obitelji 26 transportera otopljenih tvari (SLC26)
<b>SMB</b>	Submandibularna
<b>SPAK</b>	Kinaza bogata prolinom/alaninom povezana sa SPS1 (engl., <i>SPS1-related proline alanine rich kinase</i> )
<b>STa</b>	Termo-stabilni enterotoksin Escherichia coli (engl., <i>Heat stable Escherichia coli enterotoxin</i> )
<b>STAS</b>	Antagonist transportera sulfata i antisigma čimbenika (engl., <i>Sulphate Transporter and AntiSigma factor antagonist</i> )
<b>TMEM16/Ano</b>	Obitelj anoktamina (transmembranski proteini 16)
<b>TMEM16a/Ano1</b>	Anoktamin 1
<b>UGN</b>	Urogvanilin
<b>VIP</b>	Vazoaktivni crijevni peptid (engl. <i>Vasoactive intestinal peptide</i> )
<b>WNK</b>	Kinaza bez lizina (engl., <i>With-No-Lysine kinase</i> )
<b>WT</b>	Divlji tip životinja (engl., <i>wild type</i> )

## POPIS SLIKA I TABLICA

Slika 1. Topografija velikih žlijezda slinovnica kod ljudi i miševa.....	2
Slika 2. Građa žlijezda slinovnica.....	3
Slika 3. Stvaranje primarnog sekreta žlijezde slinovnice.....	12
Slika 4. Stanice duktusa žlijezda slinovnica i njihova uloga u formiranju konačne sline.....	17
Slika 5. Model izlučivanja elektrolita u proksimalnom i distalnom duktusu pankreasa u dva koraka.....	19
Slika 6. Dva najčešća oblika enterotoksina <i>E.coli</i> .....	22
Slika 7. Aminokiselinski slijed ljudskog urogvanilina i termo-stabilnog enterotoksina.....	23
Slika 8. Ljudski gvanilin.....	24
Slika 9. Gvanilat-ciklaze A, B i C.....	25
Slika 10. Signalni put gvanilinskih peptida u crijevima.....	30
Slika 11. Gravimetrijska metoda.....	40
Slika 12. Određivanja pH i elektrolita u slini.....	41
Slika 13. Izolacija mRNA.....	42
Slika 14. Određivanje koncentracije izolirane RNA.....	43
Slika 15. Određivanje izražaja specifičnih mRNA PCR-om u stvarnom vremenu.....	44
Slika 16. Genotipizacija životinja.....	46
Slika 17. Urogvanilin smanjuje pilokarpinom stimulirano stvaranje sline.....	47
Slika 18. Urogvanilin snižava pH stimulirane sline.....	48
Slika 19. Urogvanilin povećava koncentraciju Na <sup>+</sup> i Cl <sup>-</sup> , ali koncentracija K <sup>+</sup> ostaje nepromijenjena.....	49
Slika 20. Pozitivna korelacija koncentracije Na <sup>+</sup> i Cl <sup>-</sup> u slini u odnosu na protok sline pod djelovanjem urogvanilina nestaje u životinja kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C.....	51
Slika 21. Urogvanilin primijenjen intraperitonealno povećava izražaj mRNA za član 6 obitelji 26 transportera otopljenih tvari u submandibularnim žlijezdama slinovnicama miševa.....	52
Slika 22. U submandibularnim žlijezdama slinovnicama životinja kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C viši je izražaj mRNA za član 6 obitelji 26 transportera otopljenih tvari i Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> izmjenjivač izoforme 3 u odnosu na iste žlijezde divljeg tipa životinja.....	53
Slika 23. Urogvanilin primijenjen sistemno povećava izražaj mRNA za član 6 obitelji 26 transportera otopljenih tvari, a smanjuje za transmembranski regulator provodljivosti za cističnu fibrozu u duodenumu.....	57
Slika 24. U duodenumu životinja kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C viši je izražaj mRNA za članove 3 i 6 obitelji 26 transportera otopljenih tvari, izmjenjivače Na <sup>+</sup> i H <sup>+</sup> te kanale za vodu u odnosu na izražaj u divljeg tipa životinja.....	58



Slika 25. Urogvanilin primijenjen sistemno ne mijenja izražaj mRNA za prikazane bjelančevine stanične membrane u kori bubrega.....	59
Slika 26. U kori bubrega životinja kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C viši je izražaj mRNA za član 6 obitelji 26 transportera otopljenih tvari i transmembranski regulator provodljivosti za cističnu fibrozu u odnosu na izražaj u divljeg tipa životinja.....	60
Slika 27. Urogvanilin primijenjen sistemno povećava izražaj mRNA za kanale za vodu 3 u plućima.....	61
Slika 28. U plućima životinja kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C ne mijenja se izražaj mRNA za kanale za vodu i transportere za ione.....	62
Tablica 1. Udio proizvedene sline u različitim žlijezda slinovnica ovisno o tipu stimulacije.....	8
Tablica 2. Izražaj različitih akvaporina na membranama žlijezda slinovnica ljudi i miševa.....	11
Tablica 3. Gvanilinski peptidi i razlika u strukturi u pojedinim životinjskih vrsta.....	21
Tablica 4. Sekvence početnica korištenih pri genotipizaciji životinja kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C.....	38
Tablica 5. Protokol lančane reakcije polimerazom.....	38
Tablica 6. Promjena odnosa protoka sline i ionskog sastava nakon sistemne primjene urogvanilina.....	50
Tablica 7. Odnos protoka i ionskog sastava sline i izražaja mRNA za ionske transportere i kanale za vodu.....	54

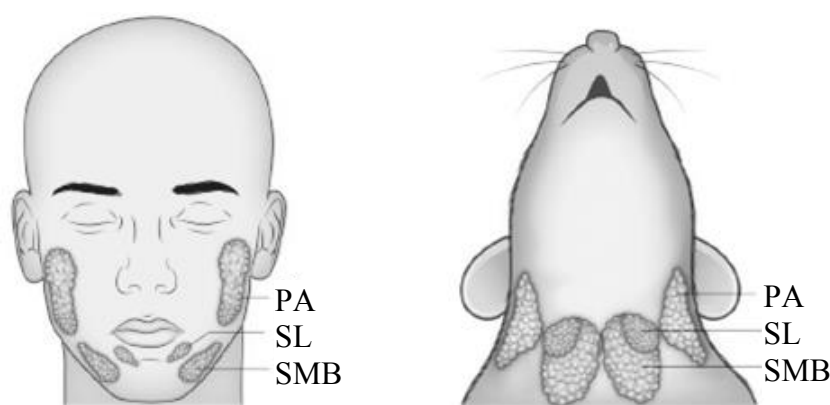


## 1.1. Žlijezde slinovnice

### 1.1.1. Građa i podjela

Ljudi i miševi imaju tri glavne žlijezde slinovnice; podušna ili parotidna (PA), podčeljusna ili submandibularna (SMB) i podjezična ili sublingvalna žlijezda (SL) (1). Osim triju glavnih žlijezda koje proizvode 90% sline, postoje još male serozne Von Ebnerove žlijezde i Blandin-Nühmove mukozne žlijezde. Nalaze se na: bukalnoj, labijalnoj, palatinalnoj, lingvalnoj (*papile circumvalate*) i retromolarnoj strani oralne sluznice, a njihov broj iznosi između 600 i 1000 (2, 3).

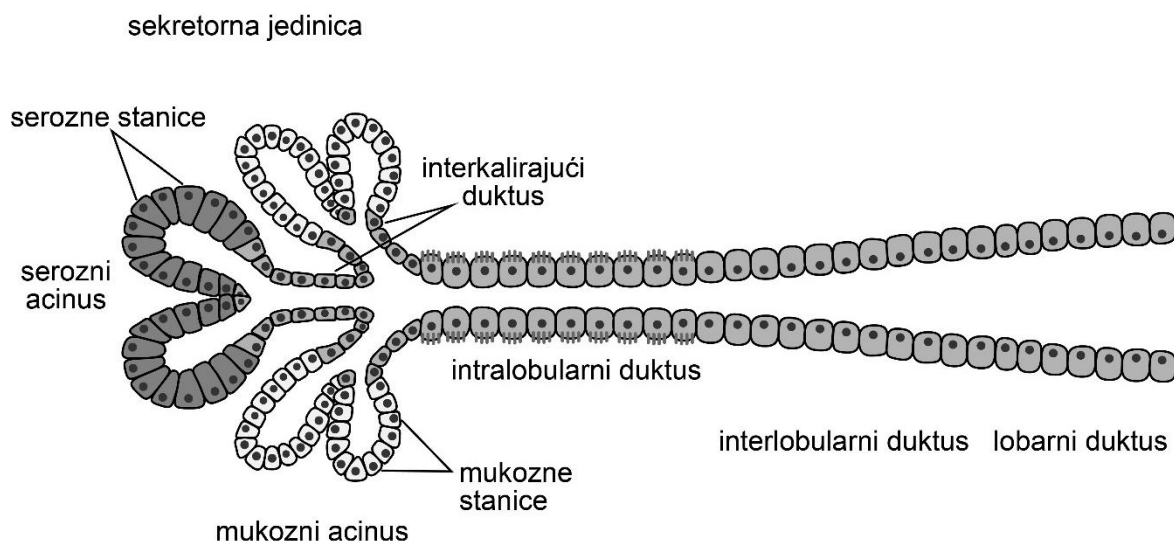
Parotidna žlijezda građena je od seroznih stanica, dok se SMB i SL žlijezde smatraju sero-mukoznim, s time da SMB žlijezda pretežno je serozna (90%), dok je SL žlijezda pretežno mukozna (4, 5). U ljudi, PA žlijezda je najveća, dok je SMB žlijezda druga po veličini i otprilike dvostruko manja. Također, smještaj SMB žlijezda nije isti kod ljudi i miševa. Ljudska SMB žlijezda smještena je u stražnjem dijelu submandibularnog trokuta, omeđena tijelom mandibule odozgo, prednjim digastričnim mišićem medijalno i stražnjim digastričnim mišićem inferiorno i lateralno. Sastoji se od većeg površinskog i dubokog lobusa, koji su odijeljeni milohoidnim mišićem. Kod miševa, ova žlijezda smještena je u ventralnoj cervikalnoj subkutanoj regiji, prekrivajući kranialni dio sternohioidnog mišića (1). SMB žlijezda miševa je najveća žlijezda slinovnica te je spojena sa SL žlijezdom dok su u ljudi ove dvije žlijezde zasebne strukture (Slika 1.) (1, 5). Izvodni kanal SMB žlijezde je jednak u obje vrste, i kod ljudi ga nazivamo ductus Whartoni.



**Slika 1. Topografija velikih žlijezda slinovnica kod ljudi i miševa.** U miševa se uočava fuzija sublingvalne (SL) i submandibularne (SMB) žlijezde, što treba uzeti u obzir prilikom kirurških postupaka. Prilagođeno prema (5). PA - parotidna žlijezda

Građa žlijezda slinovnica slična je građi ostalih žlijezda s vanjskim izlučivanjem. Stvaranje sline započinje u acinusima žlijezde (osnovna jedinica žljezdanog parenhima). Ovisno o vrsti žlijezde, acinus može biti građen od seroznih, mukoznih i seromukoznih stanica. Često se navodi da u mješovitim žlijezda slinovnica, serozne stanice priliježu na distalni kraj mukoznih stanica tvoreći kapu u obliku polumjeseca (demilune). Tu 130-godina staru činjenicu opovrgnuli su Yamashita i sur., zaključivši da se radi o artefaktu i kako su serozne stanice u razini s mukoznima i tvore zajednički lumen (6).

Acinus i interkalirajući sustav čine sekretornu jedinicu. Interkalirajući sustav čini mrežu kanalića koji se ulijevaju u intralobularni kanal, koji se ulijevaju u interlobularni, zatim u lobarni, a oni u glavni izvodni kanal žlijezde (Slika 2.). Intralobularni kanal se može podijeliti u dva morfološka tipa, tj. interkalirajući i isprugani (engl. *striated*) duktus (7, 8).



**Slika 2. Građa žlijezda slinovnica.** U ovom prikazu acinus je zasebno serozni i mukozni, dok postoje i acinusi sačinjeni od seromukoznih stanica. Zajedno s interkalirajućim sustavom čini sekretornu jedinicu koja proizvodi primarni sekret čiji sastav se mijenja prolaskom kroz izvodne kanaliće (duktuse).

Volumen izlučene sline ovisi o tome je li proizvodnja sline posljedica stimulacije ili ne. Ako govorimo o dnevnoj proizvodnji, na SMB žlijezdu otpada 65%, PA žlijezdu 23%, SL žlijezde 4%, a na male žlijezde slinovnice 8% proizvedene sline (2, 9, 10). Između obroka, većinu sline proizvode SMB i SL, dok se tijekom stimulacije ukupni volumen povećava zbog aktivacije PA žlijezde koja u tom slučaju proizvodi 70% stimulirane sline (2, 11, 12).

### 1.1.2. Regulacija izlučivanja sline

Iako mehanizmi podraživanja nisu do kraja razjašnjeni, regulacija salivacije se vrši preko tri mehanizma: neuralnog, endokrinog i parakrinog.

#### 1.1.2.1. Neuralna regulacija

Autonomni živčani sustav regulira funkciju žlijezda slinovnica. Parasimpatička vlakna izlaze iz gornje salivatorne jezgre i šalju impulse duž VII. kranijalnog živca (*n. facialis*) u SMB i SL žlijezdu, dok donja salivatorna jezgra šalje impulse IX. kranijalnim živcem (*n. glossopharyngeus*) u PA žlijezdu.

Parasimpatički sustav luči acetilkolin (ACh), koji aktivira M1 i M3 muskarinske receptore smještene na stanicama duktusa i acinusa. (13-17). Takvo podraživanje stimulira stanice na proizvodnju i izlučivanje velike količine sline. Stimulirana slina ima veliki protok, seroznog je karaktera i sadrži malu količinu organskih i anorganskih komponenti (12, 18).

Simpatička vlakna dolaze iz gornjeg cervikalnog ganglija i slijede krvne žile do žlijezda slinovnica, podražuju  $\beta$ -adrenergične receptore te uzrokuju porast unutarstaničnog cikličkog adenozin-monofosfata (cAMP), što djeluje na proizvodnju sline bogate enzimima ( $\alpha$ -amilaza) i ostalim organskim molekulama. (19-21). Takva slina je mukoznog karaktera i manjeg volumena, jer simpatikus podražuje i stanice duktusa regulirajući transport elektrolita. (22, 23).

##### 1.1.2.1.1. Neuropeptid Y

Neuropeptid Y (NPY) je peptid koji se uz noradrenalin izlučuje putem kromatofilnih stanica nadbubrežne žlijezde i simpatičkih živaca. Njegova prisutnost u živčanim završetcima je pokazana u svim velikim žlijezdama slinovnicama štakora (24, 25).

Neuropeptid Y se također oslobađa i iz parasimpatičkih živaca koji čiji završeci se nalaze u i duktusima i u acinusima (24, 25). Hauser-Kronberger i sur. su pokazali da ljudska PA i SMB žlijezda slinovnica sadrži mnogobrojna živčana vlakna s navedenim neuropeptidom (26).

#### 1.1.2.1.2. *Vazoaktivni crijevni peptid*

Vazoaktivni crijevni peptid (VIP, engl. *Vasoactive intestinal peptide*) je peptid koji uzrokuje vazodilataciju u mnogim organima, a time i bolju opskrbu tkiva krvlju te smanjuje periferni otpor i krvni tlak. Njegov najveći izražaj je u gastro-intestinalnom traktu (GI) i živčanom sustavu (27). Strukturno je sličan glukagonu i sekretinu, a sličnost pokazuje i s hormonom koji oslobađa hormon rasta (GHRH, engl. *growth hormone-releasing hormone*), peptidom koji aktivira hipofiznu adenilat-ciklazu (PACAP, engl. *pituitary adenylate cyclase-activating peptide*), histidin-izoleucinskim peptidom i drugima (27). Ekström i sur. su demonstrirali učinak VIP-a na lučenje sline iz štakorske SMB žlijezde nakon parasimpatičke denervacije i decentralizacije, a kod PA žlijezde slinovnice nakon simpatičke denervacije (28). Učinak navedenog peptida pokazan je i kod pacijenata koji boluju od Syögrenovog sindroma. Naime, sakupljena slina nakon tretmana akupunkturom pokazala je značajan porast koncentracije VIP-a naspram njegove koncentracije prije tretmana (29).

#### 1.1.2.1.3. *Tvar P*

Postoji skupina spojeva sličnih adrenergičnim i kolinergičnim agonistima čije lučenje pojačava sekreciju sline u žlijezdama slinovnicama sisavaca. Ti spojevi spadaju u skupinu tahikina, a jedan od njih je tvar P, koju su izolirali Erspamer i sur. 1981. godine (30). Istraživanja pokazuju da intra-arterijska infuzija supstance P uzrokuje pojačanu sekreciju SMB i PA žlijezda kod anesteziranih štakora (31), dok je intravenozna primjena aktivirala kolinergičke receptore što dovodi do pojačane proizvodnje i sekrecije sline, enzima i elektrolita u SMB i PA žlijezdi slinovnici štakora (32).

#### 1.1.2.1.4. *Peptid povezan s kalcitoninskim genom*

Izražaj peptida povezanog s kalcitoninskim genom (engl., *Calcitonin gene-related peptide*, CGRP) je najveći u središnjem i perifernom živčanom sustavu, ali nalazimo ga i u krvnim žilama, visceralnim organima i srži nadbubrežne žlijezde (33-35). Zbog ovakvog izražaja u nekoliko žljezdanih tkiva, Rossenfeld i sur. zaključuju kako mu je uloga endokrini i da sudjeluje u regulaciji kardiovaskularnog sustava (33). CGRP pozitivna živčana vlakna nalaze se na krvnim žilama i velikim izvodnim kanalićima, te u manjoj mjeri i u malim duktusima velikih žlijezda slinovnica. Nakon primjene CGRP intravenozno, proizvodnja štakorske sline se ne mijenja, ali količina amilaze u slini se mijenja (36). Kod anesteziranih

goveda je pokazano da prilikom intra-arterijske aplikacije CGRP-a i električne stimulacije chorde tympani dolazi do porasta proizvodnje sline i salivarnih proteina (37).

#### *1.1.2.2. Endokrina/parakrina regulacija*

##### *1.1.2.2.1. Inzulin*

Jedna od komponenti sline je prolinom-bogati peptid za koji je pokazano da, kad se primjeni na pankreas štakora, potiče oslobađanje inzulina i inhibira oslobađanje glukagona inducirano argininom (38, 39). Osim toga, inzulinu-sličan peptid nalazi se u ljudskim SMB i PA žlijezdama slinovnicama te slini (40, 41). Žlijezde slinovnice također izražavaju i peptid sličan glukagonu (42).

Izražaj inzulina i na proteinskoj i na mRNA razini pokazan je u miševa i štakora (43, 44). Postojanje veze između inzulina proizvedenog u  $\beta$ -stanicama pankreasa i inzulina u slini pokazuje istraživanje na ljudskim ispitanicima koje ukazuje na to da je koncentracija inzulina u slini niža od plazmatskog inzulina, ali se prilikom unosa hrane njegova koncentracija povećava (45). Isti rezultat dobiven je na mišjim modelima, gdje koncentracija inzulina u slini pozitivno korelira s plazmatskom koncentracijom glukoze (40). Nadalje, kod ljudskih ispitanika davanje inzulina intravenski dovodi do porasta koncentracije inzulina u slini (46). Učinak inzulina na funkciju žlijezda slinovnica proučena je kod osoba oboljelih od šećerne bolesti tipa 1 kod kojih je smanjena brzina stvaranja sline te je u slini veća koncentracija kalija i bjelančevina u odnosu na zdrave ispitanike (47).

##### *1.1.2.2.2. Kolecistokinin*

Učinak GI peptidnih hormona na sekreciju žlijezda slinovnica pokazali su Aras i sur. primjenom kolecistokinina (CCK) intravenski, što dovodi do sekrecije amilaze u PA žlijezdi i sekrecije vode u SMB žlijezdama slinovnicama štakora. Nadalje, na proteinskoj razini receptori za CCK (izoforme A i B) pronađeni su i kod normalnih i kod denerviranih žlijezda (48).

##### *1.1.2.2.3. Aktivacija purinoreceptora*

Na temelju istraživanja koja su prepoznala purinoreceptore kao receptore za nukleotide (49), Gallacher prvi puta pokazuje da porast izvanstaničnih nukleotida, prvenstveno adenozin-3-fosfata (ATP), uzrokuje povećanje membranske vodljivosti, ulazak radioaktivnog rubidija ( $^{86}\text{Rb}$ ) u stanice i sekreciju amilaze u PA žlijezdi miša. Nadalje, pokazana osjetljivost na kinidin

upućuje da se radi o P2 tipu receptora (afinitet:  $ATP > ADP >> AMP$ ) (50). Stanice žlijezda slinovnica izražavaju veliku zastupljenost ionotropnih (ionski kanal) P<sub>2</sub>X receptora i metabotropnih (spregnut s G-proteinom) P<sub>2</sub>Y receptora na svojim apikalnim i bazalnim membranama. Njihova aktivacija uzrokuje povećanje unutarstanične koncentracije Ca<sup>2+</sup>, što dovodi do povećane sekrecije sline te porasta koncentracije elektrolita (51-54).

#### 1.1.2.2.4. Gvanilinski peptidi

Kako je pokazan parakrini put regulacije u mnogim organskim sustavima (GI, bubreg, srce, pankreas itd.), očekivalo se da ljudski gvanilin (GN) i urogvanilin (UGN) imaju isti put regulacije i u žlijezdama slinovnicama, što su pokazali Kulaksiz i sur. (55). Kako su gvanilinski peptidi (GP) tema ove disertacije, njihova uloga i funkcija bit će detaljno obrađena kasnije.

#### 1.1.3. Sastav sline

Slina je izvanstanični produkt koji proizvode i izlučuju žlijezde slinovnice. Sačinjena je od 99% vode (7, 56), a ostali udio u slini čine elektroliti, enzimi, imunoglobulini, regulatorni peptidi, čimbenici rasta, mukozni glikoproteini i antimikrobne bjelancevine (56-58).

Uloga sline u usnoj šupljini je višestruka: sudjeluje u oblikovanju zalogaja, razlučivanju okusa, probave i artikulacije. Također ima protektivna svojstva: obrana od mikroorganizama (bakterije, virusi, gljivice) i zaštita tvrdog zubnog tkiva puferskim djelovanjem i podmazivanjem. Slina također sudjeluje u remineralizaciji i sprječavanju demineralizacije zubi (59, 60). Kod životinja, slina pomaže u termoregulaciji (dahtanje i vlaženje krzna), sekreciji otrova, izlučivanju elektrolita te pomaže pri sisanju (brtvljenje) (4).

Količina izlučene sline, njezin sastav, puferski kapacitet, reološka svojstva, aktivnost amilaze, sadržaj proteina i mucina u izlučenoj slini može varirati ovisno o vrsti stimulacije i žlijezdama koje sudjeluju u proizvodnji, odnosno omjeru seroznih i/ili mukoznih tkiva (61).

Sastav sline se mijenja nakon izlučivanja u usnu šupljinu, te nije isključivo produkt žlijezda slinovnica. Takvu slina nazivamo sveukupna slina (engl., *whole saliva*), ona sadrži sluz i stanice gornjih dišnih puteva, mikrobe i produkte njihovog metabolizma, te GI refluks. Osim toga, iz epitela gingivnog sulkusa izlučuje se 2–3 μl/h tekućine, koja je intersticijska tekućina, a naziva se gingivalna sulkusna tekućina (62).



**Tablica 1. Udio proizvedene sline u različitim žlijezda slinovnica ovisno o tipu stimulacije**

	Spavanje	Bez stimulacije	Mehanička stimulacija	Stimulacija C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>
Parotidna žlijezda	0	21	58	45
Submandibularna žlijezda	72	70	33	45
Sublingvalna žlijezda	14	2	2	2
Male žlijezde slinovnice	14	7	7	8

Prilagođeno prema (22). C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> – limunska kiselina.

Zdrava osoba dnevno proizvede ukupno 1000-1500 mL sline odnosno 0,5 mL/min. Udio proizvedene sline tijekom stimulacije, primjerice hranom, čini 80-90% dnevne proizvodnje (Tablica 1.) (9, 56, 63). Sastav i količina izlučene sline ovise o mirisu, okusu, žvakanju, oralnoj higijeni, dobi, lijekovima i fizičkoj aktivnosti. Proizvodnja sline tijekom sna može gotovo prestati, dok se tijekom obroka može povećati na 6 mL/min (22, 64). Dakle, najveći udio ukupne proizvodnje sline tijekom dana (80-90%) otpada na stimulirano stvaranje sline (56). Raspon pH sline iznosi od 6,2 do 7,6 i održava kiselost usne šupljine blizu neutralne. Neutralizacija kiselina koje proizlaze iz metabolizma bakterija ili unosa kiselih napitaka, omogućena je zahvaljujući puferskom kapacitetu sline (65).

S obzirom na brojne komponente prisutne u slini, Glantz dijeli njen sadržaj na četiri komponente: 1. vodena faza koja služi kao otapalo za molekule topljive u vodi; 2. mrežasta struktura nalik na skelu koja sadrži brojne glikoproteine velike molekularne mase; 3. makromolekule poput proteina teško topljivih u vodi koji se nalaze unutar proteinskih filamenata u jezgri mrežaste strukture; 4. odljuštene epitelne stanice, dispergirani lipoidni materijal i strane čestice netopljive u vodi (66).

Unatoč tome što se slina sastoji od 99% vode, zbog svojih reoloških svojstava, slina ne dijeli s vodom iste karakteristike. Naime, sadržaj velikih molekula glikoproteina i mucina daje slini karakteristiku ne-njutnovske tekućine (67). Postoje istraživanja u kojima su reološka svojstva sline uspoređivana sa svojstvima gela (67, 68), pri čemu su Waterman i sur. zaključili da slina formira gel fazu samo na površinskom sloju na granici tekućine i zraka (69). Svojstva sline mogu biti različita ovisno o tipu žlijezde koja ih izlučuje, bilo da govorimo o stimuliranoj ili ne stimuliranoj slini. Kako je PA žlijezda seroznog karaktera, sadržaj mucina je nizak što daje slini karakteristike njutnovske tekućine i malo veće viskoznosti od vode.

SMB i SL žlijezda su mješovite, pa slina pokazuje svojstva ne-njutnovske tekućine čija se viskoznost smanjuje posmičnim stanjivanjem (engl. *shear thinning*). Stimulirana slina, koja se sastoji 70% od proizvodnje PA žlijezde, pokazuje karakteristike poput nižeg viskoziteta i većeg frikcijskog koeficijenta nego nestimulirana slina, vjerojatno zbog većeg sadržaja proteina (70). Istraživanje provedeno od strane Vijajya i sur. pokazuje pozitivnu korelaciju između fibroelastičnosti sline i sadržaja mucina i iona, no značajno nižu fibroelastičnost stimulirane sline i odnosa mucina, proteina i iona nisu mogli objasniti (71).

Slina pokazuje visoka elastična svojstva na što ukazuje rad Hawarda i sur. gdje su rezultati viskozimetrije sline pokazali Troutonov omjer (*omjer ekstenzijske viskoznosti i posmične viskoznosti*) oko 120 (72). Uloga specifične elastičnosti i viskoznosti sline je u tome što omogućuje njenu adherenciju na tvrda i meka tkiva usne šupljine, oblaganje bolusa i smanjenje frikcije tijekom žvakanja i govora (59).

Zbog sadržaja fosfolipida i saterina, salivarnih proteina male molekularne mase koji čine biološki aktivne sastojke, površinska napetost nestimulirane sline iznosi 57 mN/m i manja je od površinske napetosti vode (70 mN/m) (73-75). To dovodi do boljeg oblaganja raznolike hrane koja dospije u usta i bolje probave.

Prema tome, bioreološka svojstva ne samo sline nego i ostalih tjelesnih tekućina, poput krvi (76-78), sinovijalnih tekućina zglobnih tkiva (79) i likvora (80) imaju bitnu ulogu u fiziologiji i patofiziologiji mnogih staničnih procesa. U bolestima poput Sjögrenovog sindroma i cistične fibroze (CF) reološka svojstva plućnog sekreta, sline i suza su izmijenjena, što dovodi do komplikacija s kojima se pacijenti suočavaju (81-84).

#### 1.1.4. Stvaranje primarnog sekreta

Dobivanje sline kao konačnog produkta u usnoj šupljini nije jednostavan proces. U stvaranje sline uključeni su mnogi transportni mehanizmi poput difuzije, ultrafiltracije i pinocitoze kako bi slina sadržavala sve komponente. Iako su mnogi modeli pokušali objasniti točan proces proizvodnje i izlučivanja sline, točan mehanizam još nije poznat.

Ono u čemu se većina znanstvenika slaže je da slina kao konačni produkt prolazi kroz dvije faze opisane prvi puta 1954. godine od strane Thyasena i sur. (85). U prvoj fazi stanice acinusa proizvode primarni sekret (primarna slina), izotoničnu plazmi-sličnu tekućinu, a u

drugoј fazi novonastali primarni sekret prolazi kroz lumen izvodnih kanalića (duktusi) čije stanice pomažu u transportu elektrolita, a time i modifikaciji primarnog sekreta. Takav izmijenjeni sekret hipotoničnog je karaktera i nazivamo ga konačna ili sekundarna slina.

#### *1.1.4.1. Bazolateralna membrana acinusnih stanica*

Kao što je prethodno navedeno, u prvoj fazi slina je izotonična (300 mOsm/L) i naziva se primarni sekret (18, 51, 56, 86, 87). Kako bi acinusi mogli proizvesti NaCl-om bogatu tekućinu, potrebna je aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPaze na bazolateralnoj (BL) membrani. Hidrolizom jedne molekule ATP-a izmjenjuju se  $3\text{Na}^+$  za  $2\text{K}^+$  i stvara se gradijent koji omogućuje ulazak iona  $\text{Cl}^-$  preko transportera na BL membrani (88-90).

##### *1.1.4.1.1. Elektroneutralni kotransporter za $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ izoforma 1*

Kotransporter za  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  (engl.,  *$\text{Na}^+/\text{K}^+-2\text{Cl}^-$  co-transporter*, NKCC izoforma 1) glavni je transporter za  $\text{Cl}^-$ , odgovoran za većinu njegovog transporta u citoplazmu. Na taj način koncentracija  $\text{Cl}^-$  u stanici je veća (56, 91). Miševi kojima nedostaje gen za NKCC1 (NKCC1-KO) izlučuju 60% manje sline nakon stimulacije muskarinskim agonistom (91).

##### *1.1.4.1.2. Izmjenjivač $\text{Cl}^-$ i $\text{HCO}_3^-$*

Drugi transporter koji se nalazi na BL membrani i odgovoran je za ulazak iona  $\text{Cl}^-$  u stanicu je izmjenjivač  $\text{Cl}^-$  i  $\text{HCO}_3^-$ , AE2 (engl., *Anion exchange protein 2*). On omogućuje da ioni  $\text{Cl}^-$  uđu u stanicu u zamjenu za ione hidrogenkarbonata ( $\text{HCO}_3^-$ ) (56).

##### *1.1.4.1.3. Izmjenjivač $\text{Na}^+$ i $\text{H}^+$*

Na BL membrani se također nalazi i izmjenjivač  $\text{Na}^+$  i  $\text{H}^+$  (engl., *Sodium proton exchanger*, NHE izoforma 1) koji prenosi  $\text{Na}^+$  u stanicu uz zamjenu za  $\text{H}^+$ . Posljedično tome, koncentracija  $\text{H}^+$  iona se u citoplazmi smanjuje, što povisuje stanični pH i koncentraciju  $\text{HCO}_3^-$ , koji se preko AE2 prenose u intersticij. Sve to dovodi do akumulacije  $\text{Cl}^-$  u citoplazmi stanica acinusa za više od 5 puta u odnosu na intersticij (60 mM) (51, 92-94).

### 1.1.4.2. Luminalna (apikalna) membrana acinusnih stanica

#### 1.1.4.2.1. Obitelj anoktamina (transmembranski proteini 16)

Obitelj transmembranskih proteina 16, koji se još nazivaju i anoktaminima (transmembranski proteini 16, TMEM16/Ano), broji nekoliko članova od kojih su neki kloridni kanali, a izražaj njihove mRNA je pronađen u stanicama žlijezda slinovnica i pankreasa (95-97). TMEM16a/Ano1 (Anoktamin1) je ionski kanal koji je aktiviran porastom iona  $Ca^{2+}$ , a njegovo otvaranje omogućuje izlazak unutarstaničnog  $Cl^-$ . Njegov veliki izražaj je na luminalnoj membrani stanica acinusa, dok na luminalnoj membrani stanica duktusa nije pronađen.

#### 1.1.4.2.2. Akvaporini

Akvaporini (AQP) su velika obitelj kanala koja ima 12 članova (AQP0-12), čija je glavna uloga omogućiti prolazak molekula  $H_2O$  kroz staničnu membranu. Osim vode, AQP mogu prenositi ureju, glicerol i  $CO_2$  (87, 98, 99).

**Tablica 2. Izražaj različitih akvaporina na membranama žlijezda slinovnica ljudi i miševa**

ČOVJEK ACINUS	MIŠ ACINUS
AQP1 ~	AQP1 ~
AQP3 ~	AQP3 bazalna
AQP4 ~	AQP4 bazalna
AQP5 luminalna	AQP5 bazalna/luminalna
AQP8 ~	AQP8 bazalna
ČOVJEK DUKTUS	MIŠ DUKTUS
AQP3 bazalna	AQP3 bazalna
AQP5 ~	AQP4 bazalna
AQP4 ~	AQP5 luminalna
AQP8 ~	AQP8 bazalna

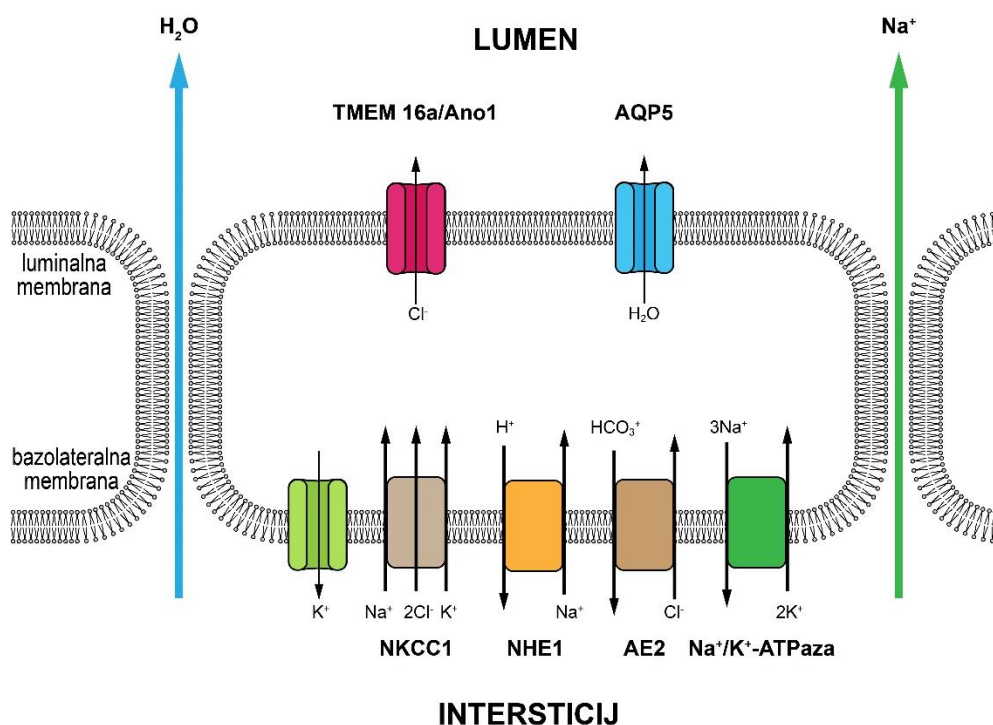
Prilagođeno prema (87). AQP- akvaporin

U žlijezdama slinovnicama ljudi, AQP5 je najzastupljeniji kanal za vodu te se nalazi isključivo na luminalnim membranama seroznih i mukoznih stanica acinusa (100, 101). Do sada nije pronađen izražaj drugih AQP-a na luminalnim membranama stanica žlijezda slinovnica, a važnost ovog kanala u transportu vode pokazuje istraživanje na miševima kojima nedostaje gen za AQP5, kod kojih je proizvodnja sline za 60% manja u odnosu na divlji tip (WT, engl., *wild type*) životinja (102).

AQP3 se nalazi na BL membrani seroznih i mukoznih stanica acinusa, ali i na BL membrani stanica duktusa (103, 104). U žlijezdama slinovnicama miševa, AQP3 se nalazi na bazalnom dijelu acinusa, dok se AQP5 nalazi i na BL i na apikalnoj membrani (Tablica 2.) (105-107).

#### 1.1.4.3. Mehanizam stvaranja primarnog sekreta

Prilikom stimulacije žlijezda slinovnica ACh-om, aktivira se G-protein koji posljedično aktivira fosfolipazu C i stvaranje inozitol-3-fosfata (IP<sub>3</sub>), što dovodi do porasta unutarstanične koncentracije Ca<sup>2+</sup> (56). Ca<sup>2+</sup> uzrokuje aktivaciju apikalnog TMEM16a/Ano1 i BL kanala za K<sup>+</sup> (88, 108, 109). Aktivirani TMEM16a/Ano1 kanali uzrokuju izlazak unutarstaničnog Cl<sup>-</sup> u luminalni prostor acinusa. Ioni K<sup>+</sup>, s druge strane, prolaze kroz aktivirane K<sup>+</sup> kanale na BL membrani u intersticij (Slika 3.) (56, 91).



**Slika 3. Stvaranje primarnog sekreta žlijezde slinovnice.** Stimulacija acetilkolinom uzrokuje otvaranje TMEM16a/Ano1 (Anoktamin 1) kanala i izlazak Cl<sup>-</sup> u lumen acinusa, što stvara negativni naboj unutar lumena te difuziju Na<sup>+</sup> paracelularno. Zbog veće koncentracije NaCl u lumenu, voda osmozom ulazi u početni dio izvodnog sustava žlijezda slinovnica ili paracelularno ili putem aktiviranih akvaporina (AQP). NKCC1 - elektroneutralni kotransporter za Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> izoforma 1; AE2 - izmjenjivač Cl<sup>-</sup> i HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> izoforma 2; NHE1: izmjenjivač Na<sup>+</sup> i H<sup>+</sup>

Zbog izlaska  $\text{Cl}^-$  u luminalni prostor acinusa, stvara se negativni naboj, što uzrokuje difuziju  $\text{Na}^+$  paracelularno u luminalni prostor. Zbog novonastalog porasta koncentracije natrija i klora, voda osmozom dopijeva u lumen acinusa većinom kroz AQP5 i paracelularno (Slika 3.) (110, 111).

#### 1.1.5. Obrada primarne sline u izvodnim kanalčićima

##### 1.1.5.1. Ionski transporteri i kanali za vodu u izvodnim kanalima žlijezda slinovnica

Izvodni kanalčići žlijezda slinovnica su odgovorni za modifikaciju sline i stvaranje konačnog produkta koji se izlučuje u usnu šupljinu. Istraživanja duktalnih stanica ne prate istraživanja acinusnih stanica jer te stanice imaju veliku ulogu i u sekreciji ostalih komponenti sline poput mucina, amilaza i proteina, a ne samo elektrolita. Danas je dostupnost novih biotehnologija veća te one omogućavaju bolje proučavanje i razumijevanje uloge samog duktusa (112).

##### 1.1.5.1.1. Kinaza bez lizina i kinaza bogata prolinom/alaninom

WNK/SPAK je kompleks WNK kinaze (kinaza bez lizina, engl., *With-No-Lysine kinase*) i SPAK kinaze (kinaza bogata prolinom/alaninom povezana sa SPS1, engl., SPS1-related proline alanine rich kinase) ili SPAK homologa OSR1 (aktivira se u sklopu odgovora na oksidativni stres, engl., *oxidative stress responsive kinase 1*). Ovaj kompleks djeluje kao osmotski senzor tijekom smanjenja unutarstanične i izvanstanične koncentracije  $\text{Cl}^-$  ili promjene izvanstanične osmolarnosti te mijenja izražaj površinskih kotransportera za  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  i  $\text{Cl}^-$  (113-115). Njegova funkcija u duktusu pankreasa i žlijezda slinovnica je u tome da, za vrijeme nestimuliranih uvjeta, gdje je koncentracija  $\text{Cl}^-$  normalna, WNK djeluje preko SPAK smanjujući aktivnosti CFTR-a (transmembranski regulator provodljivosti za cističnu fibrozu, engl. *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) i NBCe1-a (elektrogeni kotransporter  $\text{Na}^+$  i  $\text{HCO}_3^-$  izoforma 1, engl. *Sodium-bicarbonate cotransporter*) u proksimalnom duktusu (116).

##### 1.1.5.1.2. Protein koji se veže na receptor za inozitol-3-fosfat

Protein koji se veže na receptor za inozitol-3-fosfat (IRBIT, engl. *inositol 1,4,5-trisphosphate receptors binding protein*) natječe se s inozitol-3-fosfatom (IP3) na veznom

mjestu smještenom na N-terminalnoj domeni receptora. IRBIT je odgovoran za regulaciju staničnog signaliziranja  $\text{Ca}^{2+}$  kao drugim glasnikom (117-119). Naknadno je utvrđeno da ovaj signalni put regulira aktivnost  $\text{Na}^+$  i  $\text{HCO}_3^-$  kotransportera izoforme 1 (120). Izražaj IRBIT-a pronađen je na apikalnim i BL površinama duktusa gdje sudjeluje u regulaciji funkcije  $\text{H}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  i  $\text{HCO}_3^-$  transportera (120-122).

#### 1.1.5.1.3. Elektrogeni $\text{Na}^+$ i $\text{HCO}_3^-$ kotransporter izoforme 1

Elektrogeni  $\text{Na}^+$  i  $\text{HCO}_3^-$  kotransporter izoforme 1 (NBCe1) pripada obitelji  $\text{Na}^+$  i  $\text{HCO}_3^-$  kotransportera. Boron i sur. su 1983. godine otkrili NBCe1 na epitelu bubrežnih proksimalnih kanalića daždevnjaka (123), a 1997. godine Romero i sur. izolirali su cDNA koja kodira ovaj transporter (124). Nakon toga, pronađene su i druge izoforme transportera u bubrezima (125), pankreasu (125-128), mozgu (129, 130) i GI traktu (131). U žlijezdama slinovnicama predloženo je postojanje ovog  $\text{Na}^+$  i  $\text{HCO}_3^-$  kotransportera 1996. godine kako bi se objasnila visoka koncentracija  $\text{HCO}_3^-$  u primarnoj slini PA-i ovaca (132).

NBCe1 je elektrogeni kotransporter. Izražaj NBCe1-B u žlijezdama slinovnicama je pokazan na BL membranama acinusa i duktusa miša. Ovaj transporter igra važnu ulogu u transportu  $\text{HCO}_3^-$  zajedno s  $\text{Na}^+$  ( $2\text{HCO}_3^-/1\text{Na}^+$ ) u stanicu (133). Aktivacija ovog kotransportera posredovana je IRBIT-om na način da IRBIT dovodi do konformacijskih promjena NBCe1-a (disocijacija N-terminalne inhibitorne domene) i zatim ga aktivira (120).

#### 1.1.5.1.4. Elektroneutralni $\text{Na}^+$ i $\text{HCO}_3^-$ kotransporter izoforme 1

Elektroneutralni  $\text{Na}^+$  i  $\text{HCO}_3^-$  kotransporter izoforme 1 (engl., *Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter*, NBCn1) prvi put je izoliran iz skeletnih mišića (134), a njegova lokalizacija u žlijezdama slinovnicama ovisi o tipu žlijezde i životinjskoj vrsti. Kod ljudi, ovaj transporter lokaliziran je na BL membrani stanica acinusa i luminalnoj membrani stanica duktusa (135). U miševa, Luo i sur. ga nalaze u SM žlijezdama slinovnicama, točnije na apikalnoj membrani stanica duktusa i acinusa (133), dok Yan-Yang i sur. ga nalaze isključivo na apikalnoj membrani stanica duktusa (136).

Za razliku od NBCe1, NBCn1 prenosi jedan ion  $\text{HCO}_3^-$  s jednim  $\text{Na}^+$ . Ovim kotransporterom pokušava se objasniti razlika u reapsorpciji  $\text{HCO}_3^-$  prilikom aktivacije NBCn1 za vrijeme nestimulirane, odnosno inhibicije prilikom stimulirane proizvodnje sline (133). Postoji mogućnost da je ovaj elektroneutralni kotransporter reguliran IRBIT-om (137).

#### 1.1.5.1.5. Obitelj 26 transportera otopljenih tvari

Obitelj 26 transportera otopljenih tvari (SLC26, engl., *Solute Carrier Family 26*) je velika skupina transportera koja se sastoji od 10 članova, a njihov izražaj je nađen na apikalnim membranama stanica pluća, bubrega, pankreasa i GI trakta (138, 139).

Ovi transporteri imaju višestruku ulogu, od primjerice transporta  $\text{SO}_4^-$  (član 1 - SLC26A1, član 2 - SLC26A2) (140) do izmjene  $\text{Cl}^-$  i  $\text{HCO}_3^-$  (član 3 - SLC26A3, član 6 - SLC26A6) (141, 142).

Duktusi žlijezda slinovnica i pankreasa pokazuju slične osobine vezane uz sekreciju i apsorpciju  $\text{Cl}^-$  i  $\text{HCO}_3^-$ , stoga imaju i slične anionske izmjenjivače iz porodice SLC26 proteina; SLC26A2, A4, A6, A11 (143-145).

SLC26A6 je dominantan anionski izmjenjivač i ima ključnu ulogu u  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  kontratransportu kroz luminalnu membranu. Ovaj izmjenjivač je kloniran 2000. godine (146), a godinu dana kasnije pokazan je njegov izražaj u mišjem bubregu (147).

#### 1.1.5.1.6. Transmembranski regulator provodljivosti za cističnu fibrozu

CFTR je kloridni kanal ovisan o cAMP-u i PKA-i (protein-kinaza ovisna o cAMP-u) te se nalazi na luminalnim membranama izvodnih kanalića mnogih organa, uključujući žlijezde slinovnice i pankreas. Elektrofiziološka istraživanja na ljudskom i mišjem tkivu pankreasa utvrdila su da je permeabilnost CFTR-a za ione  $\text{Cl}^-$  pet puta veća nego za  $\text{HCO}_3^-$  (148-151). CFTR, osim funkcije kanala, također ima fiziološku ulogu u regulaciji drugih transportera i time regulira sastav izlučevina (elektrolita i vode). Jedan od primjera te regulacije je povezanost CFTR-a sa SLC26 transporterima u kontroli sekrecije  $\text{HCO}_3^-$  (138, 141, 144). Dakle, odnos izlučivanja klorida i hidrogenkarbonata u duktusu preko CFTR-a i SLC-a ovisi o međudjelovanju njihovih domena, odnosno međusobnoj povezanosti i regulaciji CFTR-a i SLC26 transportera, što se postiže putem R (regulatorna) domene CFTR-a i STAS (engl. *Sulphate Transporter and AntiSigma factor antagonist*) domene SLC26 transportera. Posredstvom PKA-e preko cAMP-a, fosforilira se R-domena koja uzajamno djeluje sa STAS domenom aktivirajući CFTR i SLC26 kanale i time sekreciju elektrolita i tekućine (144).



#### 1.1.5.1.7. Akvaporini

Kanale za vodu nalazimo na BL i luminalnoj membrani duktusa žlijezda slinovnica miševa. Smještaj AQP5-a pronađen je kod ljudi na luminalnoj membrani interkalirajućeg duktusa, ali samo tijekom razvojne faze, dok u odraslih osoba izražaj AQP5 nije pronađen (104). Miševi, s druge strane, posjeduju i AQP 3, 4 i 8 na BL membrani stanica izvodnih kanalića, te AQP5 na apikalnoj membrani istih stanica (105, 152, 153).

#### 1.1.5.1.8. Epitelni natrijski kanal

Epitelni kanal za  $\text{Na}^+$  (ENaC, engl., *Epithelial  $\text{Na}^+$  channel*) je glavni kanal za transport natrija u žlijezdama slinovnicama. Ovaj veliki protein sastoji se od tri podjedinice ( $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ ) (154) i smješten je na luminalnim membranama stanica duktusa. Inhibicijom kanala amiloridom zaustavlja se reapsorpcija  $\text{Na}^+$  iz sline, stoga se često naziva amilorid-senzitivnim kanalom (155).

#### 1.1.5.1.9. Izmjenjivač $\text{Na}^+$ i $\text{H}^+$

Na apikalnoj membrani nalaze se elektroneutralni izmjenjivači  $\text{Na}^+$  i  $\text{H}^+$ : NHE2 i NHE3, dok se NHE1 nalazi na BL membrani epitelnih stanica duktusa (94, 156, 157). Smatra se da NHE1 ima manju ulogu u transportu  $\text{Na}^+$  (133).

Istraživanje na SMB žlijezdama *ex vivo* kod miševa kojima nedostaje NHE2 i 3 kao što su izvijestili Park i sur. pokazalo je da nisu odgovorni za reapsorpciju  $\text{Na}^+$ . Međutim primjenom specifičnog inhibitora ENaC-a, amilorida, primijetilo se značajno smanjenje reapsorpcije (94).

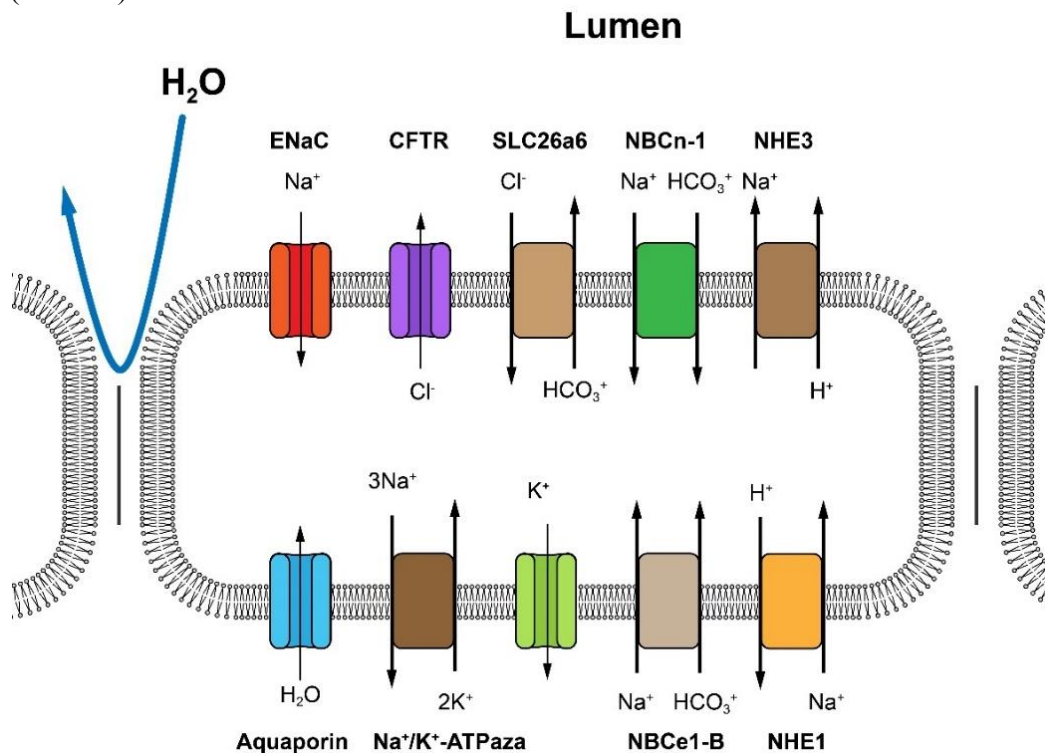
Fiziološka uloga NHE3 povezana je s djelovanjem CFTR-a i transportom  $\text{HCO}_3^-$ . Naime, povećanje unutarstanične koncentracije cAMP-a i posljedična aktivacija PKA-e u pankreasu dovode do inhibicije NHE3 putem CFTR-a (158). Na taj način, NHE3 omogućuje održavanje nižeg pH tijekom smanjene sekrecije žlijezda (112). Uloga NHE2 još uvijek nije potpuno razjašnjena.

#### 1.1.5.2. Obrada primarne sline u duktusu

Da bi slina dobila svoj konačni sastav, mora biti hipotonična i bogata  $\text{HCO}_3^-$ . To znači da se koncentracija NaCl iz primarne sline mora smanjiti (Slika 4.). Kako primarna slina prolazi kroz izvodne kanaliće dolazi do sljedećih procesa:

1.  $\text{HCO}_3^-$  se apsorbira iz intersticija kroz BL membrane stanica djelovanjem elektrogenog NBCe1.
2. SLC26A6 izmjenjivač, koji se nalazi na luminalnoj membrani kanalića prenosi  $\text{HCO}_3^-$  u lumen kanalića u zamjenu za  $\text{Cl}^-$ .
3. CFTR zatim izlučuje ione  $\text{Cl}^-$  natrag u lumen.
4. Aktivacija ENaC-a dovodi do reapsorpcije  $\text{Na}^+$  iz lumena duktusa.
5. Zbog nedostatka AQP-a na apikalnoj membrani stanica i čvrstim spojištima duktusa,  $\text{H}_2\text{O}$  ostaje u lumenu i razrjeđuje tekućinu, čime slina postaje hipotoničnog karaktera.

Tijekom nestimuliranih uvjeta, elektroneutralni NBCn-1 i NHE3 na apikalnoj membrani stanica duktusa aktiviraju se putem CFTR-a, što omogućuje curenje  $\text{Na}^+$  i  $\text{HCO}_3^-$  u citosol. Tijekom stimulacije, ti kanali su inhibirani, a njihova koncentracija u sekundarnoj slini raste (Slika 4.).



**Slika 4. Stanice duktusa žlijezda slinovnica i njihova uloga u formiranju konačne sline.**

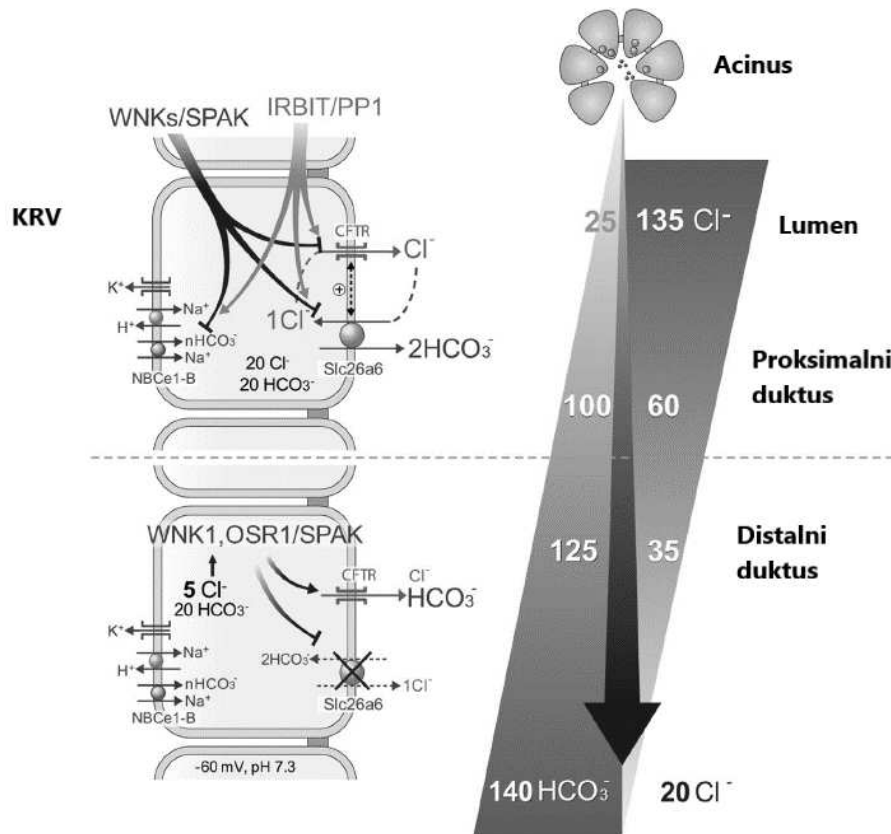
Elektrogeni kotransporter  $\text{Na}^+$  i  $\text{HCO}_3^-$  (NBCe1-B) na bazolateralnoj membrani apsorbira  $\text{HCO}_3^-$  te uzrokuje njegovo nakupljanje u staničnoj citoplazmi. Zatim član 6 obitelji 26 transportera otopljenih tvari (SLC26a6) smješten na luminalnoj membrani omogućuje kretanje  $\text{HCO}_3^-$  u lumen duktusa u zamjenu za ione  $\text{Cl}^-$ , koji se preko transmembranskog regulatora provodljivosti za cističnu fibrozu (CFTR) potom izlučuju natrag u duktus. Aktivacija epitelnog  $\text{Na}^+$  kanala, ENaC-a, kanala smještenog na luminalnoj membrani stanica dovodi do reapsorpcije  $\text{Na}^+$  iz lumena duktusa. NBCn-1 - elektroneutralni kotransporter  $\text{Na}^+$  i  $\text{HCO}_3^-$ , NHE1 i 3 – izmjenjivač  $\text{Na}^+$  i  $\text{H}^+$  izoforme 1 i 3

## 1.2. Pankreas

### 1.2.1. Mehanizam izlučivanja u pankreasu

Prvi modeli koji su pokušali objasniti fiziološke mehanizme u duktusu pankreasa pretpostavili su da CFTR djeluje isključivo kao  $\text{Cl}^-$  kanal koji omogućuje izmjenjivaču  $\text{Cl}^-$  i  $\text{HCO}_3^-$  sekreciju  $\text{HCO}_3^-$  u duktus u zamjenu za ione  $\text{Cl}^-$  (159). Ioni  $\text{Na}^+$  slijede  $\text{Cl}^-$  prolazeći paracelularnim putem u lumen duktusa, što za sobom povlači  $\text{H}_2\text{O}$ . NKCC1 na BL membrani objašnjava transport iona  $\text{Cl}^-$  u stanicu, dok je izvor  $\text{HCO}_3^-$  unutarstanična reakcija  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$  uz prisutnost enzima karboanhidraze. Predloženo je da se nastali  $\text{H}^+$  izlučuje putem NHE1 izmjenjivača u intersticij. Zablude ovog modela leže u tome što su elektrofiziološka ispitivanja na štakorskom pankreasu pokazala da koncentracija  $\text{HCO}_3^-$  ne prelazi 70 mM, što je polovica koncentracije  $\text{HCO}_3^-$  u ljudi, mačaka i zamoraca (160, 161). Nakon nekoliko ključnih otkrića, kao što su elektrogeni izmjenjivači NBCe1 (125, 162) i SLC26A6 (112, 146, 163), koji prenose dva iona  $\text{HCO}_3^-$  (145) te dokazan međuodnos CFTR-a i SLC26A6 (preko R i STAS domene) osmišljen je novi model izlučivanja  $\text{HCO}_3^-$  u duktusu pankreasa (141, 144, 164, 165). Ovakav model sekrecije daje veće vrijednosti koncentracije  $\text{HCO}_3^-$  u soku pankreasa, ali još uvijek manje od koncentracija  $\text{HCO}_3^-$  zabilježenih u ljudskom pankreasu (140 mM) (166, 167). Problem leži u tome što bi se sekrecija  $\text{HCO}_3^-$  počela smanjivati kada se njegova koncentracija u lumenu približava 120 mM.

Istraživanja na zamorcima dalje su pokazala da luminalne membrane stanica izvodnih kanalića pankreasa mogu izlučivati  $\text{HCO}_3^-$  iznad koncentracije zabilježene u ljudi, i to bez izmjene s  $\text{Cl}^-$  (168). Korištenje cAMP analoga za poticanje sekrecije  $\text{HCO}_3^-$  dovodi do smanjenja unutarstaničnog  $\text{Cl}^-$  i pokreće WNK1-OSR1/SPAK signalni put (fosforilacija CFTR-a i povećanje transporta  $\text{HCO}_3^-$ ). Zbog svega navedenog, pretpostavlja se da CFTR postaje i kanal za  $\text{HCO}_3^-$  (169, 170). Također, na BL membrani stanica izvodnih kanalića pankreasa zamoraca nalazi se elektrogeni NBCe1 kotransporter (127, 160) koji osigurava nakupljanje  $\text{HCO}_3^-$  i negativnijeg naboja u stanici, što stvara gradijent za izlazak  $\text{HCO}_3^-$  u lumen duktusa (162). NBCe1 je, kao što smo naveli, reguliran cAMP/PKA signalnim putem kao i CFTR, a oba se aktiviraju putem IRBIT-a (Slika 5.) (118, 121, 122).



**Slika 5. Model izlučivanja elektrolita u proksimalnom i distalnom duktusu pankreasa u dva koraka.** U nestimuliranim uvjetima, WNKs/SPAK (kinaza bez lizina i kinaza bogata prolinom/alaninom) smanjuje izražaj i aktivnost transportera u proksimalnom duktusu. Tijekom stimulacije, IRBIT (protein koji se veže na receptor za inozitol-3-fosfat) defosforilira transportere za  $\text{HCO}_3^-$  te povećava njihov izražaj. IRBIT nadvlada WNKs/SPAK signalni put i tako povećava sekreciju  $\text{HCO}_3^-$ . U distalnom duktusu, smanjena unutarstanična koncentracija  $\text{Cl}^-$  aktivira WNK1 put, što utječe na CFTR da postaje kanal za  $\text{HCO}_3^-$ . NBCe1-B - elektrogeni  $\text{Na}^+$  i  $\text{HCO}_3^-$  kotransporter izoforme 1-B; OSR1 - kinaza koja se aktivira kao odgovor na oksidativni stres; PP1 – protein fosfataza izoforma 1; Slc26a6 – član 6 obitelji 26 transportera otopljenih tvari. Prilagođeno prema (160).

Današnji model opisuje mehanizme koji se događaju u proksimalnom i distalnom dijelu duktusa: 1. NBCe1 transporter ubacuje 1  $\text{Na}^+$  i 2  $\text{HCO}_3^-$  kotransportom u citoplazmu stanica kanalića putem sekundarno aktivnog transporta s natrijem, 2. povećana koncentracija  $\text{HCO}_3^-$  u stanicama dovodi do njegove sekrecije u lumen duktusa putem SLC26A6 izmjenjivača (2  $\text{HCO}_3^-/1 \text{Cl}^-$ ), 3.  $\text{Cl}^-$  koji je tako ušao u stanicu izbacuje se putem CFTR-a natrag u lumen duktusa, 4. zbog povećane osmolarnosti u lumenu kanalića (prolazak  $\text{Na}^+$  paracelularno)  $\text{H}_2\text{O}$  ulazi u lumen kanalića kroz AQP1-e.

Tijekom nestimuliranih uvjeta, izražaj CFTR-a na luminalnoj membrani stanica izvodnih kanalića pankreasa i NBCe1-a na njihovoj BL membrani je mali zbog fosforilacije

putem WNK/SPAK signalnog puta, dok IRBIT aktivira NHE1 i NBCn1 koji vraćaju izlučeni  $\text{Na}^+$  i  $\text{HCO}_3^-$  u stanice duktusa i tako održavaju nisku koncentraciju  $\text{NaHCO}_3$  u sekretu. Prilikom stimulacije IRBIT-om, CFTR i NBCe1 defosforiliraju se i ugrađuju u stanične membrane, gdje sudjeluju u pojačanoj sekreciji  $\text{HCO}_3^-$  (112). U distalnom duktusu, unutarstanična koncentracija  $\text{Cl}^-$  smanjuje se zbog aktivacije CFTR-a, što uzrokuje aktivaciju WNK1 puta koji fosforilira SPAK/OSP1. Pretpostavlja se da to dalje mijenjanja afinitet CFTR-a za  $\text{HCO}_3^-$ . Ovim modelom može se objasniti visoka koncentracija  $\text{HCO}_3^-$  u duktusu pankreasa (140 mM).

### 1.2.2. Usporedba pankreasa i žlijezda slinovnica

Pankreas je probavna žlijezda koja je po svojoj anatomiji i fiziologiji slična žlijezdama slinovnicama. Proces dobivanja pankreasnog soka može se usporediti s procesom dobivanja sline jer započinje u acinusima gušterače, dok se prolaskom kroz duktus taj sekret mijenja. Razlika između konačnih produkata pankreasa i žlijezda slinovnica leži u tome što je pankreasni sok višeg pH zbog sekrecije velikih količina  $\text{HCO}_3^-$  (112, 171). Osim toga, u žlijezdama slinovnicama dolazi do reapsorpcije  $\text{Na}^+$  na luminalnoj membrani stanica izvodnih kanalića putem ENaC kanala, za razliku od pankreasa koji nema taj kanal na luminalnoj membrani stanica svojih izvodnih kanalića (172).

### 1.3. Gvanilinski peptidi

Ova obitelj peptida pripada velikoj obitelji natrijuretskih hormona. Izražaj ovih peptida je pronađen u mnogima organskim sustavima, ali najviše u GI traktu i bubrezima. Nagovještaj postojanja GP-a pokazala su istraživanja na laboratorijskim životinjama (173) i ljudima (174). Naime, izlučivanje soli bubrezima tijekom unosa soli oralnim putem (*per os*) dovodi do snažnije natrijureze nego prilikom davanja soli intravenoznim putem. Kako je za izlučivanje unesenog  $\text{Na}^+$  djelovanjem aldosterona potrebno više od 24h do nekoliko dana (175), nagli porast koncentracije natrija u organizmu nakon obroka može dovesti do poremećaja ravnoteže elektrolita stoga je potreban učinkovit mehanizam koji smanjuje opterećenje organizma natrijem nakon obroka.

Brzi odgovor na promjenu ravnoteže  $\text{Na}^+$  iona uzrokovan unosom hrane bogate solju upućivao je na djelovanje nekog mehanizma iz probavnog sustava na izlučivanje natrija

bubrezima. Upravo Carey i sur. 1992. godine predlažu tu mogućnost regulacije putem natrijuretskog hormona iz GI trakta. Do same izolacije GN-a iz crijeva štakora (176) i UGN-a iz urina oposuma (177), prethodile su studije mehanizma djelovanja termo-stabilnog toksina (STa, engl., *Heat stable enterotoxin*) *Escherichie coli* na transport elektrolita. Pretpostavilo se da STa ima specifično mjesto vezivanja na površini epitela tankog crijeva čijim vezanjem dolazi do porasta unutarstanične koncentracije cikličkog gvanozin-monofosfata (cGMP). Ovaj drugi glasnik nastaje aktivacijom membranskog receptora, gvanilat-ciklaze C (GC-C) (178).

**Tablica 3. Gvanilinski peptidi i razlika u strukturi u pojedinim životinjskih vrsta**

<b>Gvanilin:</b>	Oposum	S H T C E I C A F A A C A G C
	Čovjek	P G T C E I C A Y A A C T G C
	Štakor/Miš	P N T C E I C A Y A A C T G C
	Svinja	P S T C E I C A Y A A C A G C
<b>Urogvanilin:</b>	Oposum	Q E D C E L C I N V A C T G C
	Čovjek	N D D C E L C V N V A C T G C L
	Štakor/Miš	T D E C E L C I N V A C T G C
	Svinja	G D D C E L C V N V A C T G C S
	Kornjača	I D I C E I C A N A A C A G C L
	Jegulja	P D P C E I C A N A A C T G C L
<b>Limfogvanilin:</b>	Oposum	Q E E C E L C I N M A C T G Y
<b>Renogvanilin:</b>	Jegulja	A D L C E I C A F A A C T G C L

Isti aminokiselinski sljedovi u različitim vrsta uokvireni su crnom bojom, dok crvena boja označava cisteine povezane disulfidnim vezama. Limfogvanilin ima jednu disulfidnu vezu za razliku od ostalih gvanilinskih peptida.

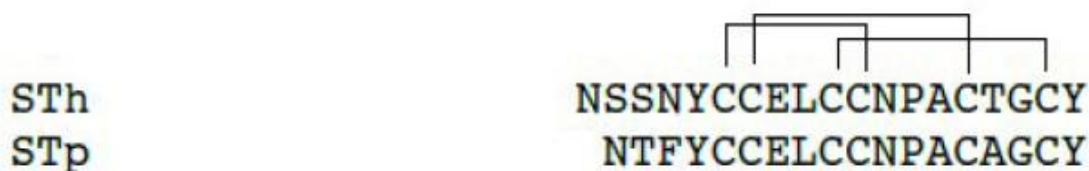
Kako crijeva i bubrezi dijele slične transportne mehanizme, pretpostavilo se da i u bubrezima STa može povisiti unutarstaničnu koncentraciju cGMP-a, što se i potvrdilo (179), a predloženi receptor GC-C su Shulz i sur. i potvrdili (180). Kako je *Escherichia coli* uzročnik akutne sekretorne dijareje u ljudi, a specifični receptor GC-C za njezin toksin STa se nalazi i na ostalim organima kako u ljudi tako i evolucijski nižih životinjskih vrsta, pretpostavilo se da postoji endogeni peptid sličan STa-i koji djeluje putem GC-C-a (179). Prvo je uslijedilo otkriće GN-a 1992. godine (176) dok je UGN izoliran 1993. iz urina oposuma na što njegov prefiks i

upućuje (177). Šest godina kasnije Forte i sur. su izolirali još jedan GP iz limfnog sustava oposuma nazvavši ga limfogvanilin (181). Četiri godine nakon, u jegulji *a. agila* izoliran je posljednji GP iz bubrega i probavnog trakta (182). Zbog mjesta izolacije nazvan je renogvanilin, i zajedno sa STa i ostalim članovima čini porodicu gvanilinskih peptida (Tablica 3.).

### 1.3.1. Termo-stabilni enterotoksin *E.coli*

Termo-stabilni enterotoksin *E.coli* je jedan od dvaju enterotoksina proizvedenih od enterotoksičnog soja bakterije *E.coli*. Po strukturi je sličan GN-u i UGN-u. Za razliku od termolabilnog (engl., *labile heat toxin*, LT) kao drugog toksičnog agensa, STa se razlikuje svojom građom te se ne denaturira kuhanjem na 100°C u trajanju od 15 minuta (183).

Bakterija *E.coli* proizvodi najčešće dva oblika STa toksina: STh (prvotno pronađen kao produkt *E.coli* u ljudima, engl., *human*) i STp (prvotno pronađen kao produkt *E.coli* u svinjama, engl., *porcine*). Oni sadrže 18 odnosno 19 aminokiselina te posjeduju tri disulfidne veze između cisteina (Slika 6.). Domena odgovorna za učinak ovih peptida nalazi se na 14. karboksil-terminalnom ostatku. Upravo ovaj kraj je po strukturi sličan strukturi endogenih peptida; GN, UGN i limfogvanilin. Prilikom oslobađanja toksina u probavni sustav domaćina, isti se veže za GC-C koja se nalazi na četkastim prevlakama membrana epitelnih stanica tankog i debelog crijeva (184, 185). Prilikom vezivanja za receptor, aktivirana GC-C dovodi do porasta unutarstanične koncentracije cGMP-a i snažnog učinka izlučivanja elektrolita i vode u crijevima (sekrecijska dijareja). Razlika između STa i endogenih peptida je u dodatnoj disulfidnoj vezi koja mu omogućuje snažniju aktivaciju GC-C-a, a time jači učinak i patogenost (186, 187).

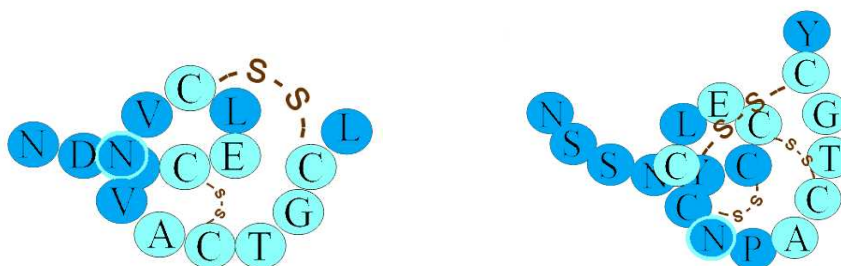


**Slika 6. Dva najčešća oblika enterotoksina *E.coli*.** Termo-stabilni enterotoksin *E.coli* (STh – prvotno pronađen u ljudima) sastoji se od 19 aminokiselina dok STp (prvotno pronađen u svinjama) posjeduje 18 aminokiselina. Tri disulfidne veze između cisteina omogućuju pojačanu aktivaciju gvanilat-ciklaze C, a time i jači učinak u odnosu na endogene agoniste ovog receptora.

## 1.3.2. Urogvanilin

Urogvanilin je endogeni peptid koji je po prvi puta izoliran iz urina oposuma. Sastoji se od 16 aminokiselina i posjeduje dvije disulfidne veze između cisteina na pozicijama 4 i 12 te 7 i 15 (Slika 7.). Disulfidne veze kod UGN-a i ostalih u porodici GP-a, odgovorne su za njihovu biološku aktivnost (188-190). Ljudski GUCA2b, gen za UGN smješten je na 1. kromosomu u ljudi, a na 4. kromosomu u miševa (188, 191). Za razliku od GN-a, UGN-u nedostaju aromatske aminokiseline, ali posjeduje dodatne dvije aminokiseline. Aminokiselina asparagin u molekuli UGN-a i STa-e daje im rezistenciju na proteaze u probavnom sustavu i bubrezima, dok se GN zbog izostanka i posjedovanja aminokiseline tirozina na istoj poziciji hidrolizira i inaktivira proteazama (192, 193). Iako postoje varijacije u aminokiselinskom sastavu UGN-a u različitim vrstama životinja, disulfidne veze su sačuvane kroz evoluciju.

mRNA za UGN nađena je u probavnom sustavu, točnije u proksimalnom i distalnom dijelu tankog crijeva te želudcu. Perkins i sur. pokazali su da enterokromafilne stanice izlučuju UGN. Te stanice su najrasprostranjenije endokrine stanice duž probavnog sustava, a odgovorne su za sekreciju i drugih peptida poput serotonina, enkefalina i tvari P (194). One imaju dva odjeljka, jedan uz BL membranu i drugi uz lumen što ukazuje da enterokromafilne stanice mogu izlučivati UGN i u crijevni lumen i BL u krv (194-196). UGN se sintetizira u obliku preprourogvanilina, prepropeptida od 112 aminokiselina koji se cijepa u prourogvanilin peptidni prekursor dužine 86 aminokiselina. Djelovanje proteolitičkih enzima oslobađa biološki aktivni peptid UGN od 16 aminokiselina.



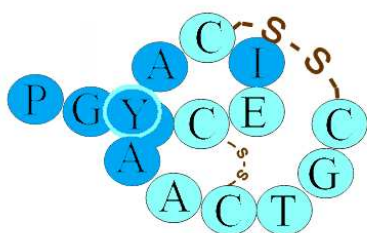
**Slika 7. Aminokiselinski slijed ljudskog urogvanilina i termo-stabilnog enterotoksina.** Ljudski urogvanilin (lijevo) posjeduje 16 aminokiselina i dvije disulfidne veze, dok termo-stabilni enterotoksina *E.coli* (desno) posjeduje 19 aminokiselina i tri disulfidne veze. Obratiti pozornost na zaokruženu „N“ aminokiselinu (asparagin) koja urogvanilinu i enterotoksinu daje otpornost na proteaze.



Za razliku od GN-a, UGN cirkulira krvlju većinom u svom aktivnom obliku u koncentraciji od 5 do 7 pM. Zbog postojanja dviju disulfidnih veza, GN i UGN posjeduju mogućnost dva topološka izomera te njihovu međukonverziju. Izomer UGN-a s desnom zavojnicom nazvan izomer A veže se i aktivira GC-C, dok izomer s lijevom zavojnicom, izomer B, ima smanjen afinitet vezivanja za receptor (187). Međusobna konverzija UGN-a između izomera značajno je usporena u odnosu na GN (187). Postojanje dva oblika izomera potvrđena u ljudskom tijelu, uloga izomera B još nije objašnjena, iako ima potencijalnu natrijuretičnu aktivnost u bubregu vjerojatno putem GC-C neovisnog signalnog puta (197-199).

### 1.3.3. Gvanilin

Gvanilin je još jedan endogeni peptid, agonist GC-C-a, po prvi puta izoliran je iz mukoze probavnog sustava štakora. Gen za GN (*Guca2a*) nalazi se na 1. kromosomu čovjeka, dok je kod miševa na 4. kromosomu (191). Biološki aktivan GN sastavljen je od 15 aminokiselina s disulfidnim vezama između cisteina na 4. i 12. te 7. i 15. mjestu od N-terminalnog kraja molekule. GN aktivira GC-C, što dovodi do porasta unutarstanične koncentracije cGMP-a u T-84 stanicama probavnog sustava (Slika 8.) (176, 195). Najveći izražaj GN mRNA-e nađen je u probavnom sustavu, točnije u ileumu i debelom crijevu i to u: enterocitima, enterokromafilnim, Panethovim i vrčastim stanicama (190, 200-202).



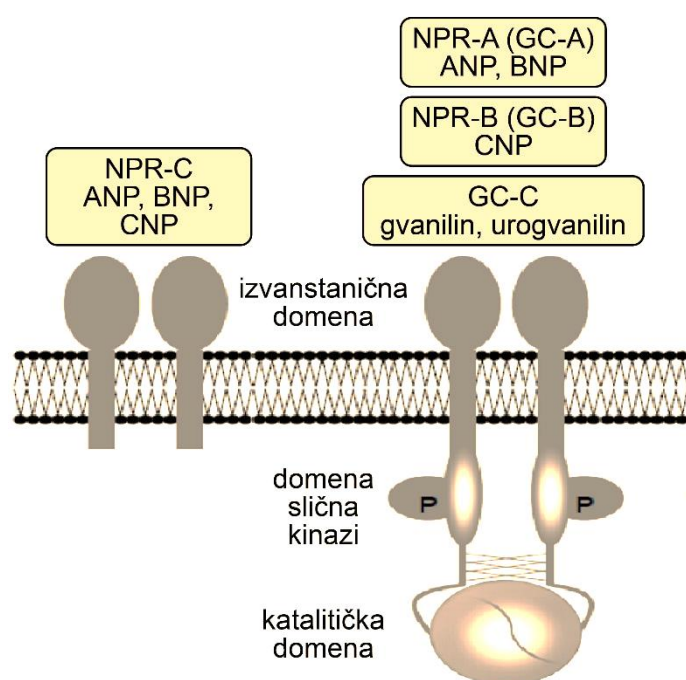
**Slika 8. Ljudski gvanilin.** Sastoji se od 15 aminokiselina. Posjeduje dvije disulfidne veze, kao i urogvanilin. Razlika je u tome što na devetom mjestu (slovo „Y“) posjeduje aminokiselinu tirozin (umjesto asparagina) i time smanjenu otpornost na kimotripsin

### 1.3.4. Receptori natrijuretskih peptida – gvanilat-ciklaze

Gvanilat-ciklaze kataliziraju pretvorbu GTP-a (gvanozin-trifosfat) u cGMP. Obitelj ovih receptora dijeli se na dvije glavne skupine određene smještajem unutar stanica. Prva skupina je topljiva gvanilat-ciklaza smještena u citoplazmi stanice (engl., *Soluble guanylate cyclase*). Po svojoj građi je heterodimer, a taj receptor aktiviraju plinovi: NO (dušikov oksid) i

CO (ugljičkov monoksid) (203, 204). Topljive gvanilat-ciklaze lokalizirane su u mnogim tkivima poput pluća, mozga, bubrega, krvožilnog tkiva.

U drugu skupinu gvanilat-ciklaza pripadaju membranske gvanilat-ciklaze tj. receptori natrijuretskih peptida (engl., *Natriuretic peptide receptor*, NPR) koji posjeduju izvanstaničnu domenu na koju se vežu agonisti. Za sada je u sisavaca otkriveno sedam različitih membranskih gvanilat-ciklaza označenih slovima od A do G. Za ovu studiju su najvažnije GC-A (NPR-A), B (NPR-B) i C prikazane na slici 9. Iz povijesnih razloga, NPR-C nije GC-C, već receptor čistač o kojem će biti više riječi u nastavku.



**Slika 9. Gvanilat-ciklaze A, B i C.** Agonisti gvanilat ciklaze A su atrijski natrijuretski peptid (ANP) i moždani natrijuretski peptid (BNP), agonist gvanilat-ciklaze B je C-tip natrijuretskog peptida (CNP), dok su agonisti gvanilat-ciklaze C gvanilinski peptidi, gvanilin i urogvanilin. Modificirano prema (205).

#### 1.3.4.1. Gvanilat-ciklaza A

Gvanilat-ciklaza A (GC-A) nalazi se u srcu, masnom tkivu, bubrezima, glatkim mišićima krvnih žila, malom i velikom mozgu, plućima, testisima i nadbubrežnoj žlijezdi (206-209). Aktivira se putem atrijskog natrijuretskog peptida (ANP) i moždanog natrijuretskog peptida (BNP-a, engl., *brain natriuretic peptide*). Otkrili su je 1989. godine Chinkers i sur., a postoji kao heteromer ili heterotetramer (210). Njezina izvanstanična domena na koju se veže agonist sastoji se od 450 aminokiselina s pet glikolizacijskih mjesta i tri disulfidne veze (211, 212).

#### 1.3.4.2. Gvanilat-ciklaza B

Gvanilat-ciklaza B (GC-B) je receptor natrijuretskog peptida C (CNP). Po topološkoj građi unutarstanične i izvanstanične domene dijeli 78% odnosno 48% sličnosti s GC-A (180, 213). Kodirana je genom koji se nalazi na 4. kromosomu miševa (214) odnosno 9. kromosomu ljudi (215). Domena slična kinazi posjeduje pet fosforilacijskih mjesta, a aktivacija protein-kinaze C (PKC) i povećanje unutarstaničnog kalcija ( $\text{Ca}^{2+}$ ) posreduje u desenzitaciji koja se javlja tijekom produljenog izlaganja CNP-om (216-218).

Ekspresija receptorske mRNA u mnogim je organskim sustavima tijela, uključujući bubrege, fibroblaste, glatke mišiće krvnih žila, jetru, kosti, maternicu, mozak, pluća i srce (219-223). GC-B je važan za regulaciju proliferacije i migracije staničnih kultura (224). Stoga ne čudi da su glavni učinci agonista GC-B, CNP-a, pokazani u regulaciji rasta dugih kosti (endohondralno okoštavanje), a sudjeluje i u regulaciji sazrijevanja oocita ženskih miševa (225, 226).

#### 1.3.4.3. Gvanilat-ciklaza C

Gvanilat-ciklaza C treći je membranski receptor iz obitelji gvanilat-ciklaza. GC-C sastoji se od izvanstanične membranske domene, transmembranske domene, domene slične protein-kinazi, gvanilat-ciklazne katalitičke domene i karboksil-terminalne domene. Ligandi koji se vežu za GC-C su STa i endogeni peptidi, GN i UGN. Ovaj membranski protein sastoji se od 1050 aminokiselina, a njegova funkcija je najviše istražena u probavnom traktu, gdje je smješten na četkastoj prevlaci epitelnih stanica tankog i debelog crijeva (227).

Za razliku od ostalih članova obitelji koji pokazuju veliku sličnost u izvanstaničnim i unutarstaničnim domenama, izvanstanična domena GC-C-a ima najmanju podudarnost s ostalima članovima gvanilat-ciklaza (191, 228). S druge strane, podudarnost izvanstanične domene i unutarstanične domene ljudske i štakorske GC-C iznosi 71% odnosno 91% (228). Po strukturi GC-C je homomultimer, no koliko je točno monomera vezano u jednom receptoru još nije do kraja utvrđeno. Studije na ovom proteinu, ali i ostalim proteinima iz porodice gvanilat-ciklaza, ukazuju da se radi o dimerima, trimerima ili čak tetramerima, dok Vaangarder i sur. 1994. godine zaključuju da je GC-C ipak trimer (229-231). Vezanje navedenih liganda za izvanstaničnu domenu receptora dovodi do aktivacije katalitičke domene, koja ima gvanilat-ciklaznu aktivnost, što dovodi do porasta unutarstanične koncentracije cGMP-a. Još davne

1990. godine pokazano je djelovanje PKC-a na signalni put ST-a (232). Crane i sur. su demonstrirali da PKC fosforilira i na taj način regulira aktivnost GC-C-a (233, 234).

Osim u crijevima, GC-C je pronađen u mnogim tkivima: žlijezdama slinovnicama, nadbubrežnoj žlijezdi, žlijezdama znojnicama, placenti, testisima, dišnim putevima, slezeni, limfnim čvorovima, timusu, pankreasu, žučnom mjehuru, reproduktivnom sustavu, mozgu i bubrezima (55, 235-241).

### 1.3.5. Stanični signalni mehanizmi cikličkog gvanozin-monofosfata

Slično cikličkom adenozin-monofosfatu (cAMP), ciklički gvanozin-monofosfat (cGMP) je ciklički nukleotid koji djeluje kao drugi glasnik mnogih peptidnih hormona. cGMP nastaje iz svog nukleotid trifosfata (GTP) djelovanjem enzima gvanilat-ciklaze (242). Prvi put su ovaj drugi glasnik izolirali Ashman i sur. iz štakorskog urina 1963. godine (243). Šest godina kasnije, otkriven je enzim nazvan gvanilat-ciklaza koji katalizira reakciju pretvorbe gvanozin-trifosfata ( $Mg^{2+}$ -GTP) u cGMP i pirofosfat (244-246). Nastali cGMP djeluje na ionske kanale, fosfodiesteraze i cGMP ovisne protein-kinaze G (PKG). U novijim radovima, gvanilat-ciklaza se naziva i gvanilil-ciklaza (247). Gvanilat-ciklaza je prisutna u svim tkivima sisavaca i po učinku oponaša enzim adenilat-ciklazu prisutnu u sisavca i bakterija (242). Iako ova dva enzima dijele slične osobine, za razliku od adenilat-ciklaze, koja se smatra čestičnom, čini se kako se veći dio aktivnosti gvanilat-ciklaze nalazi u topljivoj frakciji nakon homogenizacije većine tkiva (244-246).

#### 1.3.5.1. Protein-kinaza G

Protein-kinaza G je specifična serin/treonin protein-kinaza koja je aktivirana cGMP-om. Nalazi se u svim eukariotskim organizmima i sudjeluje u fosforilaciji mnogih ciljnih proteina. PKG se sastoji od jednostrukog polipeptidnog lanca koji sadrži regulacijsku domenu na N-terminalnom kraju i kinaznu domenu na C-terminalnom kraju. Wall i sur. su pokazali da vezivanje cGMP-a za regulacijsku domenu mijenja konformaciju i dezinhobira kinaznu domenu na C-terminalnom kraju (248).

Kod sisavaca, pronađena su dva različita gena koja kodiraju dvije različite PKG: citoplazmatsku ili otopljenu (tip I, PKGI) i membransku (tip II, PKGII). Citoplazmatska protein-kinaza dolazi u dvije izoforme koje su označene s I $\alpha$  i I $\beta$  (249). Najveći izražaj PKGI je u trombocitima, zatim u glatkim i skeletnim mišićima, plućima, perifernom i dijelu središnjeg živčanog sustava, kardiomiocitima, jetri i nekim endotelnim stanicama (250, 251). Izražaj PKGII je većinom u četkastoj membrani stanica tankog i debelog crijeva, mozgu, prostati i plućima (252, 253).

#### 1.3.5.2. Fosfodiesteraze

Fosfodiesteraza (PDE) je enzim koji sudjeluje u razgradnji unutarstaničnih cikličkih nukleotida (cAMP i cGMP) katalizirajući hidrolizu 3'-ciklički fosfatne veze. Razlikujemo tri klase fosfodiesteraza (I, II, III). U klasu I fosfodiesteraza (I-PDE) svrstavamo one PDE koje su izražene kod sisavaca i sastoje se od histidin-aspartat domene na C-terminalnom kraju (katalitička domena) koja pokazuje visoki afinitet prema cikličkim nukleotidima (cAMP i cGMP) i regulatorne domene na C-terminalnom kraju odgovorne za enzimsku aktivnost same PDE. Do danas je otkrivena 21 vrsta I-PDE koje se zbog lokalizacije i tkivne ekspresije uvrštavaju u obitelj od 11 izoforma (254). Osim toga, svaka izoforma je definirana prema aminokiselinama regulatorne domene N-terminalnog kraja i katalitičke domene C-terminalnog kraja. Prema tome, dok jedne razgrađuju samo cAMP (PDE-IV, VII i VIII) ili cGMP (PDE-V, VI i IX), druge razgrađuju oba ciklička nukleotida (PDE-I, II, III, X i XI) (254). Na primjer, koncentracija cAMP-a u stanicama se može mijenjati ovisno o cGMP-u koji povećava koncentraciju cAMP-a inhibicijom PDE-III. PDE-V je odgovorna za razgradnju cGMP-a (255).

#### 1.3.6. Signalni put natrijuretskih peptida neovisan o gvanilat-ciklazama

##### 1.3.6.1. Receptor natrijuretskih peptida C

Receptor natrijuretskih peptida C smatra se receptorom čistačem za natrijuretske peptide (NPR-C, engl., *natriuretic peptide receptor C*). Na NPR-C vežu se ANP > CNP > BNP (256). Ovaj receptor ne sadrži gvanilat-ciklaznu (katalitičku) domenu (257, 258) i nije receptor za GP-e. Njegova funkcija je u internalizaciji i razgradnji liganada, a njegova aktivacija dovodi do porasta unutarstanične koncentracije Ca<sup>2+</sup> i smanjenja unutarstanične koncentracije cAMP-a (259).

Postoje dvije različite izoforme NPR-C s razlikom u nekoliko aminokiselina (257, 260, 261). Mizuno i sur. otkrili su da naizmjenično spajanje dviju izoformi stvara slične proteine s 5 ili 6 cisteina, a karakteristike tih dviju varijanti gotovo su identične kada je riječ o afinitetu vezivanja i internalizaciji liganda (262).

#### 1.3.6.2. Signalni put gvanilinskih peptida neovisan o gvanilat-ciklazi C

Prva istraživanja o GC-C neovisnom signalnom putu provedena su prije dvadesetak godina. Quian i sur. 2000. godine pokazuju da se vezna mjesta ST-a i GC-C ne preklapaju (263) i da miševi kojima nedostaje GC-C (GC-C KO, engl., *GC-C knockout*) svejedno ispoljavaju vezna mjesta ST-a u probavnom sustavu, što ide u prilog hipotezi o postojanju alternativnog puta koji dovodi do povećanja unutarstaničnog  $Ca^{2+}$  i aktivacije PKC (264, 265). Kako je GC-C ovisni signalni put za GP pokazan u proksimalnim stanicama tubulusa bubrega (266, 267), moglo se pretpostaviti postojanje i GC-C neovisnog puta. To su upravo Carrithers i sur. dokazali na GC-C KO mužjacima jer nakon primjene GP-a, ove životinje i dalje imaju značajnu diurezu, natrijurezu i kalijurezu (268). Kasnije, Sinđić i sur. pokazuju učinak UGN-a na membranski potencijal glavnih stanica kortikalnih sabirnih cijevi u ljudi i GC-C KO mužjaka (269-271). GC-C KO miševi imaju normalan krvni tlak za razliku od miševa kojima nedostaje UGN kod kojih je krvni tlak povišen, što je još jedan dokaz postojanja GC-C neovisnog signalnog puta za GP (272).

Lokalizacija GC-C-a u mozgu prisutna je u neuronima ljudi i miševa (273-275), dok se ne nalazi u astrocitima. Međutim, UGN utječe na funkciju astrocita tako da povećava unutarstaničnu koncentraciju  $Ca^{2+}$  u različitim regijama mozga kod GC-C KO životinja. Isto tako, UGN uzrokuje hiperpolarizaciju astrocita, a cGMP depolarizaciju, što nas navodi na zaključak da cGMP nije drugi glasnik, već govorimo o GC-C neovisnom signalnom putu (275). Kako funkcionira glasnički mehanizam ovog neovisnog puta još nije u potpunosti objašnjeno. Pretpostavka leži u tome da se GP vežu za nepoznati receptor i uzrokuju porast unutarstaničnog  $Ca^{2+}$ .



Konačni učinak GP-a je mnogostruk. Prvo, aktivacija CFTR-a uzrokuje sekreciju  $\text{Cl}^-$  u lumen crijeva, dok inhibicijom NHE-a  $\text{Na}^+$  zadržava u lumenu crijeva, što zajedno s  $\text{Cl}^-$  uzrokuje osmotsko gibanje  $\text{H}_2\text{O}$  i njenu sekreciju. Upravo ovakvo djelovanje UGN-a dovelo je do razvoja novih UGN analoga koji se danas koriste u terapiji konstipacije (292). Drugo, zbog sekrecije  $\text{HCO}_3^-$  u lumen i inhibicije NHE-a, sadržaj u lumenu crijeva postaje alkalniji, što neutralizira kiseli sadržaj koji dolazi iz želudca u duodenum.

Aktivacija GP-a i njihov učinak u crijevima putem GC-C ovisi o pH vrijednosti, budući da pri kiselom sadržaju želudca i pH 5 afinitet UGN-a za GC-C je povećan 10 puta. S druge strane, pri pH 8, potentnost GN-a se povećava, dok UGN aktivira GC-C neovisan signalni put. Pretpostavka da su N-terminalni krajevi GP-a odgovorni za aktivaciju ovisnu o pH potkrepljena je istraživanjem koje pokazuje da delecija N-terminalnog ostatka UGN-a mijenja njegovu aktivnost ovisno o pH i čini ga sličnijim GN-u (293). Neovisan signalni put pokazan je u crijevima GC-C KO miševa gdje izostanak GC-C nije utjecalo na sekreciju  $\text{HCO}_3^-$  u lumen crijeva (294).

### 1.3.7.3. Žlijezde slinovnice i pankreas

GP u žlijezdama slinovnicama su prvi otkrili Kulaksiz i sur., gdje je pokazan njihov izražaj u SMB i PA žlijezdama štakora i zamoraca. GP se nalaze u sekretornim stanicama inter- i intralobularnih duktusa. Akumulacija vezikula koje sadrže GP-e je blizu luminalne membrane stanica, što je povezano s mjestom njihove sekrecije i prisustvom luminalnog GC-C-a. Rad iste skupine autora na žlijezdama slinovnicama pacijenata oboljelih od Whartinovog tumora (cistadenolimfom) pokazuje da GN sudjeluje u regulaciji transporta elektrolita intraduktalnim luminokrinim putem djelujući na CFTR (55, 295). Kako su žlijezde slinovnice egzokrine žlijezde i njihova je funkcija izmijenjena kod oboljelih od CF-a kod kojih zamjećujemo slične promjene u ionskom sastavu izlučene tekućine kao i u drugim žlijezdama, primjerice žlijezdama znojnicama (296-298). Pacijenti oboljeli od CF-a imaju smanjeni volumen proizvedene sline (83, 297, 299) i povećanu koncentraciju  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  (296-298) što je u pozitivnoj korelaciji s koncentracijom  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  u znoju (298). Smanjen je i pH i puferski kapacitet sline (83, 296, 297, 299, 300). Zbog promjena u sastavu sline, oboljeli od CF-a bi trebali pokazivati veću sklonost karijesu (83), ali to nije potvrđeno (301). Štoviše, broj bakterija u usnoj šupljini je smanjen, vjerojatno zbog korištenja antibiotske profilakse teških bakterijskih upala pluća koje su česte kod oboljelih od CF-a (302).



Iako uloga GP-a u žlijezdama slinovnicama nije dovoljno istražena, više studija provedeno je na pankreasu. Uloga GN-a i STa je pokazana na staničnoj kulturi pankreasa gdje vezanje za GC-C dovodi do porasta unutarstaničnog cGMP-a (303). Izražaj GN-a je pokazan u centroacinusnim i duktalnim stanicama ljudskog pankreasa, dok je izražaj UGN-a jako mali. Pretpostavlja se da GP dijele sličan put i imaju sličnu ulogu u regulaciji elektrolita u pankreasu i žlijezdama slinovnicama s obzirom da je lokalizacija GC-C-a također na luminalnoj membrani stanica duktusa (238, 239). Ekspresija GP-a i GC-C-a nije pokazana samo u tkivu zdravog pankreasa, nego i u epitelnim stanicama karcinoma pankreasa (304, 305).

### 1.3.8. Gvanilinski peptidi u bubregu

U samom uvodu smo govorili kako je izlučivanje soli bubrezima nakon slanog obroka snažnije nego prilikom intravenske aplikacije soli. Postojanje ovog mehanizma je važno kako bi se spriječio nagli porast koncentracije natrija u organizmu nakon obroka i tako dovelo do poremećaja u homeostazi elektrolita. Upravo proizvodnja GP-a u probavnom sustavu omogućit će regulaciju funkcije enterocita putem GC-C-a i cGMP-a, drugog glasnika koji će uzrokovati smanjenje i usporavanje apsorpcije  $\text{Na}^+$  te sekreciju  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$  i  $\text{H}_2\text{O}$ . Nadalje, nakon obroka bogatog solju, GP se otpuštaju i u krv. Danas se pretpostavlja da se UGN iz plazme filtrira u glomerulu, ali se i proizvodi i izlučuje u lumen proksimalnog kanalića što dovodi do natrijureze, kalijureze i diureze (306-308). Točan mehanizam djelovanja GP-a na bubrege još nije u potpunosti razjašnjen.

GC-C se u bubregu nalazi na luminalnoj membrani stanice nefrona (267, 268, 271, 309, 310). Izražaj mRNA za GN pokazan je u sabirnim kanalićima dok je za UGN pokazan u proksimalnim kanalićima bubrega (310). Osim GC-C ovisnog puta u bubregu, učinak GP-a pokazan je na GC-C KO mužjacima. Naime, isti učinak natrijureze, kalijureze i diureze je pokazan kao i kod divljih tipova životinja, što ukazuje na postojanje signalnog puta koji nije ovisan o GC-C u bubregu (268).

### 1.3.9. Gvanilinski peptidi u plućima

Otkriće GN-a u plućima sisavaca, točnije u Clara stanicama distalnih dišnih puteva, ukazivalo je na mogućnost postojanja istog učinka peptida na epitel dišnog sustava kao i na druge organske sustave (311). Vežanje GN-a za GC-C uzrokuje aktivaciju CFTR-a i izlučivanje  $\text{Cl}^-$  (236, 237, 312). Učinak GN-a na pluća bi mogao imati značaj u liječenju CF-a i astme. Naime, zbog oštećenog CFTR-a transport elektrolita u stanicama dišnog sustava je izmijenjen. To dovodi do stvaranja gustog sekreta čime nastaje smanjena sposobnost čišćenja pomoću trepetiljika (cilija) te pojavu simptoma bolesti. Upravo djelovanje GN-a na CFTR bi mogao biti put prema novoj terapiji (236, 311, 312).

Kako smo ranije napomenuli, GP bi mogli imati ulogu u razvoju novih terapijskih smjerova u liječenju CF-a. Ova bolest je autosomni poremećaj koji zahvaća sve egzokrine žlijezde koje u oboljelih od CF-a proizvode viskozni sekret. Njena pojava je povezana s mutacijama CFTR-a koji funkcionira kao transmembranski cAMP-aktivirani kloridni kanal. Danas je poznato više od dvije tisuće različitih mutacija unutar CFTR gena, od kojih najmanje 336 rezultira simptomima karakterističnim za CF (313, 314). Ove mutacije su podijeljene u šest klasa (314-317), dok klase I i II najčešće zahvaćaju žlijezde slinovnice. Osim što smo naveli potencijalnu korist kod stvaranja gustog sekreta koji blokira dišne puteve, GN djeluje i na glatku muskulaturu mišića traheje, uzrokujući njihovu relaksaciju, što nas navodi na mogućnost primjene ovih peptida u liječenju astme (318, 319).

## **2. CILJEVI I HIPOTEZA**

## HIPOTEZA:

UGN mijenja transport vode i iona te regulira razinu specifične mRNA za ionske transportere i kanale za vodu u žlijezdama slinovnicama putem GC-C ovisnog signalnog puta.

## OPĆI CILJ:

Cilj ovog istraživanja je utvrditi ulogu UGN-a i njegovih signalnih puteva u regulaciji transporta iona i vode žlijezda slinovnica.

Specifični ciljevi ove doktorske disertacije su:

1. Odrediti učinak UGN-a na volumen proizvedene stimulirane sline nakon intraperitonealne (i.p.) stimulacije pilokarpinom u WT životinja
2. Odrediti učinak UGN-a na ionski sastav sline određivanjem pH vrijednosti, te koncentracije  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  i  $\text{Cl}^-$  stimulirane sline nakon stimulacije pilokarpinom u WT životinja
3. Odrediti korelaciju između volumena stvorene sline i ionskog sastava sline kod životinja kojima je apliciran UGN u odnosu na životinje kojima nije
4. Odrediti jesu li primijećene promjene u ionskom sastavu i volumenu sline ovisne o GC-C-u izvođenjem istraživanja na GC-C WT i GC-C KO životinjama iz istog legla
5. Odrediti razinu specifične mRNA za membranske bjelančevine ovisno o promjenama u sastavu sline na poticaj UGN-om (CFTR, NHE, AQP, Slc26a3, Slc26a6) qPCR metodom (lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu)
6. Utvrditi korelaciju između izražaja pojedinih transportera, volumena sline i njezinog ionskog sastava

### **3. MATERIJALI I POSTUPCI**

### 3.1. Model korišten u pokusima

Ovo istraživanje je provedeno na životinjskim modelima. Laboratorijski miševi korišteni u ovom istraživanju bili su mužjaci C57Bl6NCr1 (divlji tip, WT) i životinje kojima nedostaje GC-C (GC-C KO) te divlji tipovi iz istog legla (GC-C WT, engl., *littermates*). Etičko odobrenje: Eksperimentalni postupci korišteni u ovoj studiji odobreni su Nacionalno etičko povjerenstvo Ministarstva poljoprivrede (UP/I-322-01/22-01/36) i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu (641-01/22-02/01). Svi pokusi provedeni su u skladu s ARRIVE smjernicama i prema Etičkom kodeksu Hrvatskog društva za laboratorijske životinje. Životinje su bile smještene u Nastambi za životinje (HR-POK-006) Hrvatskog instituta za istraživanje mozga (HIIM), Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Tokom uzgoja životinja nastambe su bile u kontroliranim uvjetima okoline (temperatura:  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ; vlaga  $53 \pm 1\%$ ), pod 12-satnim ciklusom svjetlo-tama i ventilacijom. Sve životinje su hranjene *ad libitum* (hrv. *po potrebi*), standardnom hranom za glodavce i imale su slobodan pristup vodi.

Pokusi su izvedeni na C57Bl6NCr1 mužjacima miševa i potomcima iz legla dobivenim sparivanjem WT životinja i životinja kojima nedostaje GC-C (GC-C KO) starih  $28,7 \pm 1,3$  tjedna. GC-C KO miševi su bili donacija dr. K. A. Steinbrechera (Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH, SAD). Dobivene jedinke su heterozigoti koje smo međusobno sparili. Četiri tjedna nakon izlijevanja, potomstvu (F2 generacija) je sprovedena genotipizacija radi utvrđivanja odgovarajućeg genotipa. Životinje iz tog legla (engl., *littermates*): GC-C KO i GC-C WT korištene su u ovom istraživanju. Ovim postupkom je osiguran visoki stupanj genetičke sličnosti između životinja iz istog legla i posljedično su dobiveni pouzdani rezultati istraživanja (320).

### 3.2. Genotipizacija

#### 3.2.1. Izolacija DNA

Svakoj životinji u ovom istraživanju uzet je vršak repa kako bi se odredio njen genotip. Nakon sakupljenih uzoraka repova, tkiva su inkubirana pri temperaturi od  $56^\circ\text{C}$  u otopini: 50 mM tris(hidroksimetil)aminometan (pH = 8,0) (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, SAD), 100 mM etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA; Sigma-Aldrich Corporation), 100 mM NaCl (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Njemačka), 1% natrijev dodecil-sulfat (Carl Roth GmbH), 1% (10 mg/mL) proteinaza K (Promega, Madison, WI, SAD). Nakon inkubacije preko noći,

uzorci su centrifugirani 20 minuta na 12 000 g. Kako bi se precipitirala DNA u nadtalogu, po uzorku je dodano 500  $\mu\text{L}$  izopropanola (Carl Roth GmbH) i ponovno se centrifugiralo 5 minuta na 12 000 g. DNA je isprana sa 70% etilnim alkoholom. Kratkim centrifugiranjem dobiven je precipitat (genomska DNA) koji ostane u mikroepruveti nakon što se višak etilnog alkohola i rezidualnog izopropanola odlije. Nakon toga, uzorci su stavljeni na sušenje pri 37°C. Izolirana DNA je bila otopljena u sterilnoj vodi te su uzorci uskladišteni na +4 °C do korištenja.

### 3.2.2. Lančana reakcija polimerazom

Nakon izolacije DNA, napravljena je lančana reakcija polimerazom (PCR, engl., *Polymerase Chain Reaction*). Cilj ovog postupka bio je odrediti genotip životinja i izdvojiti heterozigotne životinje koje se nisu koristile dalje u pokusima. Korištene početnice za umnažanje regije od interesa nalaze se u Tablici 4. Reakcijska smjesa ukupnog volumena 25  $\mu\text{L}$  sastojala se od: 1  $\mu\text{L}$  uzorka DNA, 1  $\mu\text{L}$  (10 pM) svake od početnica, 0,5  $\mu\text{L}$  (10 mM) smjese nukleotida, 5  $\mu\text{L}$  reakcijskog pufera, 1  $\mu\text{L}$  (25 mM)  $\text{MgCl}_2$ , 0,125  $\mu\text{L}$  (5U/  $\mu\text{L}$ ) DNA polimeraze i 13,375  $\mu\text{L}$  sterilne vode. Protokol reakcije nalaze se u Tablici 5.

**Tablica 4. Sekvence početnica korištenih pri genotipizaciji životinja kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C**

Set početnica	Oznaka početnice	Sekvenca početnice	Veličina umnoženog ulomka
GC-C	WT-S	5' CTT TCG CAC TAT GTC CAG 3'	500 pb
	WT-AS	5' GTG ATG TGT CAC AAA CGG 3'	
	GC-C KO-S	5' TGG ATG TGG AAT GTG TGC 3'	285 pb
	GC-C KO-AS	5' TCA ACC AAG CTG TAT CCC 3'	

AS – *anti-sense*, GC-C KO – životinje kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C (GC-C), pb – parova baza, S – *sense*, WT – divlji tip

**Tablica 5. Protokol lančane reakcije polimerazom**

Korak	GC-C		
	Temperatura	Trajanje	Broj ponavljanja
1.	95 °C	2 min	1x
2.	95 °C	30 s	35x
3.	61 °C	30 s	
4.	72 °C	45 s	1x
5.	72 °C	7 min	
6.	4 °C	$\infty$	1x

GC-C – gvanilat-ciklaza C

### 3.2.3. Elektroforeza na agaroznom gelu

Umnoženi ulomci genomske DNA elektroforetski su razdvojeni na agaroznom gelu nakon čega je analizirana veličina dobivenih ulomaka u odnosu na kontrolne ulomke poznate veličine. Kao kontrola korištena je smjesa DNA ulomaka poznatih veličina. Za pripremu agaroznog gela, koristila se agaroz (1,8%, Carl Roth GmbH) kojoj se dodao tris-borat EDTA pufer (ROTIPHORSE®, Carl Rothe, GmbH). Nakon kuhanja, dodano je 2,5 µL boje za nukleinske kiseline (ROTI®GelStain Red, Carl Roth GmbH) i tada se tekući gel izlilo u kalup za izradu gela (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, SAD) gdje je umetnut češljčić. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi, gel se postavio u uređaj za elektroforezu (Bio-Rad Laboratories, Inc.). U svaku jažicu gela dodano je 10 µL umnoženih ulomaka DNA od svakog uzorka. Nakon dodavanja uzoraka, biljeg veličine DNA (5 µL Sigma-Aldrich Corporation) dodan je u prvu jažicu. Uređaj se potom spojio na izvor struje (PowerPac™, Bio-Rad Laboratories, Inc.) od 100 V u trajanju od 40 do 50 minuta. Nakon toga, gel se izvadilo i postavljen je u transiluminator (Elchrom Scientific AG, Cham, Švicarska) kako bi se očitale rezultati.

Ulomci dobiveni umnažanjem s GC-C parovima početnica bili su dugi 285 parova baza (pb) ukoliko se radi GC-C KO životinji, odnosno 500 pb ako se radi o WT mišu. Heterozigotne životinje posjeduju vrpce obje veličine i takve životinje su isključene iz daljnjih pokusa.

### 3.3. Sijalometrija

Dva sata prije sijalometrije (mjerenje stimuliranog protoka sline), miševi su bili stavljeni na gladovanje sa slobodnim pristupom vodi kako bi se izbjegla stimulacija salivacije uslijed hranjenja. Za prikupljanje sline korišten je filter papir (Medical Intertrade, Sveta Nedelja, Hrvatska) izrezan na trakice prosječnih dimenzija 150 x 4 mm. Trakice su bile potom stavljene u mikroeprevetu (0,5 ml) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, SAD) s perforiranim dnom. Sve skupa je uloženo u veću eprevetu (1,5 ml) označenu oznakom miša (Slika 11.).





**Slika 11. Gravimetrijska metoda.** Velika epruveta (2) u koju se umetnula mikroeproveta (1), zajedno s filter papirićima za kolekciju sline. Mikroeproveta se perforiralo dno kako bi se omogućilo razdvajanje sline prilikom centrifugiranja. Vaganje se vršilo prije i poslije sakupljanja sline, za potrebe određivanja količine sline.

Otopine korištene za pokus bile su: ksilazin-ketamin, pilokarpin hidroklorid (Fagron Hrvatska d.o.o., Donja Zelina, Croatia), UGN (Uroguanilin izomer A, PeptaNova GmbH, Sandhausen, Njemačka) odnosno fiziološka otopina (0,9% NaCl; Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb, Hrvatska). Sve otopine su pripremane isključivo na dan izvođenja pokusa. Igle korištene za aplikaciju bile su 23G (0,6 x 30 mm), a šprice inzulinskog tipa. Kako bi se odredila količina sakupljene sline, svaka epruveta s pripadajućom mikroeprovom i filter papirima je vagana na analitičkoj vagi (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka) prije uzorkovanja sline. Miševima se odredila tjelesna masa te su anestetizirani i.p. injekcijom ketamina i ksilazina (100 mg/kg, odnosno 5-10 mg/kg) te su imobilizirani na grijanoj podlozi kako bi se spriječila hipotermija povezana s anestezijom. Nakon uvoda u anesteziju, eksperimentalnoj skupini WT miševa (n = 8) primijenjen je ljudski UGN (30 µg/životinji u 250 µl fiziološke otopine) i.p., dok je kontrolnoj skupini WT miševa (n = 8) primijenjeno i.p. 250 µl fiziološke otopine. GC-C WT (n = 7) i GC-C KO (n = 6) miševi su primili istu količinu UGN-a kao pokusna skupina WT miševa. Nakon petnaest minuta (mjereno zapornim satom), za poticanje salivacije, i.p. je primijenjen kolinergički agonist, pilokarpin hidroklorid (0,001 mg/g) (321). Miševi su položeni na leđa, a stražnje noge i rep fiksirani su medicinskim flasterom (Micropore, Tosama Trade d.o.o., Zagreb, Hrvatska) za stolić kako ne bi došlo do pomaka tijekom mjerenja. Glava miševa je bila niža naspram repa, kako bi se smanjila mogućnost degluticije i aspiracije sline.

Uzeli smo filter papir iz pripadajuće epruvete navedenog miša i pozicionirali ga tako da je početak papirića smješten iza gornjih i donjih inciziva. Kriterij za određivanje početka mjerenja je bilo vrijeme od aplikacije pilokarpina i vidljivih znakova izražene salivacije. Kada smo uočili početak stimulacije, započeto je mjerenje zapornim satom i kolekcija sline. Kako se

papirić natapao slinom, pažljivo smo ga pomicali na suhi dio i pritom pazili da se izbjegne moguća ozljeda sluznice (*eng. paper cut*) i kontaminacija sline. Test sakupljanja trajao je 15 minuta, nakon čega su trakice vraćene u pripadajuće epruvete te su ponovno vagane. Količina izlučene sline određena je gravimetrijskom metodom, a protok je izražen kao protok stimulirane sline kroz 15 minuta po gramu tjelesne mase životinje. Za potrebe određivanja analita, epruvete su centrifugirane (15 000 g, 10 min., 24 °C), a dobiveni uzorci su pohranjeni na -20 °C. Tijekom trajanja anestezije, a nakon provedenog sakupljanja sline (sat vremena nakon primjene UGN-a) životinje su žrtvovane cervikalnom dislokacijom. Nakon toga pristupili smo izolaciji SMB žlijezda slinovnica, duodenuma, pluća i bubrega. Korteks bubrega pažljivo je seciran, a tkivo je brzo zamrznuto u tekućem dušiku i pohranjeno na -80°C do upotrebe.

### 3.4. Postupak mjerenja pH i elektrolita u slini

pH je mjereno na plinskom analizatoru krvi GEM Premier 4 000 (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, SAD) korištenjem namjenskih pH-senzora. Analitičko mjerno područje za pH bilo je od 6,80 do 8,00. Za potrebe određivanja koncentracije  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  i  $\text{Cl}^-$  korištena je neizravna potenciometrija, a upotrjebljeni su originalni reagensi i protokoli prema uputama proizvođača na potpuno automatiziranom analizatoru Alinity c (Abbott Laboratories, Chicago, IL, SAD) (Slika 12.). Za mjerenje  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  korištene su aplikacije za urin koje su pokazale zadovoljavajuće mjerne raspone za uzorke sline (od 20 do 400 mmol/L, odnosno od 1 do 300 mmol/L), dok je  $\text{Cl}^-$  bio izmjereno aplikacijom za serum koja je pokrila raspon koncentracija od 50 do 150 mmol/L.



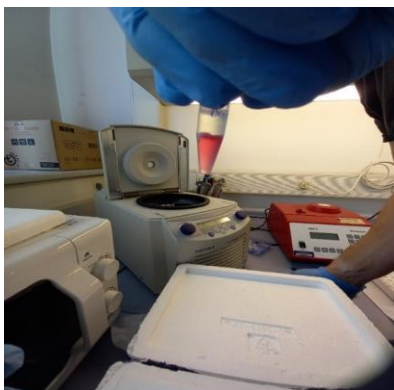
**Slika 12. Određivanje pH i elektrolita u slini.** Zavod za Laboratorijsku Dijagnostiku, KBC Zagreb, Zagreb, Hrvatska.

### 3.5. Određivanje izražaja mRNA za ionske transportere i kanale za vodu

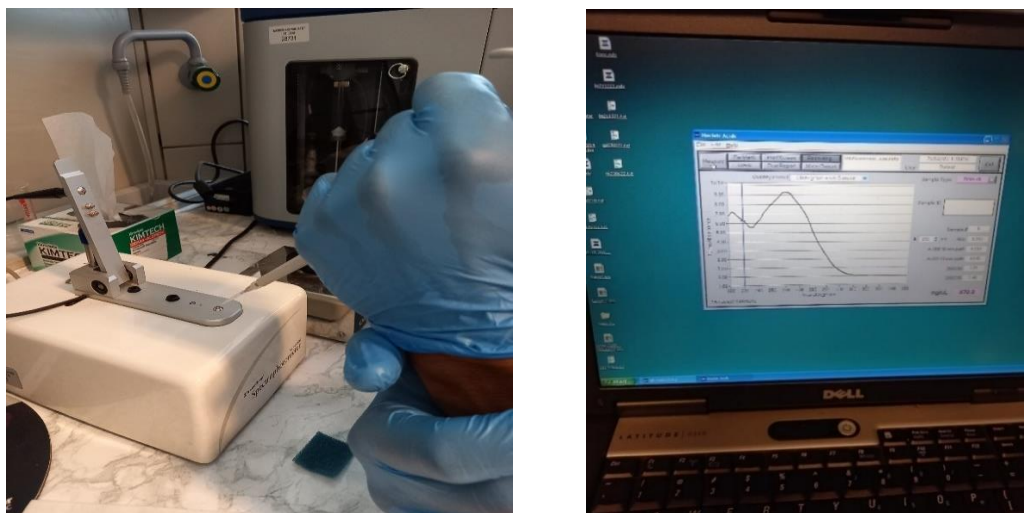
Da bismo kvantificirali izražaj ionskih transportera i kanala za vodu u žlijezdama slinovnicama, duodenumu, plućima te bubrežnom korteksu koristili smo lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu (engl., *quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR). Za provođenje ovog dijela istraživanja prvo je trebalo izolirati RNA, prepisati je u komplementarnu DNA (cDNA) te provesti mjerenje izražaja mRNA za bjelančevine od interesa.

#### 3.5.1. Izolacija RNA

Ukupnu RNA izolirali smo na sljedeći način. Za homogenizaciju uzoraka tkiva smo koristili 1 mL otopine Trizol (ThermoFisher Scientific) na 100 mg tkiva te smo tkivo homogenizirali sonifikatorom (QSonica CL188, Newtown, CT, SAD). Nakon homogenizacije, uzorcima smo dodali 0,2 mL kloroforma (Kemika, Zagreb, Hrvatska) i ostavili na sobnoj temperaturi 5 minuta, zatim smo ih centrifugirali (15 min., +4 °C, 12 000 g). Nakon centrifugiranja uočili smo tri faze: gornju vodenu fazu koja sadrži RNA, srednju fazu s DNA, i donju organsku fazu koja sadržava proteine. Gornja vodena faza koja sadrži RNA, (Slika 13.) pažljivo smo pipetom odvojili i prenijeli je u čistu eprvetu u koju je dodano 0,5 mL izopropilnog alkohola (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka). Nakon centrifugiranja (15 min, +4°C, 12 000 g), nadtalog je uklonjen, a talog je ispran s 1 mL etanola (75%; Claro-Prom, Zagreb, Hrvatska). Uzorci su kratko centrifugirani (5 min, +4°C, 8 000 g), etanol je uklonjen, a uzorci su ostavljeni da se osuše na zraku. Izolirana RNA je otopljena u sterilnoj dH<sub>2</sub>O i kvantificirana spektrofotometrom NanoDrop ND-1 000 (Marshall Scientific LLC, Hampton, NH, SAD) (Slika 14.).



**Slika 13. Izolacija mRNA.** Nakon centrifugiranja dolazi do razdvajanja uzorka na tri faze (lijevo). Gornja je vodena faza i sadržava RNA, koju pažljivo odvojimo pipetom i premjestimo u novu eprvetu (desno).



**Slika 14. Određivanje koncentracije izolirane RNA**

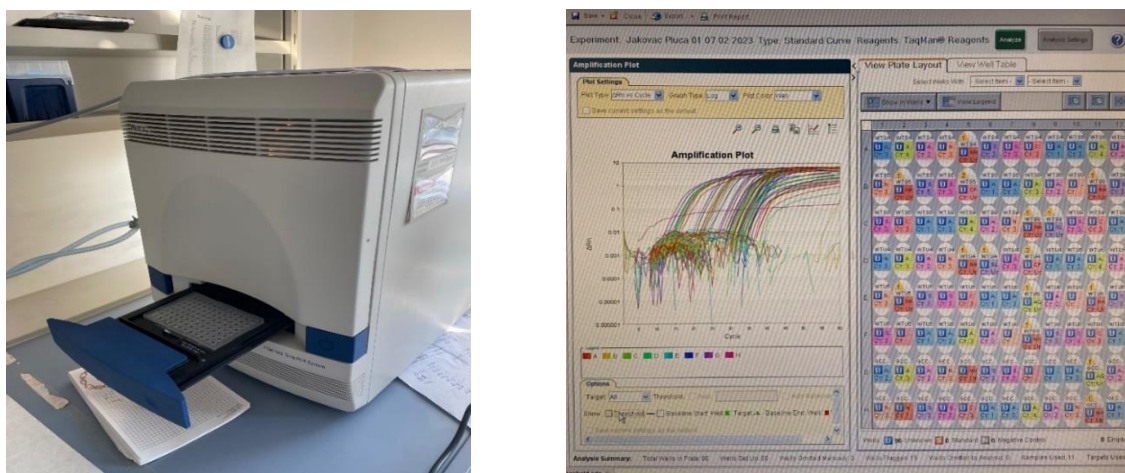
### 3.5.2. Prepisivanje RNA u komplementarnu DNA

Za prepisivanje RNA (1  $\mu\text{g}$ ) u cDNA koristili smo GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, SAD) na sljedeći način: u 1  $\mu\text{g}$  RNA uzorka (1  $\mu\text{g}$ ) smo dodali 1  $\mu\text{L}$  Oligo(dt)početnika te do volumena od ukupno 5  $\mu\text{L}$  dodali smo sterilnu vodu. Tako pripremljen uzorak smo inkubirali na 70 °C 5 minuta i zatim smo ostavili da se uzorak ohladi na +4 °C. Nakon toga smo uzorku dodali GoScript reakcijski pufer (4  $\mu\text{L}$ ),  $\text{MgCl}_2$  (2  $\mu\text{L}$ ), smjesu nukleotida (1  $\mu\text{L}$ ), inhibitore ribonukleaze (0,5  $\mu\text{L}$ ), GoScript reverznu transkriptazu (1  $\mu\text{L}$ ) i  $\text{H}_2\text{O}$  (6,5  $\mu\text{L}$ ). Nakon dodavanja potrebnih komponenata PCR-mašinom (Uno II, Biometra GmbH, Göttingen, Germany) je proveden sljedeći ciklus: 25°C (5 min.), 42°C (60 min.) i 70 °C (15 min.).

### 3.5.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Kako bismo odredili izražaj ionskih transportera i kanala za vodu koristili smo TaqMan probe (ThermoFisher Scientific) koji služi za kvantitativno određivanje genskog izražaja. Uporabljene probe su bile specifične za gene od interesa i njihovu kvantifikaciju: za akvaporine 1 (AQP1; Mm00431834\_m1), 3 (AQP3; Mm01208559\_m1) i 5 (AQP5; Mm00437578\_m1), izmjenjivač natrij-vodik 1 (NHE1; Mm00444270\_m1) i 3 (NHE3; Mm01352473\_m1), elektroneutralni natrij-hidrogenkarbonatni kotransporter 1 (NBCn1; Mm01310972\_m1), obitelj 26 nosača, članova 3 (Slc26a3; Mm00445313\_m1) i 6 (Slc26a6; Mm00506742\_m1) te

regulator transmembranske provodljivosti cistične fibroze (CFTR; Mm00445197\_m1). Kao kontrolni gen (engl. *Housekeeping gene*) koristili smo  $\beta$ -aktin (ActB; Mm00607939\_s1). Zatim smo pripremili reakcijsku smjesu: TaqMan Master Mix (10  $\mu$ L), označene početnice (1  $\mu$ L), cDNA (1  $\mu$ L) i H<sub>2</sub>O (8  $\mu$ L), a zatim smo ju kratko centrifugirali (5 min., 250 g) i postavili u uređaj za PCR u stvarnom vremenu, 7 500 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific). Dobivene ekspresije prikazane su na ekranu uređaja, rezultati su prikazani kao  $2^{-\Delta\Delta C}$  (normaliziramo prema tkivnoj ekspresiji ActB i kontrolnoj skupini životinja, Slika 15.).



**Slika 15. Određivanje izražaja specifičnih mRNA PCR-om u stvarnom vremenu.** Vezivanjem početnica za uzorak cDNA dovodi do oslobađanja fluorescentne probe koje uređaj (lijevo) detektira. Krivulja umnažanja za svaki pojedinačni uzorak (desno).

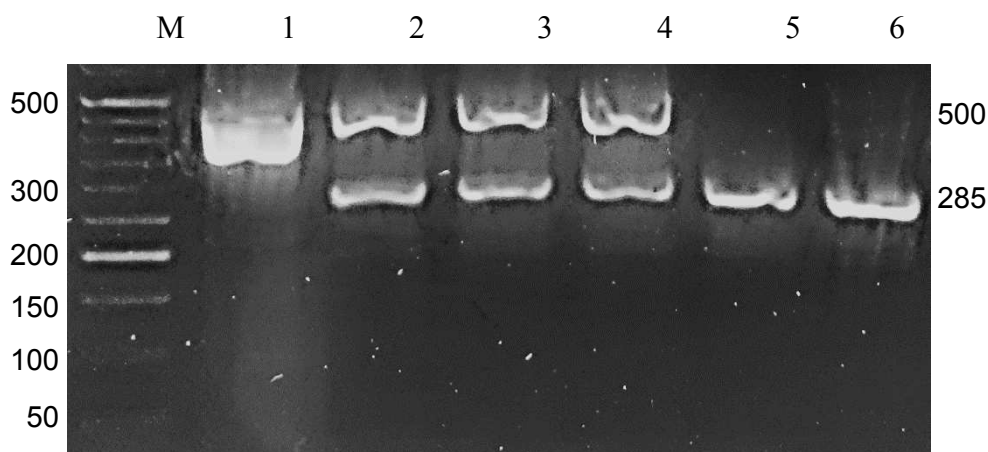
### 3.6. Statistička analiza

Kako bi provjerili pokazuju li naši rezultati normalnu distribuciju primijenili smo Kolmogorov-Smirnov test, a za usporedbu učinaka s kontrolnim vrijednostima primijenili smo Studentov nespareni *t*-test. Rezultate smo prikazali kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (engl., *standard error mean*, SEM).  $p < 0,05$  je smatrana statistički značajnom. Za određivanje korelacije između protoka sline i koncentracije iona koristili smo Pearsonov test korelacije. Za obradu podataka i statističku analizu koristili smo GraphPad InStat (GraphPad Software, Boston, MA, SAD) statistički softver.



#### 4.1. Uzgoj životinja kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C iz istog legla kao i kontrolne životinje

Za potrebe ovog istraživanja korišteni su muški miševi dviju životinjskih linija: WT miševi soja C57Bl/6NCrl te miševi kojima nedostaje gen za GC-C iz istog legla (*engl: littermates*). Za dobivanje ove vrste miševa prvo su sparivane čiste linije WT i GC-C KO životinja. Okoćeni potomci su heterozigoti. Daljnjim sparivanjem heterozigota dobivene su životinje od kojih je polovica heterozigotna, četvrtina WT, a četvrtina GC-C KO životinja. Na taj način smo dobili mužjake koji se razlikuju samo u izražaju GC-C-a (320).

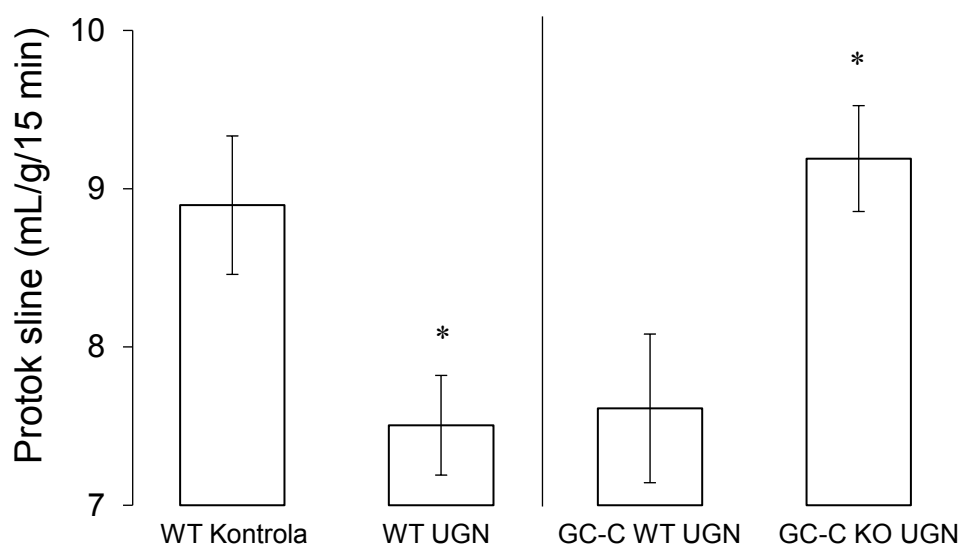


**Slika 16. Genotipizacija životinja.** Mužjaci označeni brojem 1 je divlji tip životinje, životinjama 5 i 6 nedostaje GC-C, a životinje 2, 3 i 4 su heterozigoti za GC-C. M – biljeg veličine ulomka. Brojevi s desna i lijeva označavaju veličine ulomaka u broju parova baza.

Životinjama starim 4 do 6 tjedana nakon okota označene su uši te je izuzet vršak repa iz kojeg je izolirana DNA. Lančanom reakcijom polimerazom koristeći specifične početnice te razdvajanjem na agaroznom gelu dobiveni su produkti: 285 parova baza ako se radilo o homozigotnoj GC-C KO životinji te 500 parova baza ako se radilo o homozigotnoj WT životinji. Na navedeni način genotipizirane heterozigotne životinje posjedovale su oba produkta te nisu korištene u ovom istraživanju (Slika 16.).

## 4.2. Sistemni urogvanilin mijenja sastav i brzinu stvaranja sline

Do danas su GP bili proučavani smo kao unutrašnji regulatori funkcije žlijezda slinovnica. Stoga je cilj ove doktorske disertacije utvrditi postojanje učinaka UGN-a na stanice žlijezda slinovnica s njihove BL strane kako bi u fiziološkim uvjetima UGN proizveden u crijevima i otpušten u krv nakon obroka mogao djelovati. UGN je primijenjen i.p., a pilokarpinom stimulirano stvaranje sline i njen sastav je određen do 30 minuta nakon primjene UGN-a.



**Slika 17. Urogvanilin smanjuje pilokarpinom stimulirano stvaranje sline.** Nakon i.p. primjene urogvanilina (UGN) smanjuje stvaranje sline u životinja divljeg tipa (WT UGN), ali je u životinja kojima nedostaje GC-C (GC-C KO UGN) protok viši u odnosu na GC-C WT UGN skupinu životinja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM, n = 6-8. \* p < 0,05

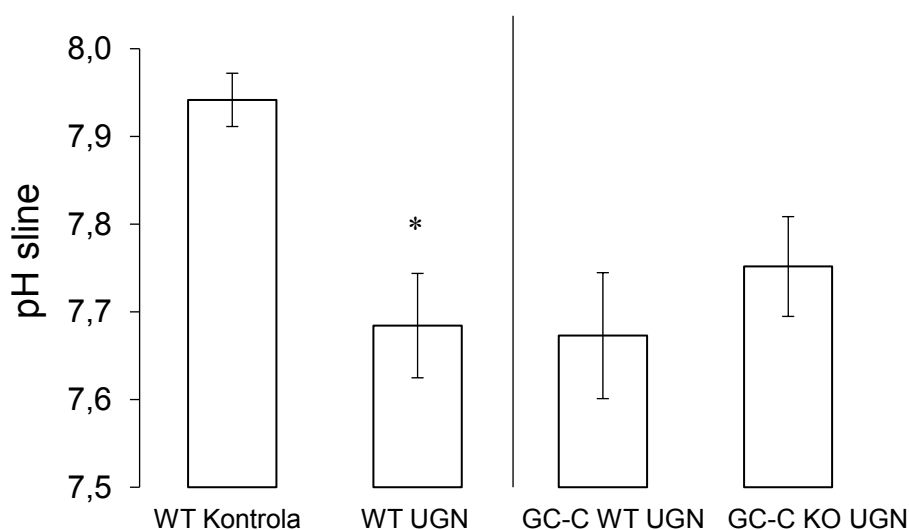
### 4.2.1. Urogvanilin smanjuje stvaranje sline stimulirane pilokarpinom

Prvi primijećen učinak i.p. primijenjenog UGN-a bio je smanjenje protoka (stvaranja) sline potaknute pilokarpinom (Slika 17.). U životinja kojima nedostaje GC-C (GC-C KO UGN), protok sline je povećan u odnosu na GC-C WT UGN životinje što ukazuje na ulogu GC-C-a u ovom UGN učinku.



## 4.2.2. Urogvanilin mijenja pH i ionski sastav sline stimulirane pilokarpinom

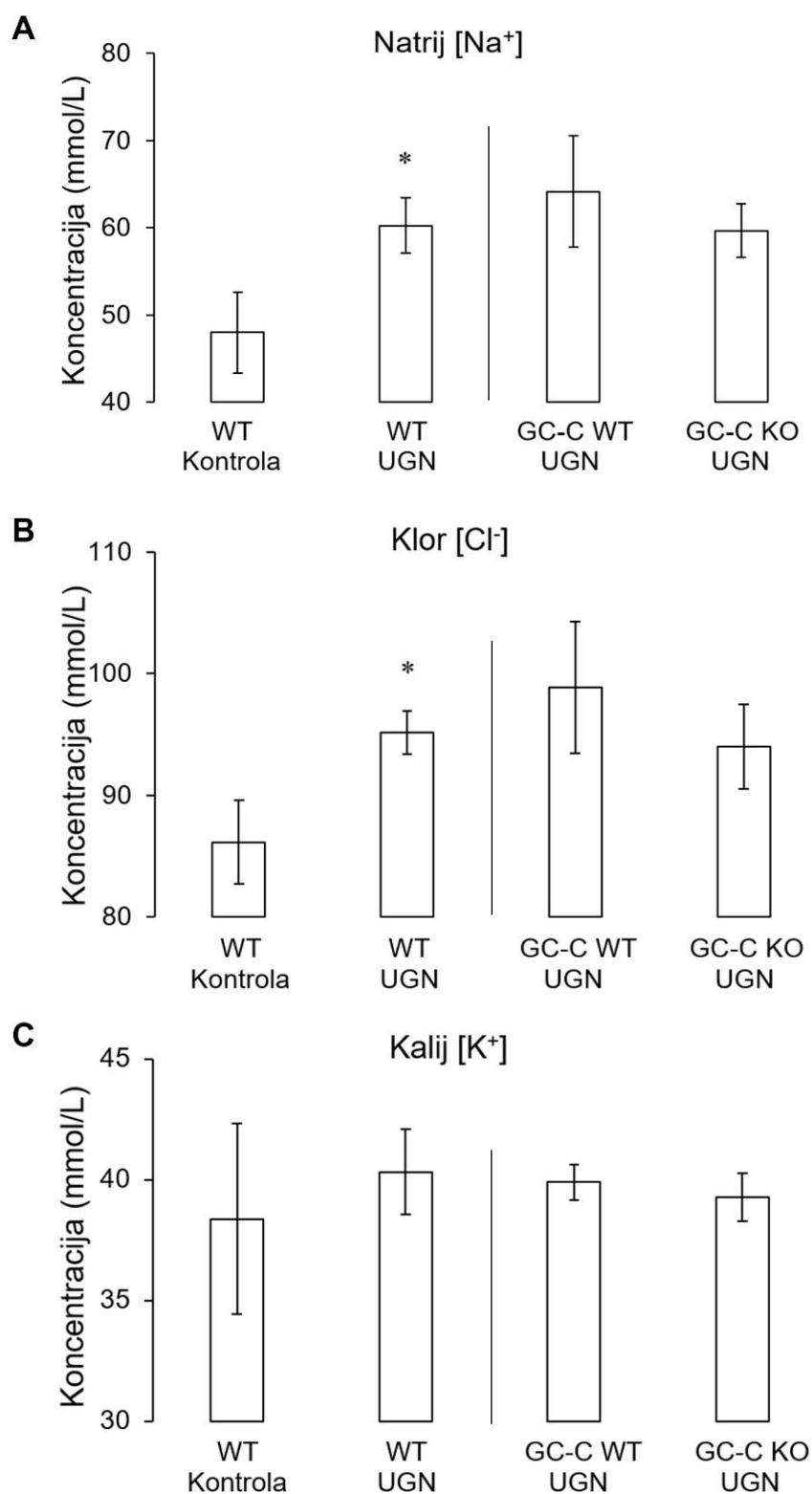
Ionski sastav pilokarpinom stimulirane sline sedmomjesečnih divljih tipova miševa korištenih u ovoj doktorskoj disertaciji bio je:  $\text{pH} = 7,94 \pm 0,03$ ;  $[\text{Na}^+] = 47,98 \pm 4,63 \text{ mmol/L}$ ;  $[\text{K}^+] = 38,38 \pm 3,94 \text{ mmol/L}$ ;  $[\text{Cl}^-] = 86,14 \pm 3,40 \text{ mmol/L}$ .



**Slika 18. Urogvanilin snižava pH stimulirane sline.** Nakon i.p. primjene urogvanilina (UGN) pH sline se smanjuje. Ne postoji razlika u pH pod djelovanjem UGN-a kod GC-C WT i GC-C KO životinja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM, n = 6-8. \*  $p < 0,05$

Nakon i.p. primjene UGN-a pH sline se smanjuje (WT Kontrola:  $7,94 \pm 0,03$ ; WT UGN:  $7,68 \pm 0,06$ ,  $p = 0,004$ ). pH sline se ne mijenja u životinja kojima receptor za UGN nedostaje (GC-C WT:  $7,75 \pm 0,05$ , GC-C KO UGN:  $7,67 \pm 0,07$ ;  $p = 0,419$ ) ukazujući na postojanje GC-C neovisnog signalnog puta u žlijezdama slinovnicama (Slika 18.).

Uz promjenu veličine stvaranja sline i pH, i.p. primjena UGN-a dovodi i do povećanja koncentracije  $\text{Na}^+$  (WT Kontrola:  $47,98 \pm 4,63 \text{ mmol/L}$ ; WT UGN:  $60,25 \pm 3,15$ ,  $p = 0,046$ ) i  $\text{Cl}^-$  (WT Kontrola:  $86,14 \pm 3,40 \text{ mmol/L}$ ; WT UGN:  $95,13 \pm 1,78$ ,  $p = 0,030$ ), ali ne i  $\text{K}^+$  (WT Kontrola:  $38,38 \pm 3,94 \text{ mmol/L}$ ; WT UGN:  $40,31 \pm 1,77$ ,  $p = 0,661$ ). Nakon primjene UGN-a koncentracije navedenih iona nisu se razlikovale u životinja koje su posjedovale GC-C u odnosu na one koje nisu (Slika 19.).



**Slika 19. Urogvanilin povećava koncentraciju Na<sup>+</sup> i Cl<sup>-</sup>, ali koncentracija K<sup>+</sup> ostaje nepromijenjena.** Nakon i.p. primjene urogvanilina (UGN) dolazi do porasta koncentracije Na<sup>+</sup> (A) i Cl<sup>-</sup> (B), ali ne i K<sup>+</sup> (C) u pilokarpinu stimuliranoj slini. Nakon i.p. primjene UGN-a koncentracije iona se statistički značajno ne razlikuju kod životinja kojima nedostaje GC-C (GC-C KO) u odnosu na GC-C WT. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM, n = 6-8. \* p < 0,05

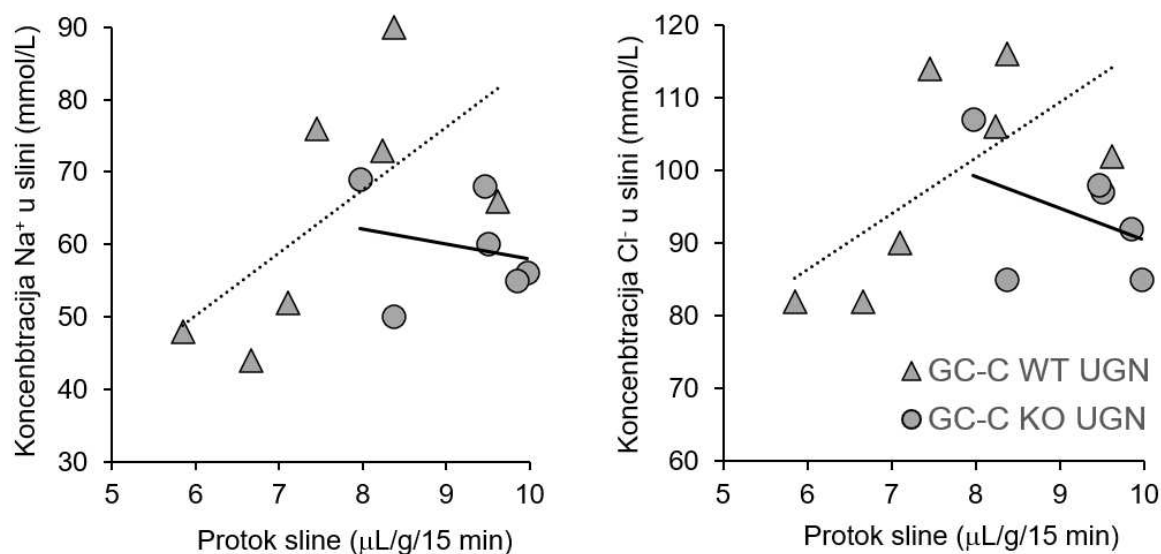
## 4.2.3. Promjena odnosa protoka i ionskog sastava sline nakon primjene urogvanilina

Prolazeći kroz izvodni kanal žlijezde slinovnice,  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  se reapsorbiraju, dok se  $\text{HCO}_3^-$  i  $\text{K}^+$  izlučuju. Ljudska PA žlijezda stvara slinu s većom koncentracijom  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$ , a manjom koncentracijom  $\text{K}^+$  što je protok sline kroz izvodni kanalić veći (koncentracije  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  su u pozitivnoj korelaciji, a koncentracija  $\text{K}^+$  u negativnoj korelaciji s protokom sline) (85). pH sline raste s povećanjem protoka zbog povećanja koncentracije  $\text{HCO}_3^-$ . Nekoliko sati nakon obroka, kada je utjecaj endogenog UGN-a mali, nismo pronašli statistički značajnu korelaciju između veličine stvaranja sline stimulirane pilokarpinom i koncentracije ispitivanih iona kod svih WT životinja (Tablica 6.). Nakon i.p. primjene UGN-a, pH raste s povećanjem protoka, što je statistički značajno. Povećanje protoka sline kod svih WT životinja nakon primjene UGN-a daje naslutiti pozitivnu korelaciju s koncentracijom  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  i  $\text{Cl}^-$ , ali ta korelacija je statistički značajna samo za kalijeve ione (Tablica 6.). Svi navedeni učinci UGN-a na korelaciju protoka i ionskog sastava sline ne postoje u GC-C KO životinja. Za  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  korelacije su prikazane na slici 20.

**Tablica 6. Promjena odnosa protoka sline i ionskog sastava nakon sistemne primjene urogvanilina**

Koncentracija iona/protok sline		pH	$\text{Na}^+$	$\text{K}^+$	$\text{Cl}^-$
WT Kontrola	r =	0,79	-0,05	0,20	0,13
	p =	0,06	0,90	0,63	0,78
WT UGN	r =	<b>0,53</b>	0,48	<b>0,56</b>	0,49
	p =	<b>0,04</b>	0,07	<b>0,03</b>	0,06
GC-C KO UGN	r =	0,46	-0,23	0,08	-0,43
	p =	0,36	0,67	0,88	0,40

GC-C – gvanilat-ciklaza C, GC-C KO – životinje kojima nedostaje GC-C, UGN – urogvanilin, WT – divlji tip životinja. Statistički značajna korelacija prikazana je podebljano.



**Slika 20. Pozitivna korelacija koncentracije  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  u slini u odnosu na protok sline pod djelovanjem urogvanilina nestaje u životinja kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C.** Nakon intraperitonealne primjene urogvanilina (UGN) koncentracija  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  je u pozitivnoj korelaciji s veličinom stvaranja sline, a ta fiziološka korelacija se gubi kod životinja kojima nedostaje GC-C. GC-C KO – životinje kojima nedostaje GC-C, GC-C WT – divlji tip životinja iz istog legla kao i GC-C KO životinje, UGN - urogvanilin

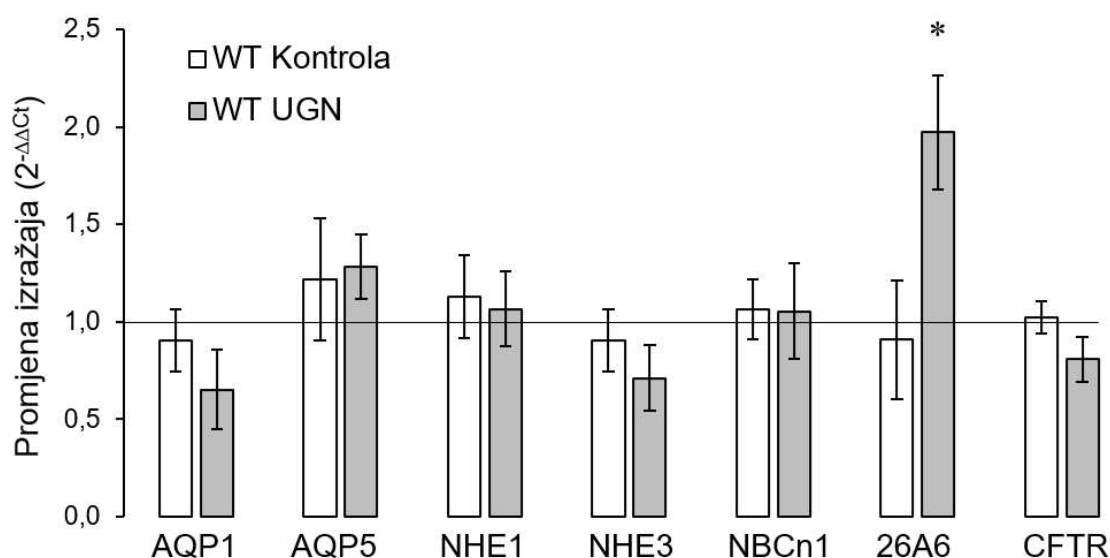
#### 4.3. Urogvanilin mijenja izražaj mRNA za ionske transportere neovisno o gvanilat-ciklazi C u submandibularnim žlijezdama slinovnicama miševa

Da bismo utvrdili mehanizam djelovanja UGN-a odredili smo izražaj mRNA za kanale za vodu (AQP1 i 5), izmjenjivač  $\text{Na}^+$  i  $\text{H}^+$  (NHE1 i NHE3), elektroneutralni kotransporter natrija i hidrogenkarbonata (NBCn1), transportere iz obitelji 26 (Slc26a3 i Slc26a6) te CFTR. Izražaj će biti prikazan u odnosu na kontrolni gen  $\beta$ -aktin te kontrolnu skupinu životinja kao  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . Izražaj mRNA nije prikazan za bjelančevine koje nisu pronađene u pojedinim tkivima.

##### 4.3.1. Urogvanilin povećava izražaj mRNA za član 6 obitelji 26 transportera otopljenih tvari u submandibularnim žlijezdama slinovnicama

U ovom istraživanju izražaj mRNA za AQP3 i Slc26a3 u SMB žlijezdama slinovnicama miševa nije pronađen. Od ostalih AQP-a najviši izražaj je imala mRNA za AQP5 i primjena UGN-a nije mijenjala njegov izražaj (Slika 21.).

Od svih testiranih ionskih transportera i kanala za vodu nakon primjene UGN-a došlo je do porasta izražaja mRNA samo za Slc26a6 (dvostruki porast,  $p = 0,027$  u odnosu na kontrolnu skupinu životinja, Slika 21.).

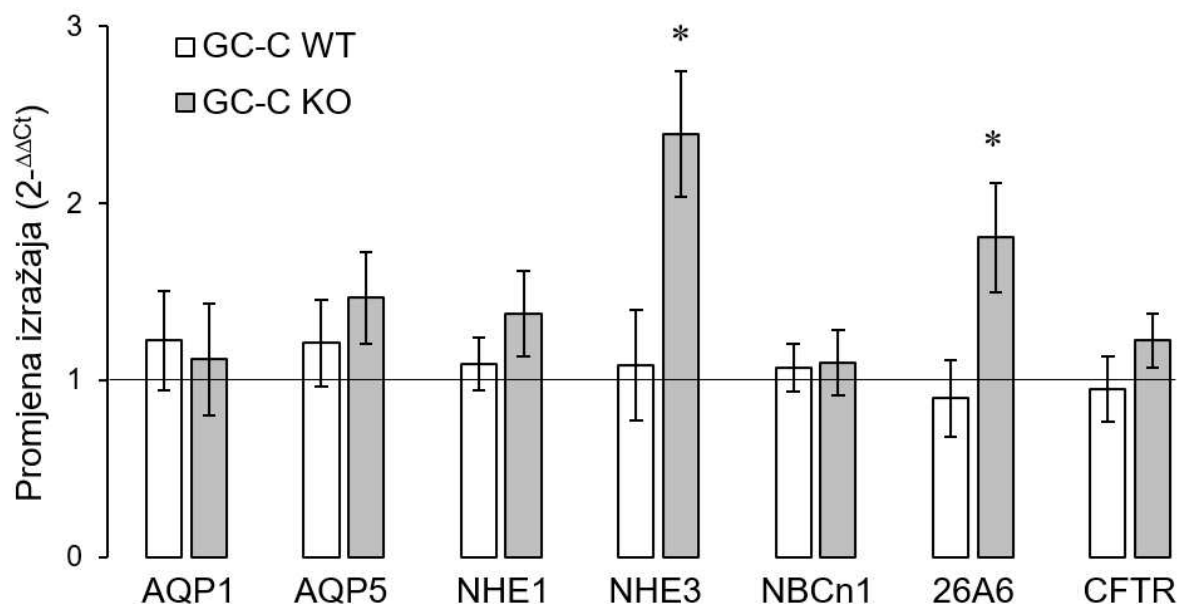


**Slika 21. Uroguanilin primijenjen intraperitonealno povećava izražaj mRNA za član 6 obitelji 26 transportera otopljenih tvari u submandibularnim žlijezdama slinovnicama miševa.** Učinak uroguanilina (UGN) na izražaj mRNA za kanale za vodu izoforme 1 i 5 (AQP),  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  izmjenjivač (NHE) izoforme 1 i 3, elektroneutralni kotransporter natrija i hidrogenkarbonata izoformu 1 (NBCn1), transporter iz obitelji 26 član 6 (Slc26a6) te transmembranski regulator provodljivosti za cističnu fibrozu (CFTR). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM,  $n = 7-9$ . \*  $p < 0,05$  statistički značajan učinak u odnosu na WT kontrolu. 26A6 – Slc26a6, WT – divlji tip životinja

4.3.2. Izražaj mRNA za član 6 obitelji 26 transportera otopljenih tvari i  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  izmjenjivač izoforme 3 je viši u submandibularnim žlijezdama slinovnicama životinja kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C

Je li ovaj učinak UGN-a ovisan o do sada jedinom poznatom receptoru za GP, GC-C-u? Da bismo to odredili koristili smo životinje koje imaju GC-C i one koje ga nemaju, ali iz istog legla. Uspoređivanjem izražaja kanala za vodu i ionskih transportera ove dvije skupine životinja, statistički značajan je bio viši izražaj mRNA za Slc26a6 u životinja kojima nedostaje GC-C ( $p = 0,024$  u odnosu na WT životinja iz istog legla, GC-C WT), ukazujući da je njegova regulacija UGN-om neovisna o aktivaciji GC-C-a (Slika 22.). Nisu prikazani rezultati za AQP 3 i Slc26a3 čiji izražaj nije pronađen u SMB žlijezdama slinovnicama miševa.

Nadalje, iako i.p. primjena UGN-a ne mijenja izražaj NHE3, ne iznenađuje i rezultat da u životinja kojima nedostaje GC-C izražaj NHE3 je dvostruko viši u odnosu na izražaj u SMB žlijezdama GC-C WT miševa ( $p = 0,016$ , Slika 22.).



**Slika 22.** U submandibularnim žlijezdama slinovnicama životinja kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C viši je izražaj mRNA za član 6 obitelji 26 transportera otopljenih tvari i  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  izmjenjivač izoforme 3 u odnosu na iste žlijezde divljeg tipa životinja. Izražaj mRNA za kanale za vodu i ionske transportere prikazan je kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM,  $n = 7-10$ . \*  $p < 0,05$  statistički značajan učinak u odnosu na izražaj u submandibularnoj žlijezdi slinovnici divljeg tipa životinja iz istog legla. 26A6 –transporter iz obitelji 26 član 6, Slc26a6, AQP1/5 – kanali za vodu izoforme 1 i 5; CFTR - transmembranski regulator provodljivosti za cističnu fibrozu; NBCn1 - elektroneutralni kotransporter natrija i hidrogenkarbonata izoforma 1; NHE1/3 -  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  izmjenjivač izoforme 1 i 3; WT – divlji tip životinja; GC-C KO – životinje kojima nedostaje GC-C; GC-C WT – životinje divljeg tipa iz istog legla kao i GC-C KO životinje

**Tablica 7. Odnos protoka i ionskog sastava sline i izražaja mRNA za ionske transportere i kanale za vodu**

WT Kontrola		protok	pH	[Na <sup>+</sup> ]	[K <sup>+</sup> ]	[Cl <sup>-</sup> ]
AQP1	r =	-0,28	-0,86	-0,62	-0,90	0,98
	p =	0,72	0,34	0,38	0,10	0,12
AQP5	r =	-0,17	-0,98	-0,84	<b>-0,99</b>	0,98
	p =	0,83	0,12	0,16	<b>0,01</b>	0,12
NHE1	r =	-0,19	-0,97	-0,82	<b>-0,98</b>	0,99
	p =	0,82	0,14	0,18	<b>0,02</b>	0,10
NHE3	r =	-0,33	-0,73	-0,46	-0,80	0,98
	p =	0,67	0,48	0,54	0,20	0,12
NBCn1	r =	-0,08	-0,89	-0,85	-0,64	-0,80
	p =	0,92	0,30	0,15	0,36	0,40
Slc26a6	r =	-0,19	-0,97	-0,80	<b>-0,98</b>	0,98
	p =	0,81	0,17	0,20	<b>0,02</b>	0,12
CFTR	r =	<b>-0,98</b>	-0,30	0,11	-0,28	0,72
	p =	<b>0,02</b>	0,81	0,89	0,72	0,49
WT UGN		protok	pH	[Na <sup>+</sup> ]	[K <sup>+</sup> ]	[Cl <sup>-</sup> ]
AQP1	r =	-0,57	-0,02	0,59	-0,58	0,14
	p =	0,44	0,98	0,41	0,42	0,86
AQP5	r =	-0,38	0,34	0,85	-0,47	0,32
	p =	0,62	0,66	0,15	0,53	0,68
NHE1	r =	-0,09	0,15	0,32	-0,06	0,48
	p =	0,91	0,85	0,48	0,94	0,52
NHE3	r =	0,02	-0,35	-0,29	0,16	0,06
	p =	0,97	0,65	0,71	0,84	0,94
NBCn1	r =	0,20	-0,17	-0,61	0,19	-0,45
	p =	0,80	0,83	0,39	0,81	0,55
Slc26a6	r =	-0,27	0,47	0,81	-0,40	0,26
	p =	0,73	0,53	0,19	0,60	0,74
CFTR	r =	0,91	0,37	-0,25	<b>0,95</b>	0,44
	p =	0,09	0,63	0,75	<b>0,046</b>	0,56

GC-C WT		protok	pH	[Na <sup>+</sup> ]	[K <sup>+</sup> ]	[Cl <sup>-</sup> ]
AQP1	r =	-0,28	-0,27	-0,18	0,12	-0,18
	p =	0,65	0,67	0,77	0,85	0,78
AQP5	r =	-0,23	0,03	-0,02	0,10	-0,10
	p =	0,95	0,95	0,97	0,84	0,84
NHE1	r =	0,16	0,11	0,27	0,31	0,24
	p =	0,74	0,81	0,56	0,49	0,61
NHE3	r =	0,49	-0,11	0,11	0,22	0,18
	p =	0,40	0,86	0,86	0,72	0,77
NBCn1	r =	0,04	-0,07	0,13	0,22	0,14
	p =	0,93	0,89	0,78	0,64	0,77
Slc26a6	r =	0,25	0,06	0,15	0,06	0,17
	p =	0,69	0,93	0,81	0,92	0,79
CFTR	r =	-0,05	-0,15	0,32	0,23	0,48
	p =	0,93	0,78	0,53	0,66	0,33

GC-C KO		protok	pH	[Na <sup>+</sup> ]	[K <sup>+</sup> ]	[Cl <sup>-</sup> ]
AQP1	r =	-0,49	-0,36	-0,55	-0,80	-0,45
	p =	0,32	0,48	0,26	0,05	0,37
AQP5	r =	-0,15	0,65	0,72	-0,60	0,40
	p =	0,81	0,24	0,17	0,28	0,51
NHE1	r =	0,06	0,58	0,60	-0,07	0,48
	p =	0,91	0,22	0,21	0,89	0,34
NHE3	r =	0,02	-0,30	0,12	0,64	0,46
	p =	0,97	0,56	0,82	0,17	0,36
NBCn1	r =	0,02	0,66	0,35	-0,40	0,17
	p =	0,97	0,15	0,49	0,43	0,74
Slc26a6	r =	-0,37	0,36	0,32	-0,57	0,21
	p =	0,47	0,48	0,53	0,23	0,69
CFTR	r =	0,11	-0,29	-0,02	0,64	0,31
	p =	0,83	0,57	0,97	0,17	0,55

AQP1/5 – kanali za vodu izoforme 1 i 5; CFTR - transmembranski regulator provodljivosti za cističnu fibrozu; GC-C KO - životinje kojima nedostaje GC-C; GC-C WT - divlji tip životinja; NBCn1 - elektroneutralni kotransporter natrija i hidrogenkarbonata izoforma 1; NHE1/3 - Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> izmjenjivač izoforme 1 i 3; Slc26a6 –transporter iz obitelji 26 član 6, UGN – urogvanilin; WT – divlji tip životinja. Statistički značajna korelacija prikazana je podebljano.



#### 4.3.3. Odnos protoka i ionskog sastava sline s izražajem transportera i kanala u submandibularnim žlijezdama slinovnicama

Iako je model izlučivanja vode i iona slinom vrlo kompleksan, željeli smo istražiti postoji li korelacija između veličine protoka (stvaranje) sline i ionskog sastava sline te izražaja mRNA za kanale za vodu te ionske transportere u sve četiri skupine životinja (Tablica 7.).

AQP 5 se nalazi na membrani acinusnih stanica SMB žlijezda slinovnica miševa, kao i u interkaliranom (umetnutom) izvodnom kanaliću iste žlijezde. Povećanjem izražaja AQP5 dolazi do povećanja protoka sline, što rezultira smanjenom koncentracijom  $K^+$  ( $r = -0,9862$ ,  $p = 0,0138$ ). Koncentracija  $K^+$  je u negativnoj korelaciji sa sekrecijom  $Cl^-$ , a u pozitivnoj s njegovom reapsorpcijom (Slc26a6 vs  $[K^+]$ :  $r = -0,9754$ ,  $p = 0,0246$ , CFTR vs  $[K^+]$ :  $r = 0,9539$ ,  $p = 0,0461$ ).

#### 4.4. Urogvanilin primijenjen sistemno mijenja izražaj ionskih transportera i u drugim organima

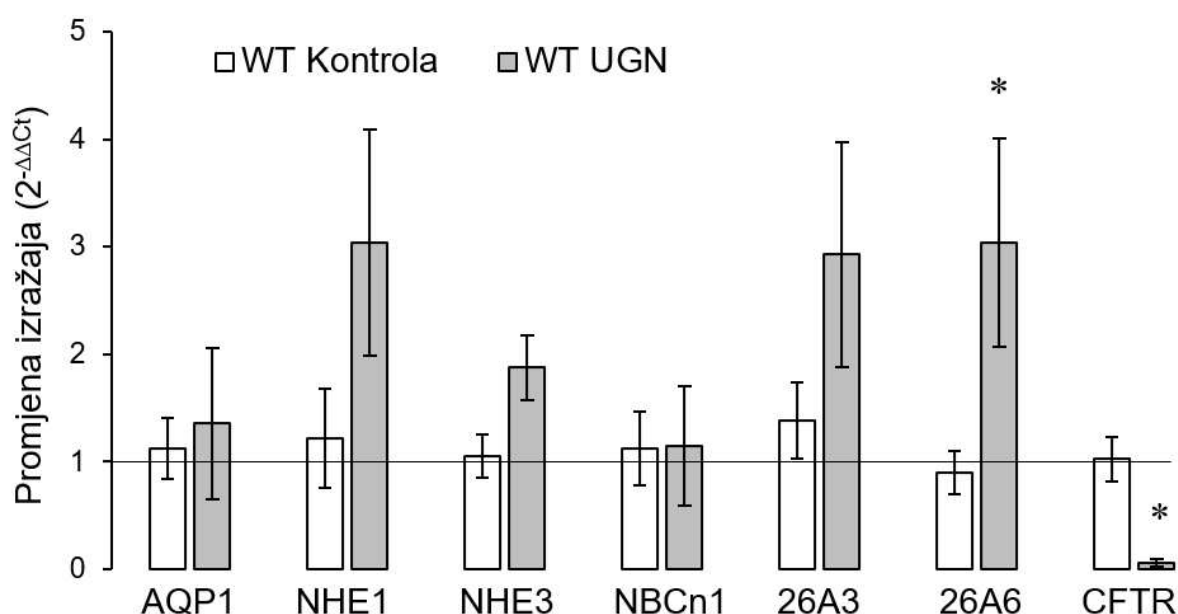
Primjenom UGN-a i.p., mogli smo istražiti i utjecaj ovog hormona na izražaj mRNA za kanale za vodu i ionske transportere u organima gdje je uloga GP-a, pa tako i UGN-a, dobro istražena. Također, provođenjem istraživanja na životinjama koje imaju ili nemaju GC-C iz istog legla, procijenili smo je li učinak UGN-a ovisan o GC-C-u ili ne.

##### 4.4.1. Duodenum

Do danas je dokazan učinak UGN-a putem GC-C-a smještenog na luminalnoj membrani enterocita, što dovodi do inhibicije apsorpcije  $Na^+$  (inhibicija NHE3) i vode, te istodobno potiče sekreciju  $Cl^-$  djelovanjem na CFTR. GC-C neovisan signalni put pokazan je učinkom UGN-a i na BL membranu enterocita, što dovodi do povećanja unutarstanične koncentracije  $Ca^{2+}$  i smanjenja cAMP-a te posljedične sekrecije  $HCO_3^-$  (294).

#### 4.4.1.1. Sistemna primjena urogvanilina u duodenumu povećava izražaj mRNA za transportere hidrogenkarbonata i klora

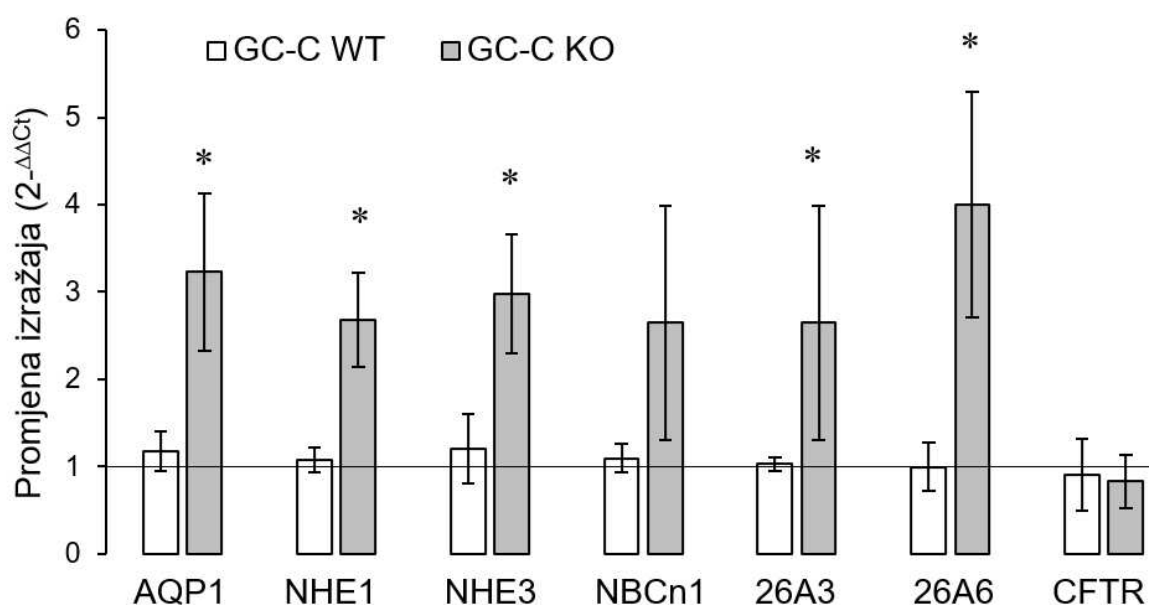
U ovom istraživanju, UGN, djelovanjem na BL membranu duodenalnih stanica, dovodi do povećanja izražaja mRNA za Slc26a6 (Slika 23.) što je prikazano i za promjenu izražaja ovog transportera u SMB žlijezdi. Uloga u sekreciji  $\text{HCO}_3^-$  prikazana je i promjenom izražaja  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  izmjenjivača Slc26a6, ali ne i Slc26a3 što ukazuje na različitu ulogu i regulaciju ova dva izmjenjivača u  $\text{HCO}_3^-$  transportu.



**Slika 23. Urogvanilin primijenjen sistemno povećava izražaj mRNA za član 6 obitelji 26 transportera otopljenih tvari, a smanjuje za transmembranski regulator provodljivosti za cističnu fibrozu u duodenumu.** Izražaj mRNA za kanale za vodu i ionske transportere prikazan je kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  statistički značajan učinak u odnosu na izražaj u duodenumu kontrolne skupine životinja. 26A3 – transporter iz obitelji 26 član 3, Slc26a3; 26A6 – transporter iz obitelji 26 član 6, Slc26a6, AQP1 – kanal za vodu izoforma 1; CFTR - transmembranski regulator provodljivosti za cističnu fibrozu; NBCn1 - elektroneutralni kotransporter natrija i hidrogenkarbonata izoforma 1; NHE1/3 -  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  izmjenjivač izoforme 1 i 3; WT – divlji tip životinja

4.4.1.2. Izražaj mRNA za članove 3 i 6 obitelji 26 transportera otopljenih tvari, izmjenjivače  $\text{Na}^+$  i  $\text{H}^+$  te kanale za vodu je viši u životinja kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C

Je li izražaj ionskih transportera i kanala za vodu u duodenumu ovisan o GC-C istražili smo na GC-C WT životinjama i životinjama kojima nedostaje GC-C iz istog legla (GC-C KO). U GC-C KO miševa pokazan je i viši izražaj mRNA za AQP1, NHE1, NHE3 te Slc26a3, iako učinak UGN-a s BL strane nije doveo do promjena u izražaju mRNA za navedene bjelančevine što ukazuje na ulogu GC-C u njihovoj regulaciji (Slika 24.). Kako je već pokazano za žlijezde slinovnice, povećan je izražaj mRNA za Slc26a6 i u duodenumu životinja kojima nedostaje GC-C (Slika 24.).



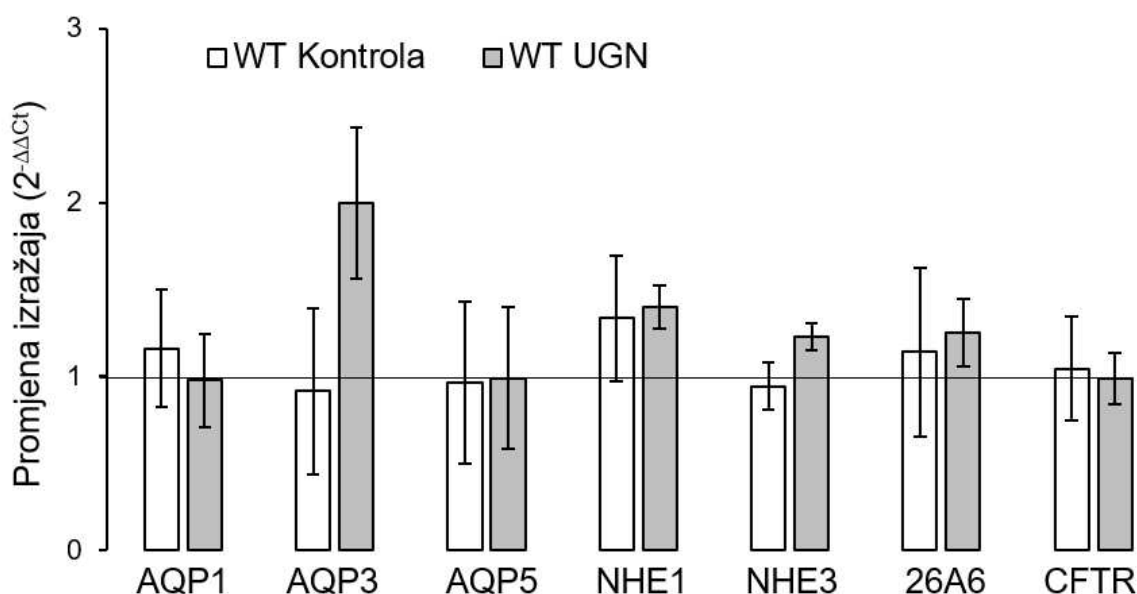
**Slika 24.** U duodenumu životinja kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C viši je izražaj mRNA za članove 3 i 6 obitelji 26 transportera otopljenih tvari, izmjenjivače  $\text{Na}^+$  i  $\text{H}^+$  te kanale za vodu u odnosu na izražaj u divljeg tipa životinja. Izražaj mRNA za kanale za vodu i ionske transportere prikazan je kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  statistički značajan učinak u odnosu na izražaj u duodenumu divljeg tipa životinja iz istog legla. 26A3 – transporter iz obitelji 26 član 3, Slc26a3; 26A6 – transporter iz obitelji 26 član 6, Slc26a6, AQP1 – kanal za vodu izoforma 1; CFTR - transmembranski regulator provodljivosti za cističnu fibrozu; NBCn1 - elektroneutralni kotransporter natrija i hidrogenkarbonata izoforma 1; NHE1/3 -  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  izmjenjivač izoforme 1 i 3; WT – divlji tip životinja; GC-C KO – životinje kojima nedostaje GC-C; GC-C WT – životinje divljeg tipa iz istog legla kao i GC-C KO životinje

## 4.4.2. Bubrež

Djelovanje GP-a putem GC-C neovisnog signalnog puta najviše je istraživano u korteksu bubrega. Pokazano je da međudjelovanje GC-C ovisnog i neovisnog puta ovisi o kojem članu obitelji GP-a se radi, te na koji dio nefrona djeluju. Do danas se malo zna o mogućem učinku GP-a djelovanjem na BL membranu stanica nefrona.

#### 4.4.2.1. Sistemna primjena urogvanilina u kori bubrega ne mijenja izražaja ionskih transportera niti kanala za vodu

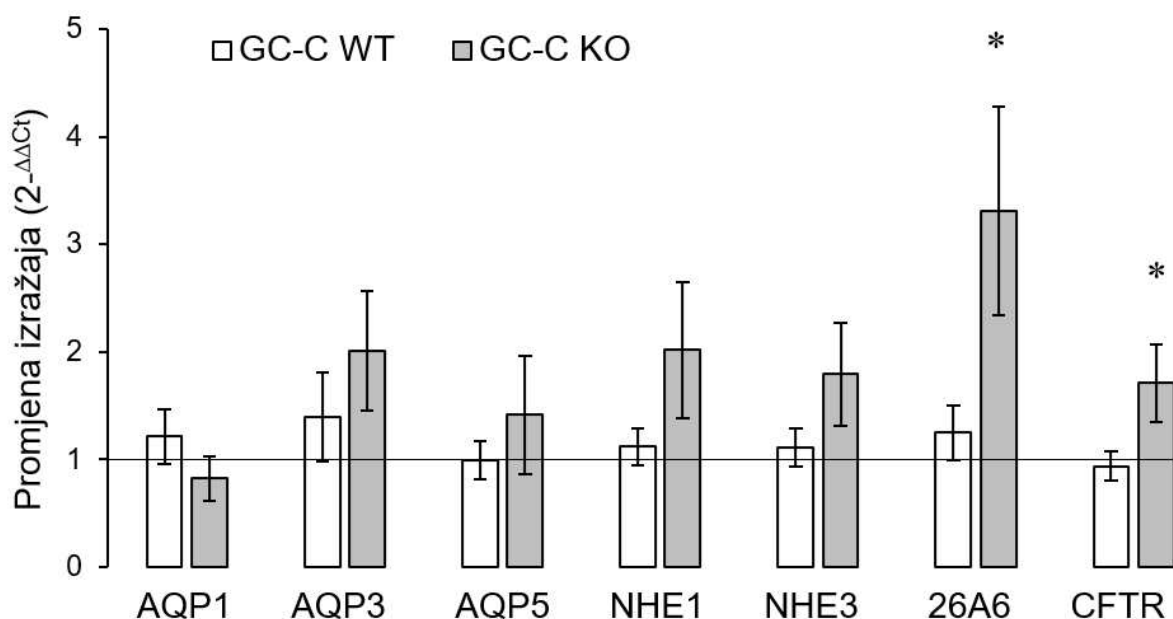
U bubrežnoj kori nalaze se proksimalni kanalići, debeli uzlazni krak Henelove petlje, distalni i sabirni kanalić. Kako je djelovanje GP-a prikazano s luminalne strane stanica nefrona (271) ne iznenađuje dobiveni rezultat u ovom istraživanju. Naime, od svih membranskih bjelančevina koje smo istražili, UGN primijenjen sistemno nije statistički značajno promijenio izražaj niti jednog ionskog transportera ili kanala za vodu (Slika 25.). Moguće djelovanje UGN-a s BL strane je ovisno o regulaciji već postojećih bjelančevina u staničnoj membrani bez promjena u njihovom izražaju.



**Slika 25. Urogvanilin primijenjen sistemno ne mijenja izražaj mRNA za prikazane bjelančevine stanične membrane u kori bubrega.** Izražaj mRNA za kanale za vodu i ionske transportere prikazan je kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM. 26A6 – transporter iz obitelji 26 član 6, Slc26a6, AQP1/3/5 – kanali za vodu izoforme 1, 3 i 5; CFTR - transmembranski regulator provodljivosti za cističnu fibrozu; NHE1/3 - Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> izmjenjivač izoforme 1 i 3; WT – divlji tip životinja

#### 4.4.2.2. Izražaj mRNA za član 6 obitelji 26 transportera otopljenih tvari i transmembranski regulator provodljivosti za cističnu fibrozu je viši u kori bubrega životinja kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C

U životinja kojima nedostaje GC-C, povišen je izražaj mRNA za Slc26a6 u usporedbi s WT životinjama iz istog legla. U GC-C KO životinja, statistički je značajno povećan i izražaj mRNA za CFTR u korteksu bubrega u usporedbi s GC-C WT životinjama (Slika 26.). To ne iznenađuje s obzirom na to da UGN može djelovati s luminalne, ali ne i BL strane na izražaj CFTR-a putem aktivacije GC-C-a.



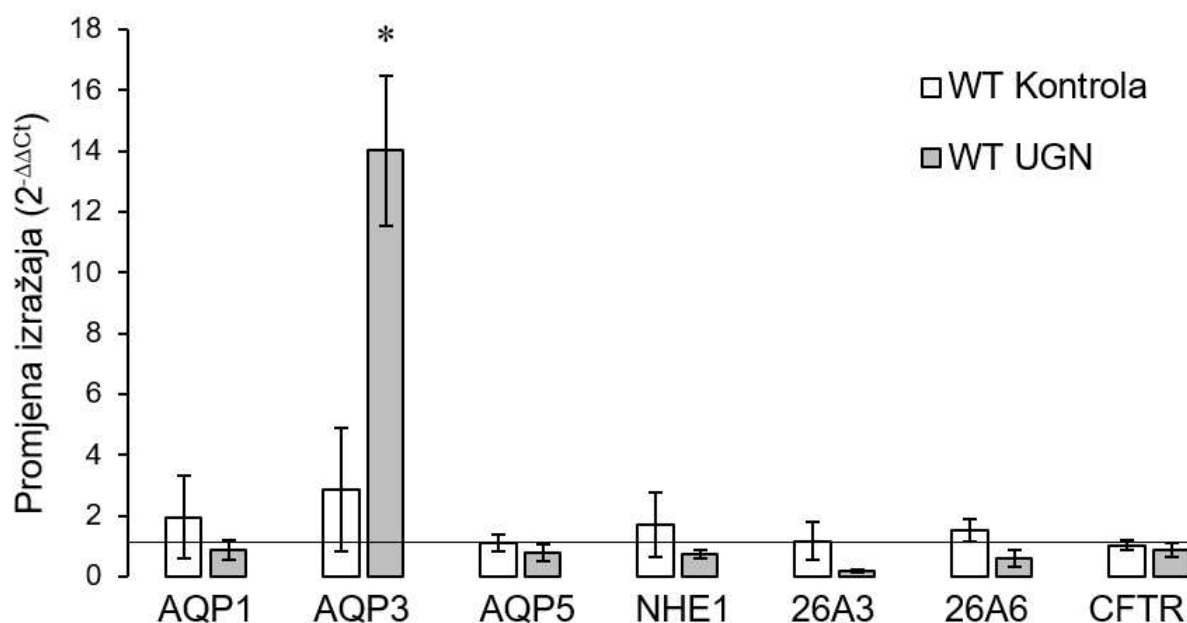
**Slika 26. U kori bubrega životinja kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C viši je izražaj mRNA za član 6 obitelji 26 transportera otopljenih tvari i transmembranski regulator provodljivosti za cističnu fibrozu u odnosu na izražaj u divljeg tipa životinja. Izražaj mRNA za kanale za vodu i ionske transportere prikazan je kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  statistički značajan učinak u odnosu na izražaj u kori bubrega divljeg tipa životinja iz istog legla. 26A6 – transporter iz obitelji 26 član 6, Slc26a6, AQP1/3/5 – kanali za vodu izoforme 1, 3 i 5; CFTR - transmembranski regulator provodljivosti za cističnu fibrozu; NHE1/3 -  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  izmjenjivač izoforme 1 i 3; WT – divlji tip životinja; GC-C KO – životinje kojima nedostaje GC-C; GC-C WT – životinje divljeg tipa iz istog legla kao i GC-C KO životinje**

#### 4.4.3. Pluća

Djelovanje GP-a pokazano je i u plućima, osobito dišnim putevima. Inhalacijska primjena UGN-a razmatra se kao moguća terapija astmatskih napada.

## 4.4.3.1. Urogvanilin primijenjen sistemno povećava izražaj mRNA za kanale za vodu 3

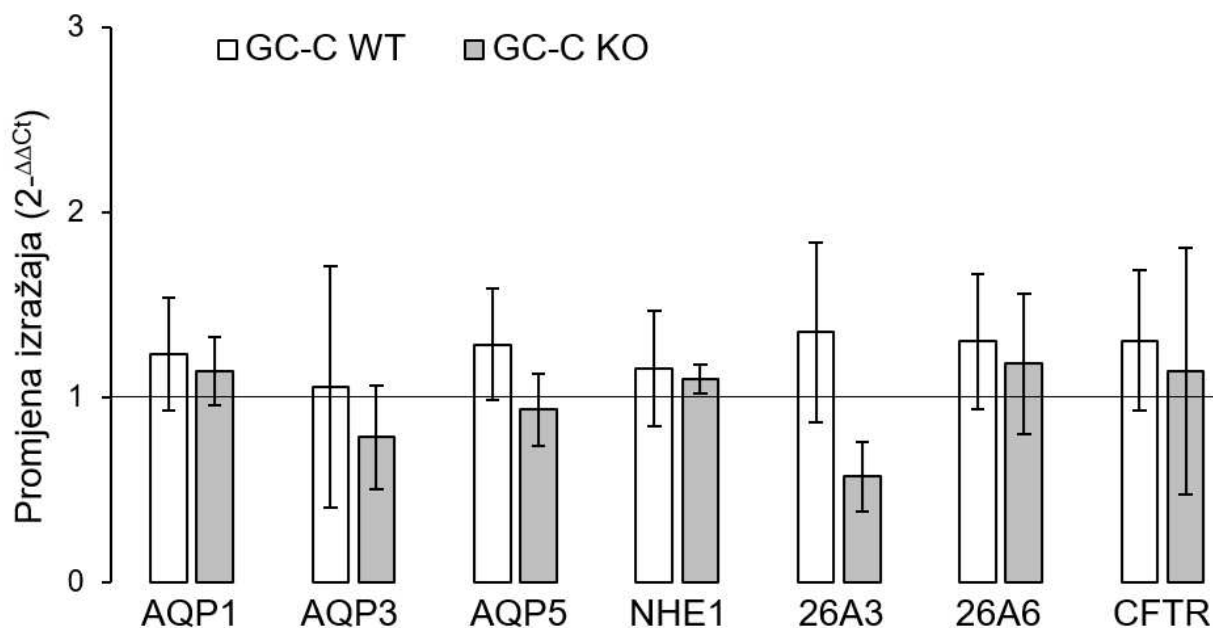
Djelovanje GP-a u dišnim putevima se očekuje s luminalne strane djelovanjem na GC-C. Djelovanjem UGN-a s BL strane stanica pluća dolazi do povećanja izražaja mRNA za AQP3, ali nije zabilježena statistički značajna razlika u izražaju mRNA za ostale bjelančevine koje smo proučavali (Slika 27.).



**Slika 27. Urogvanilin primijenjen sistemno povećava izražaj mRNA za kanale za vodu 3 u plućima.** Izražaj mRNA za kanale za vodu i ionske transportere prikazan je kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  statistički značajan učinak u odnosu na izražaj u plućima kontrolne skupine životinja. 26A3 – transporter iz obitelji 26 član 3, Slc26a3; 26A6 – transporter iz obitelji 26 član 6, Slc26a6; AQP1/3/5 – kanali za vodu izoforme 1, 3 i 5; CFTR - transmembranski regulator provodljivosti za cističnu fibrozu; NHE1 -  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  izmjenjivač izoforma 1; WT – divlji tip životinja.

## 4.4.3.2. Izražaj mRNA za kanale za vodu i ionske transportere nije promijenjen u životinja kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C

Iako i.p. primjena UGN-a mijenja izražaj mRNA za AQP3, nedostatak GC-C-a u plućima životinja ne dovodi do promjene izražaja tog kanala za vodu ukazujući na moguću ulogu GC-C neovisnog signalnog puta GP-a u njegovoj regulaciji (Slika 28.).



**Slika 28. U plućima životinja kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C ne mijenja se izražaj mRNA za kanale za vodu i transportere za ione.** Izražaj mRNA prikazan je kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM,  $n = 3-6$ . 26A3 – transporter iz obitelji 26 član 3, Slc26a3; 26A6 – transporter iz obitelji 26 član 6, Slc26a6; AQP1/3/5 – kanali za vodu izoforme 1, 3 i 5; CFTR - transmembranski regulator provodljivosti za cističnu fibrozu; NHE1 -  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  izmjenjivač izoforma 1; WT – divlji tip životinja; GC-C KO – životinje kojima nedostaje GC-C; GC-C WT – životinje divljeg tipa iz istog legla kao i GC-C KO životinje





U skupinu natrijuretskih peptida pripadaju ANP i BNP (322), agonisti GC-A, CNP (323) agonist gvanilat-ciklaze B, kao i GP kao agonisti GC-C-a. Učinci plazmatskog ANP-a na funkciju žlijezda slinovnica poznati su već gotovo tri desetljeća (324, 325). Nakon stimulacije stvaranja sline parasimpatičkom aktivacijom, ANP potiče stvaranje sline, smanjuje koncentraciju  $\text{Na}^+$ , ali povećava koncentraciju  $\text{K}^+$  u slini iz SMB žlijezde dok u slini stvorenoj u PA žlijezdi povećava koncentraciju i  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ . Stoga je cilj ove disertacije odrediti učinke agonista GC-C-a, UGN-a, na stvaranje sline te njezin ionski sastav. Kako je poznato da GP djeluju i putem GC-C ovisnog, ali i putem GC-C neovisnog signalnog puta (294), odredili smo i za koje učinke UGN-a je odgovorna aktivacija GC-C-a te posljedično stvaranje cGMP-a, a za koje učinke je odgovorna aktivacija GC-C neovisnog signalnog puta.

### **5.1. Urogvanilin smanjuje stvaranje sline stimulirane pilokarpinom te u slini povećava koncentraciju $\text{H}^+$ , $\text{Na}^+$ i $\text{Cl}^-$**

Dobiveni rezultati u ovom istraživanju (volumen stvorene sline te njezin ionski sastav) odgovara do sada objavljenim istraživanjima drugih laboratorija (17, 326). U ovom istraživanju pokazali smo da i.p. primjena UGN-a dovodi do smanjenja pilokarpinom stimuliranog stvaranja sline, što je suprotno djelovanju ANP-a (324, 325).

Prilikom stimulacije žlijezda slinovnica parasimpatikusom, dolazi do porasta unutarstanične koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  koji dovodi do sekrecije  $\text{Cl}^-$  u luminalni prostor acinusa što stvara negativni naboj, što dovodi do difuzije  $\text{Na}^+$  paracelularno u luminalni prostor. Zbog porasta koncentracije  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$ , voda osmozom dopijeva u lumen acinusa (110, 111). Glavi doprinos ove studije je taj da sistemni UGN smanjuje volumen stimulirane sline pilokarpinom (parasimpatomimetik) putem GC-C ovisnog signalnog puta, čime djeluje antagonistički. Djelovanjem na GC-C neovisan, ali  $\text{Ca}^{2+}$  ovisan signalni put (275), UGN djeluje slično parasimpatikusom, povećavajući koncentraciju  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$ , u slini.

Kao što je poznato, smanjenje stvaranja sline, te posljedično i njezina protoka kroz izvodne kanaliće žlijezda slinovnica, dovodi do smanjenja koncentracije  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  i  $\text{HCO}_3^-$ , te povećanja koncentracije  $\text{K}^+$  (85). Zanimljivo je da, iako je gušterača građena poput seroznih žlijezda slinovnica (otuda naziv "trbušna slinovnica"), s promjenom protoka gušteračnog egzogenog sekreta dolazi do sličnih promjena u koncentraciji  $\text{Cl}^-$  i  $\text{HCO}_3^-$ , dok se koncentracija  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  ne mijenja (327).

Smanjenje protoka djelovanjem UGN-a ne objašnjava i promjene ionskog sastava sline. Već utvrđena pozitivna korelacija između stvaranja sline i koncentracije  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  i  $\text{HCO}_3^-$  (snižavanje pH) opravdava očekivanje da će se sa smanjenjem protoka smanjiti i koncentracija navedenih iona. Pokazani učinak UGN-a je osim smanjenja pH i porast koncentracije  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$ . UGN nije imao učinak na koncentraciju  $\text{K}^+$ , iako bi se smanjivanjem protoka moglo očekivati povećanje njegove koncentracije (negativna korelacija). Pronađena je pozitivna korelacija veličine stvaranja sline (protoka) s pH i koncentracijom  $\text{K}^+$  i to samo u životinja koje posjeduju GC-C nakon stimulacije UGN-om. Stoga se iz dobivenih rezultata može zaključiti da učinak UGN-a na ionski sastav sline ne proizlazi samo iz promjena u volumenu sline uzrokovanih djelovanjem UGN-a. Važno je napomenuti kako se učinak UGN-a na ionski sastav stimulirane sline razlikuje od učinka sistemnog ANP-a na ionski sastav sline stvorene u PA i SMB žlijezdi (324, 325).

Kako bismo proučili moguće mehanizme djelovanja UGN-a na volumen stimulirane sline, izražaj mRNA za AQP-e je određen u SMB žlijezdama slinovnicama životinja iz istog legla koje imaju ili nemaju izražen GC-C. U svim ispitivanim skupinama, najviši izražaj je imao AQP5 što nije iznenađujuće jer upravo ova izoforma kanala za vodu ima glavnu ulogu u regulaciji volumena stvorene sline (328). Ovaj kanal za vodu je smješten na membrani acinusnih stanica SMB žlijezda slinovnica miša kao i u interkaliranom (umetnutom) izvodnom kanaliću iste žlijezde (329). Kako je na istim stanicama i njihovim membranama smješten i GC-C (295), ne iznenađuje da je djelovanje UGN-a na veličinu stvaranja sline i njen protok ovisan o GC-C-u. mRNA za AQP1 je bila slabo izražena, dok za AQP3 u ovom istraživanju nije pronađena iako je pokazana u SMB žlijezdama slinovnicama štakora (330). Izražaj mRNA za sve ispitane AQP-e se nije razlikovao među ispitivanim grupama životinja te njihova uloga u smanjenju stvaranja sline djelovanjem UGN-a ostaje nerazjašnjena. UGN vjerojatno dovodi do premještanja već postojećeg AQP u staničnu membranu, ali ne i sintezu novog. Treba imati na umu da su životinje žrtvovane 1 sat nakon primjene UGN-a te bi se moguća promjena u izražaju mRNA mogla očekivati i prije ovog vremena. Da bi utvrdili točan učinak UGN-a na AQP (ili ionske transportere) bilo bi potrebno odrediti vremenski slijed promjena izražaja na mRNA te na proteinskoj razini.

Iako je učinak UGN-a na volumen stvorene sline ovisan o aktivaciji GC-C-a jer se učinak UGN-a ne može pokazati u životinja kojima nedostaje GC-C (u odnosu na životinje koje ga imaju, a iz istog su legla), koncentracija  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  u slini ostaje i dalje povišena i tijekom

djelovanja UGN u životinja kojima nedostaje GC-C (GC-C KO) te je ona jednaka koncentraciji ovih iona u životinja koje posjeduju GC-C (GC-C WT). Ovi rezultati ukazuju na važnost GC-C neovisnog signalnog puta u regulaciji ionskog sastava sline UGN-om te odgovara na pitanje zašto smanjenje volumena stvorene sline (GC-C ovisan signalni put) ne dovodi do očekivanih promjena u ionskom sastavu sline (GC-C neovisan signalni put).

## 5.2. Uroguanilin povećava izražaj mRNA za izmjenjivače $\text{Cl}^-$ i $\text{HCO}_3^-$

Kako smo do sada pokazali da UGN smanjuje pH te povećava koncentraciju  $\text{Cl}^-$  u slini nije neočekivano da UGN mijenja i izražaj transportera za te ione (Slc26a6). Do danas nije pokazano djelovanje UGN-a na funkciju i izražaj Slc26a3 ili a6, ali UGN smanjuje izražaj drugog član iste obitelji, također  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  izmjenjivača, pendrina (Slc26a4) (331). U ovom istraživanju i.p. primjena UGN-a povećava izražaj za mRNA za Slc26a6 u SMB žlijezdama slinovnicama. Zanimljivo je da se porast izražaja primjećuje i kod životinja kojima nedostaje GC-C u odnosu na životinje iz istog legla koje taj receptor za UGN imaju što ukazuje na moguću dvojni regulaciju ovog izmjenjivača, GC-C ovisnu i GC-C neovisnu. Nekoliko je mogućih objašnjenja ove pretpostavke:

1. Protein-kinaza C koju aktivira porast unutarstanične koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  inhibira Slc26a6 u kulturi crijevnih stanica (332), iako nizvodni dijelovi istog signalnog puta povećavaju izražaj Slc26a6 na luminalnoj membrani izvodnih kanalića pankreasa i žlijezda slinovnica (122) kao što je pokazano u ovom istraživanju. Naime, poznato je da GC-C neovisni signalni put GP-a dovodi do aktivacije  $\text{Ca}^{2+}$  signalnog puta te smanjenja koncentracije unutarstaničnog cAMP-a (275, 294).
2. Slc26a6 smješten je na luminalnoj membrani acinusnih stanica SMB žlijezde miševa (333). Kako je GC-C smješten na luminalnoj membrani stanica izvodnih kanalića žlijezda slinovnica (295) učinak UGN-a na acinusne stanice SMB žlijezde slinovnice je neovisan o GC-C-u, dok djelovanje na izvodne kanaliće žlijezda slinovnica ovisno je o aktivaciji GC-C-a što dovodi do smanjenja izražaja ovog izmjenjivača.

Zbog kompleksnosti mehanizma stvaranja sline, utjecaja pojedinih žlijezda slinovnica na konačni „proizvod“, različitog djelovanja hormona na pojedine podvrste žlijezda slinovnica, nismo dobili očekivane korelacije između izražaja ionskih transportera i kanala za vodu u SMB žlijezdi u odnosu na protok (stvaranje) stimulirane sline. Nadalje, povećan izražaj AQP5 mogao bi dovesti do povećanog protoka sline, što bi rezultiralo manjom koncentracijom  $K^+$ . Koncentracija  $K^+$  je u negativnoj korelaciji sa sekrecijom  $Cl^-$  (Slc26a6), a u pozitivnoj s njegovom reapsorpcijom (CFTR). Moguće objašnjenje je da s više  $Cl^-$  u lumenu izvodnog kanalića raste i negativan naboj koji povećava elektrokemijski gradijent za izlaženje  $K^+$  iz stanica.

Poznato je da UGN putem aktivacije GC-C-a te posljedičnim porastom unutarstanične koncentracije cGMP-a kao drugog glasnika, inhibira aktivnost NHE3 smještenog na luminalnoj membrani bubrežnih i crijevnih stanica (334, 335). Čini se da UGN u žlijezdama slinovnicama ima sličan učinak na NHE3, tj. smanjenje aktivnosti zbog smanjenja njegova izražaja (nedostatak GC-C-a kod GC-C KO životinja dovodi do povećanja izražaja ovog izmjenjivača). UGN primijenjen i.p. ne mijenja izražaj NHE3 jer se GC-C nalazi na luminalnoj membrani stanica izvodnih kanalića žlijezda slinovnica (295) i na taj GC-C sistemno primijenjen UGN se ne može vezati niti ga aktivirati.

### **5.3. Sistemni urogvanilin mijenja izražaj ionskih transportera i u ostalim organskim sustavima**

U ovom istraživanju smo UGN primjenjivali sistemno, intraperitonealno, što nam je omogućilo istražiti učinak ovog hormona na izražaj mRNA za kanale za vodu i ionske transportere u organima gdje je uloga GP-a, pa tako i UGN-a, dobro istražena. Kako se o GC-C neovisnom signalnom putu GP-a malo zna, provodeći istraživanja na životinjama koje imaju ili nemaju GC-C iz istog legla, procijenili smo je li dobiveni učinak UGN-a na izražaj specifične mRNA ovisan o GC-C-u ili ne.

Funkcija GP-a, pa tako i UGN-a je najviše istražena u crijevima gdje oni djeluju s luminalne strane enterocita aktiviranjem signalnog puta ovisnog o GC-C-u, što dovodi do pojačane sekrecije  $Cl^-$  i  $HCO_3^-$  i vode te smanjene reapsorpcije  $Na^+$  inhibirajući NHE3 (294). Iako se do sada smatralo da povećanje volumena crijevnog sadržaja djelovanjem GP-a i

njihovih analoga koji se koriste u terapiji kronične idiopatske konstipacije (linaclotide i plecanatide) nastaje isključivo inhibicijom reapsorpcije  $\text{Na}^+$  (NHE3), zatim povećanjem sekrecije  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$  (CFTR, Slc26a3 i a6) te posljedičnim osmotskim zadržavanjem vode u lumenu crijeva, povećanje izražaja AQP1 u životinja kojima nedostaje GC-C može sugerirati i ulogu ovog kanala za vodu u GC-C ovisnom učinku GP-a u crijevima. Samo je izražaj AQP1 bio promijenjen u duodenumu životinja kojima nedostaje GC-C, dok se izražaj ostalih AQP-a u ostalim organskim sustavima kod GC-C KO životinja nije mijenjao.

Nadalje, zamijećena promjena u izražaju Slc26a6 u SMB žlijezdama slinovnicama nakon primjene UGN-a primijećena je i u duodenumu. Taj učinak je neovisan o GC-C-u jer kod životinja kojima taj receptor nedostaje također postoji porast izražaja Slc26a6. Osim toga, iako nije primijećen učinak UGN-a kod životinja koje posjeduju GC-C, izražaj NHE1, NHE3 i Slc26a3 bio je viši u GC-C KO životinja u odnosu na WT životinja iz istog legla. Moguće objašnjenje ovih rezultata je da bi samo luminalni UGN mogao smanjiti izražaj ovih bjelančevina ili bi neki drugi GC-C agonist, kao na primjer GN, mogao djelovati na izražaj ovih transportera putem aktivacije GC-C. Najvažniji rezultat ovog dijela istraživanja bilo bi smanjenje izražaja NHE3, što bi uz inhibiciju već postojećih izmjenjivača na luminalnoj membrani enterocita putem cGMP-a dovelo i do smanjenja njihova izražaja te posljedično sveukupnog smanjenja funkcije, što je poznat učinak GP-a u crijevima.

U bubrežima, GP, djelujući na luminalnu membranu stanica bubrežnih kanalića, dovode do natrijureze, kalijureze i diureze (336). Iako je GC-C neovisni signalni put za GP-a najviše proučavan upravo u bubrežnoj kori laboratorijskih životinja i ljudi (336), intraperitonealna primjena UGN-a nije promijenila izražaj istraženih AQP-a i ionskih transportera, pa tako ni Slc26a6 niti CFTR kako je primijećeno u duodenumu. U GC-C KO životinja primijećen je veći izražaj mRNA za CFTR i Slc26a6, što govori u prilog mogućeg inhibicijskog djelovanja GP-a putem GC-C-a na luminalnoj membrani bubrežnih stanica.

Nakon otkrića da GN proizvode sekrecijske stanice dišnih puteva goveda, zamorca i štakora (311), pretpostavila se uloga GP-a u regulaciji sekrecije dišnih puteva. Uz to oni dovode do relaksacije trahealnih glatkih mišića, što sprječava antigenom-izazvanu bronhokonstrikciju te smanjuju produkciju sluzi u traheji, bronhima i malim dišnim putevima (318). Sistemni UGN, primijenjen intravenski, inhibira bronhokonstrikciju i sekreciju sluzi izazvanu leukotrienom C4 u dišnim putevima zamorca (319). Iako povećanje izražaja AQP3 smještenog na BL strani epitelnih stanica dišnih puteva (337) djelovanjem UGN-a može biti kontradiktorno njegovom

učinku smanjenja sekrecije u dišnim putevima, pokazano je da AQP3 nema veliku ulogu u regulaciji volumena izlučene tekućine. Ulogu AQP3, s time i njegovu regulaciju UGN-om u fiziologiji dišnih puteva treba tek utvrditi (98). Kod GC-C KO životinja nije pronađena statistički značajna razlika u izražaju mRNA za testirane AQP-e ili ionske transportere ponovno ukazujući da je djelovanje sistemskog UGN-a na pluća neovisno o aktivaciji GC-C.

Na kraju saželi bi djelovanje sistemnog UGN-a te nedostatka GC-C-a na izražaj kanala za vodu te ionskih transportera, što se uvelike razlikuje u pojedinim organima. Kako smo i očekivali, djelovanje UGN-a s BL strane je manje izraženo u odnosu na GC-C ovisno djelovanje s luminalne strane polariziranih stanica. U ovom radu prvi put pokazujemo djelovanje UGN-a na članove obitelji Slc26. U duodenumu te SMB žlijezdama slinovnicama UGN dovodi do porasta izražaja Slc26a6, dok u bubrezima i plućima nema utjecaj na ove izmjenjivače. Na izražaj CFTR-a, UGN je djelovao samo u duodenumu smanjujući njegov izražaj, što govori u prilog da je njegova regulacija UGN-om različita ovisno koji organ promatramo. Od svih istraženih AQP-a jedino je u plućima UGN doveo do porasta izražaja mRNA za AQP3. Uz ovo djelovanje UGN-a na promjenu izražaja, ne treba zaboraviti ni djelovanje UGN signalnim putevima na funkciju već izraženih kanala za vodu i ionskih transportera što je izvan okvira ovog istraživanja.

Nedostatak GC-C u GC-C KO životinja pokazao je da je uloga ovog receptora važnija od djelovanje GC-C neovisnog signalnog puta s BL strane stanica. Slc26a3 i/ili a6 su bili povišeni u SMB žlijezdama slinovnicama, duodenumu, kori bubrega, ali ne i u plućima. Upravo uloga GC-C-a u regulaciji funkcije istraženih članova Slc26 obitelji primijećen je u najvećem broju organskih sustava, govoreći u prilog generaliziranom djelovanju GC-C-a na ove izmjenjivače. Uz Slc26a3 i a6 vežemo funkciju CFTR-a, te je istovjetna regulacija izražaja ovih bjelančevina estrogenom prikazana u duodenumu (338). Iako bi se očekivala jednaka regulacija izražaja i izmjenjivača i CFTR-a aktivacijom GC-C-a, CFTR je bio povišen jedino u bubrezima životinja kojima nedostaje GC-C. U GC-C KO životinja primijetili smo i povećan izražaj  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  izmjenjivača, i izoforme 1 i/ili izoforme 3 (duodenum i žlijezde slinovnice) što je u skladu s prikazanom funkcijom UGN-a na razini organa dok nije zamijećena statistički značajna promjena izražaja ovih izmjenjivača u bubrezima i plućima GC-C KO životinja. Kako je i ranije navedeno, izražaj kanala za vodu se razlikuju u laboratorijskih životinja i ljudi. Da bi se potvrdili svi navedeni rezultati ove doktorske disertacije provedene na miševima i na ljudima potrebo je provesti dodatna istraživanja.



1. Urogvanilin nije samo unutarnji čimbenik regulacije žlijezda slinovnica time što mijenjaju volumen, pH te ionski sastav stvorene sline nakon i.p. primjene.
2. Promjene u ionskom sastavu sline pod utjecajem sistemnog urogvanilina, agonista GC-C, ne podudaraju se s promjenama dobivenim sistemskom primjenom antagonista GC-A.
3. Učinak urogvanilina na volumen izlučene sline ovisi o GC-C-u (izvodni kanalići žlijezda slinovnica), dok učinci na ionski sastav nisu ovisni ( $\text{Ca}^{2+}$  signalni put u stanicama acinusa).
4. Promjena koncentracije  $\text{Cl}^-$  u slini djelovanjem urogvanilina praćena je promjenom izražaja mRNA za  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  izmjenjivača, Slc26a6, u submandibularnim žlijezdama slinovnicama neovisno o GC-C-u.
5. Sistemni urogvanilin povećava izražaj Slc26a6, dok smanjuje izražaj CFTR-a u duodenumu putem GC-C neovisnog signalnog puta, što ukazuje na važnu ulogu urogvanilina i  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  izmjenjivača u sekreciji  $\text{HCO}_3^-$ , osobito kod osoba kojima nedostaje CFTR (cistična fibroza).
6. Određeni ionski transporteri su različito regulirani i.p. primijenjenim urogvanilinom u submandibularnoj žlijezdi slinovnici, duodenumu, kori bubrega i plućima.
7. Izražaj Slc26a3 i/ili a6 je veći u žlijezdama slinovnicama, duodenumu i kori bubrega životinja kojima nedostaje GC-C što ukazuje na organski nespecifičnu i široko rasprostranjenu ulogu GC-C-a u fiziološkoj regulaciji ovih ionski izmjenjivača.





1. Jonjic S. Surgical removal of mouse salivary glands. *Curr Protoc Immunol.* 2001;43(1). 1.11.1-4.
2. Edgar WM. Saliva: its secretion, composition and functions. *Br Dent J.* 1992;172(8):305–12.
3. Carranza M, Ferraris ME, Galizzi M. Structural and morphometrical study in glandular parenchyma from alcoholic sialosis. *J Oral Pathol Med.* 2005;34(6):374–9.
4. Young JA, Cook DI. The Major Salivary Glands. In: Greger R, Windhorst U, editors. *Comprehensive Human Physiology.* 1st ed. Berlin, Heidelberg: Springer; 1996. p. 1309-1326.
5. Maruyama CL, Monroe MM, Hunt JP, Buchmann L, Baker OJ. Comparing human and mouse salivary glands: A practice guide for salivary researchers. *Oral Dis.* 2019;25(2):403–15.
6. Yamashina S, Tamaki H, Katsumata O. The serous demilune of rat sublingual gland is an artificial structure produced by conventional fixation. *Arch Histol Cytol.* 1999;62(4):347–54.
7. Schneyer LH, Young JA, Schneyer CA. Salivary secretion of electrolytes. *Physiol Rev.* 1972;52(3):720–77.
8. Amano O, Mizobe K, Bando Y, Sakiyama K. Anatomy and histology of rodent and human major salivary glands—overview of the japan salivary gland society-sponsored workshop. *Acta Histochem Cytochem.* 2012;45(5):241–50.
9. Drummer OH. Toxicology: Methods of Analysis, Antemortem. In *Encyclopedia of Forensic and Legal Medicine.* Jason PJ, Byard RW, Editors. 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press. 2016. p. 602-607.
10. Pedersen AML, Sørensen CE, Proctor GB, Carpenter GH. Salivary functions in mastication, taste and textural perception, swallowing and initial digestion. *Oral Dis.* 2018;24(8):1399–416.
11. Veerman EC, van den Keybus PA, Vissink A, Nieuw Amerongen AV. Human glandular salivas: their separate collection and analysis. *Eur J Oral Sci.* 1996;104(4(Pt1)):346–52.
12. Roussa E. Channels and transporters in salivary glands. *Cell Tissue Res.* 2011;343(2):263–87.
13. Bruce JIE, Shuttleworth TJ, Giovannucci DR, Yule DI. Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in parotid acinar cells. *J Biol Chem.* 2002;277(2):1340–8.
14. Dai YS, Ambudkar IS, Horn VJ, Yeh CK, Kousvelari EE, Wall SJ, *et al.* Evidence that M3 muscarinic receptors in rat parotid gland couple to two second messenger systems. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1991;261(6):C1063–73.

15. Xu X, Diaz J, Zhao H, Muallem S. Characterization, localization and axial distribution of Ca<sup>2+</sup> signalling receptors in the rat submandibular salivary gland ducts. *J Physiol.* 1996;491(3):647–62.
16. Watson EL, Abel PW, DiJulio D, Zeng W, Makoid M, Jacobson KL, *et al.* Identification of muscarinic receptor subtypes in mouse parotid gland. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1996;271(3):C905–13.
17. Gautam D, Heard TS, Cui Y, Miller G, Bloodworth L, Wess J. Cholinergic stimulation of salivary secretion studied with M1 and M3 muscarinic receptor single- and double-knockout mice. *Mol Pharmacol.* 2004;66(2):260–7.
18. Proctor GB. The physiology of salivary secretion. *Periodontol.* 2016;70(1):11–25.
19. Baker OJ, Camden JM, Ratchford AM, Seye CI, Erb L, Weisman GA. Differential coupling of the P2Y1 receptor to Gα14 and Gαq/11 proteins during the development of the rat salivary gland. *Arch Oral Biol.* 2006;51(5):359–70.
20. Castle D, Castle A. Intracellular transport and secretion of salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998;9(1):4–22.
21. Dehaye JP, Valdez IH, Turner RJ. Beta-adrenergic stimulation and cAMP mobilize Ca<sup>2+</sup> from an IP3-insensitive pool in rat submandibular granular ducts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1993;265(5):C1356–62.
22. Aps JKM, Martens LC. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int.* 2005;150(2–3):119–31.
23. Proctor GB, Carpenter GH. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Auton Neurosci.* 2007;133(1):3–18.
24. Schultz T, Soinila J, Tolonen R, Häppölä O, Uusitalo H, Salo A. The sympathetic and parasympathetic nature of neuropeptide Y-immunoreactive nerve fibres in the major salivary glands of the rat. *Histochem J.* 1994;26(7):563–70.
25. Ekström J, Ekman R, Luts A, Sundler F, Tobin G. Neuropeptide Y in salivary glands of the rat: origin, release and secretory effects. *Regul Pept.* 1996;61(2):125–3.
26. Hauser-Kronberger C, Albegger K, Saria A, Hacker GW. Neuropeptides in human salivary (submandibular and parotid) glands. *Acta Otolaryngol.* 1992;112(2):343–8.
27. Igarashi H, Fujimori N, Ito T, Nakamura T, Oono T, Nakamura K, *et al.* Vasoactive intestinal peptide (VIP) and VIP receptors-elucidation of structure and function for therapeutic applications. *Int J Clin Med.* 2011;02(04):500–8.
28. Ekström J, Månsson B, Tobin G. Vasoactive intestinal peptide evoked secretion of fluid and protein from rat salivary glands and the development of supersensitivity. *Acta Physiol Scand.* 1983;119(2):169–75.

29. Dawidson I, Angmar-Månsson B, Blom M, Theodorsson E, Lundeberg T. The influence of sensory stimulation (acupuncture) on the release of neuropeptides in the saliva of healthy subjects. *Life Sci.* 1998;63(8):659–74.
30. Erspamer V. The tachykinin peptide family. *Trends Neurosci.* 1981;4:267–9.
31. Bobyock E, Barbieri EJ, Chernick WS. Effects of substance P and substance P antagonists on rat salivary secretion. *J Dent Res.* 1986;65(12):1427–31.
32. Yu J-H, Burns SM, Schneyer CA. Salivary secretion induced by substance P. *Exp Biol Med (Maywood).* 1983;173(4):467–70.
33. Rosenfeld MG, Mermod J-J, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, *et al.* Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature.* 1983;304(5922):129–35.
34. Mulderry PK, Ghatki MA, Spokks RA, Jonhs PM, Pierson AM, Hamid QA, *et al.* Differential expression of  $\alpha$ -CGRP and  $\beta$ -CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat. *Neuroscience.* 1988;25(1):195–205.
35. Russell FA, King R, Smillie S-J, Kodji X, Brain SD. Calcitonin gene-related peptide: Physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2014;94(4):1099–142.
36. Ekström J, Ekman R, Håkanson R, Sjögren S, Sundler F. Calcitonin gene-related peptide in rat salivary glands: neuronal localization, depletion upon nerve stimulation, and effects on salivation in relation to substance P. *Neuroscience.* 1988;26(3):933-49.
37. Calvert PA, Heck PM, Edwards AV. Autonomic control of submandibular protein secretion in the anaesthetized calf. *Exp Physiol.* 1998;83(4):545–56.
38. Kimura M, Nakashima N, Kimura I. Salivary peptide P-C modulates both insulin and glucagon release from isolated perfused rat pancreas. *Jpn J Pharmacol.* 1990;52(4):579–85.
39. Kimura M, Nakashima N, Kimura I. The essential amino acid domains in salivary peptide P-C that potentiate glucose-induced insulin release and inhibit arginine-induced glucagon release from perfused rat pancreas. *Jpn J Pharmacol.* 1995;67(1):79–82.
40. Shubnikova EA, Volkova EF, Printseva OY. Submandibular glands as organs of synthesis and accumulation of insulin-like protein. *Acta Histochem.* 1984;74(2):157–71.
41. Murakami K, Taniguchi H, Baba S. Presence of insulin-like immunoreactivity and its biosynthesis in rat and human parotid gland. *Diabetologia.* 1982;22(5):358-61.
42. Lawrence AM, Tan S, Hojvat S, Kirsteins L. Salivary gland hyperglycemic factor: An extrapancreatic source of glucagon-like material. *Science.* 1977;195(4273):70–2.
43. Kerr M, Lee A, Wang P-L, Purushotham KR, Chegini N, Yamamoto H, *et al.* Detection of insulin and insulin-like growth factors I and II in saliva and potential synthesis in the salivary glands of mice. *Biochem Pharmacol.* 1995;49(10):1521–31.

44. Taouis M, Deville de Periere D, Hillaire-Buys D, Derouet M, Gross R, Simon J, *et al.* Biological activity of immunoreactive insulin-like activity extracted from rat submandibular gland. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1995;269(2): E277–82.
45. Messenger B, Clifford MN, Morgan LM. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide and insulin-like immunoreactivity in saliva following sham-fed and swallowed meals. *J Endocrinol.* 2003;177(3):407–12.
46. Vallejo G, Mead PM, Gaynor DH, Devlin JT, Robbins DC. Characterization of immunoreactive insulin in human saliva: evidence against production *in situ*. *Diabetologia.* 1984;27(4):437–40.
47. Ben-Aryeh H, Cohen M, Kanter Y, Szargel R, Laufer D. Salivary composition in diabetic patients. *J Diabet Complications.* 1988; 2(2):96-9.
48. Aras HÇ, Ekström J. Cholecystokinin- and gastrin-induced protein and amylase secretion from the parotid gland of the anaesthetized rat. *Regul Pept.* 2006;134(2–3):89–96.
49. Burnstock G. Purinergic receptors. *J Theor Biol.* 1976;62(2):491–503.
50. Gallacher DV. Are there purinergic receptors on parotid acinar cells? *Nature.* 1982;296(5852):83–6.
51. Zeng W, Lee MG, Muallem S. Membrane-specific regulation of Cl<sup>-</sup> channels by purinergic receptors in rat submandibular gland acinar and duct cells. *J Biol Chem.* 1997;272(52):32956–65.
52. Turner JT, Landon LA, Gibbons SJ, Talamo BR. Salivary gland P2 nucleotide receptors. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999;10(2):210–24.
53. Nakamoto T, Brown DA, Catalán MA, Gonzalez-Begne M, Romanenko VG, Melvin JE. Purinergic P2X7 receptors mediate ATP-induced saliva secretion by the mouse submandibular gland. *J Biol Chem.* 2009;284(8):4815–22.
54. Novak I, Jans IM, Wohlfahrt L. Effect of P2X7receptor knockout on exocrine secretion of pancreas, salivary glands and lacrimal glands: P2X7receptor in exocrine glands. *J Physiol.* 2010;588(18):3615–27.
55. Kulaksiz H, Rausch U, Vaccaro R, Renda TG, Cetin Y. Guanylin and uroguanylin in the parotid and submandibular glands: potential intrinsic regulators of electrolyte secretion in salivary glands. *Histochem Cell Biol.* 2001;115(6):527–33.
56. Melvin JE, Yule D, Shuttleworth T, Begenisich T. Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. *Annu Rev Physiol.* 2005;67(1):445–69.
57. Patterson K, Catalán MA, Melvin JE, Yule DI, Crampin EJ, Sneyd J. A quantitative analysis of electrolyte exchange in the salivary duct. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012;303(10): G1153–63.
58. Mathison R. Submandibular Salivary Gland Endocrine Secretions and Systemic Pathophysiological Responses. *Open Inflamm. J.* 2009;2:9–21

59. Mandel ID. The functions of saliva. *J Dent Res.* 1987;66(2\_suppl):623–7.
60. Amerongen AVN, Veerman ECI. Saliva the defender of the oral cavity. *Oral Dis.* 2002;8(1):12–22.
61. Engelen L, van den Keybus PAM, de Wijk RA, Veerman ECI, Amerongen AVN, Bosman F, *et al.* The effect of saliva composition on texture perception of semi-solids. *Arch Oral Biol.* 2007;52(6):518–25.
62. Nagler RM, Hershkovich O, Lischinsky S, Diamond E, Reznick AZ. Saliva analysis in the clinical setting: Revisiting an underused diagnostic tool. *J Investig Med.* 2002;50(3):214–25.
63. Hall JE, Guyton AC. Secretory Functions of the Alimentary Tract. In: Guyton & Hall Textbook of medical physiology. 13<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier; 2016. p.819-32.
64. Dawes C. Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. *J Physiol.* 1972;220(3):529-45.
65. Baliga S, Muglikar S, Kale R. Salivary pH: A diagnostic biomarker. *J Indian Soc Periodontol.* 2013;17(4):461-5.
66. Glantz P-O. Interfacial phenomena in the oral cavity. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 1997;123–124:657–70.
67. Schwarz WH. The rheology of saliva. *J Dent Res.* 1987;66(1\_suppl):660–6.
68. Davis SS. The rheological properties of saliva. *Rheol Acta.* 1971;10(1):28–35.
69. Waterman HA, Blom C, Holterman HJ, 's-Gravenmade EJ, Mellema J. Rheological properties of human saliva. *Arch Oral Biol.* 1988;33(8):589–96.
70. Prinz JF, de Wijk RA, Huntjens L. Load dependency of the coefficient of friction of oral mucosa. *Food Hydrocoll.* 2007;21(3):402–8.
71. Vijay A, Inui T, Dodds M, Proctor G, Carpenter G. Factors that influence the extensional rheological property of saliva. *PLoS One.* 2015;10(8):e0135792.
72. Haward SJ, Odell JA, Berry M, Hall T. Extensional rheology of human saliva. *Rheol Acta.* 2011;50(11–12):869–79.
73. Naganagowda GA, Gururaja TL, Levine MJ. Delineation of conformational preferences in human salivary statherin by <sup>1</sup>H,<sup>31</sup>P NMR and CD studies: Sequential assignment and structure-function correlations. *J Biomol Struct Dyn.* 1998;16(1):91–107.
74. Kirkness JP, Christenson HK, Wheatley JR, Amis TC. Application of the ‘pull-off’ force method for measurement of surface tension of upper airway mucosal lining liquid. *Physiol Meas.* 2005;26(5):677–88.
75. Mosca AC, Chen J. Food-saliva interactions: Mechanisms and implications. *Trends Food Sci Technol.* 2017;66:125–34.

76. Lacombe C, Essabbah H. Comparative haemorheology of pathological blood. *Scand J Clin Lab Invest.* 1981;41(sup156):249–50.
77. Linderkamp O, Betke K. Rheological properties of blood and their possible role in the circulation and development of intracranial hemorrhage in preterm infants. *Klin Padiatr.* 1985;197(04):319–21.
78. Baskurt OK, Meiselman HJ. Comparative hemorheology. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2013;53(1–2):61–70.
79. Backus C, Carrington SP, Fisher LR, Odell JA, Rodrigues DA. The roles of extensional and shear flows of synovial fluid and replacement systems in joint protection. In: Kennedy JF, Phillips GO, Williams PA, C HV, editors. *Hyaluronan volume 1: Chemical, biochemical and biological aspects.* 1<sup>st</sup> Ed. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd; 2002. p. 209–18.
80. Schob S, Weiß A, Dieckow J, Richter C, Pirlich M, Voigt P, *et al.* Correlations of ventricular enlargement with rheologically active surfactant proteins in cerebrospinal fluid. *Front Aging Neurosci.* 2017;Jan 4;8:324
81. Rubin BK. Mucus structure and properties in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev.* 2007;8(1):4–7.
82. Perez-Vilar J, Boucher RC. Reevaluating gel-forming mucins' roles in cystic fibrosis lung disease. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(10):1564–77.
83. Pawlaczyk-Kamieńska T, Borysewicz-Lewicka M, Batura-Gabryel H. Salivary biomarkers and oral microbial load in relation to the dental status of adults with cystic fibrosis. *Microorganisms.* 2019;7(12):692.
84. Chaudhury NMA, Proctor GB, Karlsson NG, Carpenter GH, Flowers SA. Reduced mucin-7 (Muc7) sialylation and altered saliva rheology in Sjögren's syndrome associated oral dryness. *Mol Cell Proteomics.* 2016;15(3):1048–59.
85. Thaysen JH, Thorn NA, Schwartz IL. Excretion of sodium, potassium, chloride and carbon dioxide in human parotid saliva. *Am J Physiol.* 1954;178(1):155–9.
86. Bhattarai KR, Junjappa R, Handigund M, Kim H-R, Chae H-J. The imprint of salivary secretion in autoimmune disorders and related pathological conditions. *Autoimmun Rev.* 2018;17(4):376–90.
87. D'Agostino C, Elkashty OA, Chivasso C, Perret J, Tran SD, Delporte C. Insight into salivary gland aquaporins. *Cells.* 2020;9(6):1547.
88. Petersen OH. Calcium-activated potassium channels and fluid secretion by exocrine glands. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1986;251(1): G1–13.
89. Catalán MA, Nakamoto T, Melvin JE. The salivary gland fluid secretion mechanism. *J Med Invest.* 2009;56 Suppl:192–6.

90. Turner RJ, Sugiya H. Understanding salivary fluid and protein secretion. *Oral Dis.* 2002;8(1):3–11.
91. Evans RL, Park K, Turner RJ, Watson GE, Nguyen HV, Dennett MR, *et al.* Severe impairment of salivation in Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup>-cotransporter (NKCC1)-deficient mice. *J Biol Chem.* 2000;275:26720–6.
92. Zhao H, Xu X, Diaz J, Muallem S. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and H<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport in submandibular salivary ducts. Membrane localization of transporters. *J Biol Chem.* 1995;270(33):19599–605.
93. Gonzalez-Begne M, Nakamoto T, Nguyen HV, Stewart AK, Alper SL, Melvin JE. Enhanced formation of a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport metabolon in exocrine cells of Nhe1<sup>-/-</sup> mice. *J Biol Chem.* 2007;282:35125–32.
94. Park K, Evans RL, Watson GE, Nehrke K, Richardson L, Bell SM, Schultheis PJ, Hand AR, Shull GE, Melvin JE. Defective fluid secretion and NaCl absorption in the parotid glands of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-deficient mice. *J Biol Chem.* 2001;276(29):27042–50.
95. Schroeder BC, Cheng T, Jan YN, Ly J. Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell.* 2008;134:1019–29.
96. Yang YD, Cho H, Koo JY, Tak MH, Cho Y, Shim W-S, *et al.* TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature.* 2008;455(7217):1210–5.
97. Huang F, Rock JR, Harfe BD, Cheng T, Huang X, Jan YN, *et al.* Studies on expression and function of the TMEM16A calcium-activated chloride channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(50):21413–8.
98. Verkman AS. Mammalian aquaporins: diverse physiological roles and potential clinical significance. *Expert Rev Mol Med.* 2008;10:e13.
99. Endeward V, Musa-Aziz R, Cooper GJ, Chen L-M, Pelletier MF, Virkki LV, *et al.* Evidence that aquaporin 1 is a major pathway for CO<sub>2</sub> transport across the human erythrocyte membrane. *FASEB J.* 2006;20(12):1974–81.
100. Hosoi K, Yao C, Hasegawa T, Yoshimura H, Akamatsu T. Dynamics of salivary gland AQP5 under normal and pathologic conditions. *Int J Mol Sci.* 2020;21(4):1182
101. Stamboni MB, Gomes ÁN de M, Souza MM de, Oliveira KK, Arruda CFJ, de Paula F, *et al.* Aquaporin 1, 3, and 5 patterns in salivary gland mucoepidermoid carcinoma: Expression in surgical specimens and an in vitro pilot study. *Int J Mol Sci.* 2020;21(4):1287.
102. Melvin JE, Moran A, Turner RJ. The role of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in the response of rat parotid acinar cells to muscarinic stimulation. *J Biol Chem.* 1988;263(36):19564–9.
103. Delporte C. Aquaporins and Gland Secretion. In: Baoxue Y, editor. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer Netherlands; 2017;969:63–79.



104. de Paula F, Teshima THN, Hsieh R, Souza MM, Coutinho-Camillo CM, Nico MMS, *et al.* The expression of water channel proteins during human salivary gland development: a topographic study of aquaporins 1, 3 and 5. *J Mol Histol.* 2017;48(5–6):329–36.
105. Aure MH, Ruus A-K, Galtung HK. Aquaporins in the adult mouse submandibular and sublingual salivary glands. *J Mol Histol.* 2014;45(1):69–80.
106. Sapmaz E, Uysal M, Tumer MK, Sapmaz HI, Somuk BT, Arici A, *et al.* Investigation of age-related changes in the expression of aquaporin-1 and aquaporin-5 in the salivary glands of mice. *Acta Otolaryngol.* 2016;136(9):937–43.
107. King LS, Yasui M. Aquaporins and disease: lessons from mice to humans. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13(8):355–60.
108. Nehrke K, Quinn CC, Begenisich T. Molecular identification of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in parotid acinar cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;284(2):C535–46.
109. Romanenko VG, Nakamoto T, Srivastava A, Begenisich T, Melvin JE. Regulation of membrane potential and fluid secretion by Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in mouse submandibular glands: K<sup>+</sup> channels in mouse submandibular acinar cells. *J Physiol.* 2007;581(2):801–17.
110. Ma T, Song Y, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS. Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels. *J Biol Chem.* 1999;274(29):20071–4.
111. Ishikawa Y, Cho G, Yuan Z, Inoue N, Nakae Y. Aquaporin-5 water channel in lipid rafts of rat parotid glands. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2006;1758(8):1053–60.
112. Lee MG, Ohana E, Park HW, Yang D, Muallem S. Molecular mechanism of pancreatic and salivary gland fluid and HCO<sub>3</sub> secretion. *Physiol Rev.* 2012;92(1):39-74.
113. Huang C-L, Yang S-S, Lin S-H. Mechanism of regulation of renal ion transport by WNK kinases. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2008;17(5):519–25.
114. Alessi DR, Zhang J, Khanna A, Hochdörfer T, Shang Y, Kahle KT. The WNK-SPAK/OSR1 pathway: Master regulator of cation-chloride cotransporters. *Sci Signal.* 2014;7(334):re3.
115. Richardson C, Alessi DR. The regulation of salt transport and blood pressure by the WNK-SPAK/OSR1 signalling pathway. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 20):3293-304.
116. Yang D, Li Q, So I, Huang C-L, Ando H, Mizutani A, *et al.* IRBIT governs epithelial secretion in mice by antagonizing the WNK/SPAK kinase pathway. *J Clin Invest.* 2011;121(3):956–65.
117. Ando H, Mizutani A, Kiefer H, Tsuzurugi D, Michikawa T, Mikoshiba K. IRBIT suppresses IP<sub>3</sub> receptor activity by competing with IP<sub>3</sub> for the common binding site on the IP<sub>3</sub> receptor. *Mol Cell.* 2006;22(6):795–806.

118. Yang D, Shcheynikov N, Zeng W, Ohana E, So I, Ando H, Mizutani A, Mikoshiba K, Muallem S. IRBIT coordinates epithelial fluid and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion by stimulating the transporters pNBC1 and CFTR in the murine pancreatic duct. *J Clin Invest.* 2009;119(1):193-202.
119. He P, Zhang H, Yun CC. IRBIT, inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) receptor-binding protein released with IP<sub>3</sub>, binds Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE3 and activates NHE3 activity in response to calcium. *J Biol Chem.* 2008;283(48):33544-53.
120. Shirakabe K, Priori G, Yamada H, Ando H, Horita S, Fujita T, *et al.* IRBIT, an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-binding protein, specifically binds to and activates pancreas-type Na<sup>+</sup> /HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter 1 (pNBC1). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(25):9542-7.
121. Yang D, Shcheynikov N, Muallem S. IRBIT: It is everywhere. *Neurochem Res.* 2011;36(7):1166-74.
122. Park S, Shcheynikov N, Hong JH, Zheng C, Suh SH, Kawaii K, *et al.* Irbit mediates synergy between Ca<sup>2+</sup> and cAMP signaling pathways during epithelial transport in mice. *Gastroenterology.* 2013;145(1):232-41.
123. Boron WF, Boulpaep EL. Intracellular pH regulation in the renal proximal tubule of the salamander. Basolateral HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport. *J Gen Physiol.* 1983;81(1):53-94.
124. Romero MF, Hediger MA, Boulpaep EL, Boron WF. Expression cloning and characterization of a renal electrogenic Na<sup>+</sup> /HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter. *Nature.* 1997;387(6631):409-13.
125. Abuladze N, Lee I, Newman D, Hwang J, Boorer K, Pushkin A, *et al.* Molecular cloning, chromosomal localization, tissue distribution, and functional expression of the human pancreatic sodium bicarbonate cotransporter. *J Biol Chem.* 1998;273(28):17689-95.
126. Ishiguro H, Naruse S, Steward MC, Kitagawa M, Ko SBH, Hayakawa T, *et al.* Fluid secretion in interlobular ducts isolated from guinea-pig pancreas. *J Physiol.* 1998;511(2):407-22.
127. Satoh H, Moriyama N, Hara C, Yamada H, Horita S, Kunimi M, *et al.* Localization of Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter (NBC-1) variants in rat and human pancreas. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;284(3):C729-37.
128. Roussa E, Nastainczyk W, Thévenod F. Differential expression of electrogenic NBC1 (SLC4A4) variants in rat kidney and pancreas. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;314(2):382-9.
129. Bevenssee MO, Schmitt BM, Choi I, Romero MF, Boron WF. An electrogenic Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter (NBC) with a novel COOH-terminus, cloned from rat brain. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;278(6):C1200-11.

130. Majumdar D, Maunsbach AB, Shacka JJ, Williams JB, Berger UV, Schultz KP, *et al.* Localization of electrogenic Na/bicarbonate cotransporter NBCe1 variants in rat brain. *Neuroscience*. 2008;155(3):818–32.
131. Damkier HH, Nielsen S, Praetorius J. Molecular expression of SLC4-derived Na<sup>+</sup>-dependent anion transporters in selected human tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293(5):R2136–46.
132. Steward MC, Poronnik P, Cook DI. Bicarbonate transport in sheep parotid secretory cells. *J Physiol*. 1996;494(3):819–30.
133. Luo X, Choi JY, Ko SBH, Pushkin A, Kurtz I, Ahn W, *et al.* HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> salvage mechanisms in the submandibular gland acinar and duct cells. *J Biol Chem*. 2001;276(13):9808–1.
134. Pushkin A, Abuladze N, Lee I, Newman D, Hwang J, Kurtz I. Cloning, tissue distribution, genomic organization, and functional characterization of NBC3, a new member of the sodium bicarbonate cotransporter family. *J Biol Chem*. 1999;274(23):16569–75.
135. Namkoong E, Shin Y-H, Bae J-S, Choi S, Kim M, Kim N, *et al.* Role of sodium bicarbonate cotransporters in intracellular pH regulation and their regulatory mechanisms in human submandibular glands. *PLoS One*. 2015;10(9):e013836.
136. Yang N-Y, Mukaibo T, Kurtz I, Melvin JE. The apical Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter Slc4a7 (NBCn1) does not contribute to bicarbonate transport by mouse salivary gland ducts. *J Cell Physiol*. 2019;234(9):16376–88.
137. Boron WF, Chen L, Parker MD. Modular structure of sodium-coupled bicarbonate transporters. *J Exp Biol*. 2009;212(Pt 11):1697-706.
138. Dorwart MR, Shcheynikov N, Yang D, Muallem S. The solute carrier 26 family of proteins in epithelial ion transport. *Physiology (Bethesda)*. 2008;23(2):104–14.
139. Alper SL, Sharma AK. The SLC26 gene family of anion transporters and channels. *Mol Aspects Med*. 2013;34(2–3):494–515.
140. Markovich D, Aronson PS. Specificity and regulation of renal sulfate transporters. *Annu Rev Physiol*. 2007;69(1):361–75.
141. Ko SBH. A molecular mechanism for aberrant CFTR-dependent HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport in cystic fibrosis. *EMBO J*. 2002;21(21):5662–72.
142. Xie Q, Welch R, Mercado A, Romero MF, Mount DB. Molecular characterization of the murine Slc26a6 anion exchanger: functional comparison with Slc26a1. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;283(4):F826-38.
143. Ohana E, Yang D, Shcheynikov N, Muallem S. Diverse transport modes by the solute carrier 26 family of anion transporters. *J Physiol*. 2009;587(Pt 10):2179-85.
144. Ko SBH, Zeng W, Dorwart MR, Luo X, Kim KH, Millen L, *et al.* Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporters. *Nat Cell Biol*. 2004;6(4):343–50.

145. Shcheynikov N, Wang Y, Park M, Ko SBH, Dorwart M, Naruse S, *et al.* Coupling modes and stoichiometry of Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange by *slc26a3* and *slc26a6*. *J Gen Physiol.* 2006;127(5):511–24.
146. Lohi H, Kujala M, Kerkelä E, Saarialho-Kere U, Kestilä M, Kere J. Mapping of five new putative anion transporter genes in human and characterization of SLC26A6, A candidate gene for pancreatic anion exchanger. *Genomics.* 2000;70(1):102–12.
147. Knauf F, Yang C-L, Thomson RB, Mentone SA, Giebisch G, Aronson PS. Identification of a chloride-formate exchanger expressed on the brush border membrane of renal proximal tubule cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(16):9425–30.
148. Gray MA, Greenwell JR, Argent BE. Secretin-regulated chloride channel on the apical plasma membrane of pancreatic duct cells. *J Membr Biol.* 1988;105(2):131–42.
149. Gray MA, Harris A, Coleman L, Greenwell JR, Argent BE. Two types of chloride channel on duct cells cultured from human fetal pancreas. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1989;257(2):C240–51.
150. Gray MA, Pollard CE, Harris A, Coleman L, Greenwell JR, Argent BE. Anion selectivity and block of the small-conductance chloride channel on pancreatic duct cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1990;259(5):C752–61.
151. Saint-Criq V, Gray MA. Role of CFTR in epithelial physiology. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(1):93–115.
152. Soyfoo M, Chivasso C, Perret J, Delporte C. Involvement of aquaporins in the pathogenesis, diagnosis and treatment of Sjögren's syndrome. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11):3392.
153. Sisto M, Lorusso L, Ingravallo G, Nico B, Ribatti D, Ruggieri S, *et al.* Abnormal distribution of AQP4 in minor salivary glands of primary Sjögren's syndrome patients. *Autoimmunity.* 2017;50(4):202–10.
154. Hanukoglu I, Hanukoglu A. Epithelial sodium channel (ENaC) family: Phylogeny, structure–function, tissue distribution, and associated inherited diseases. *Gene.* 2016;579(2):95–132.
155. Catalán MA, Nakamoto T, Gonzalez-Begne M, Camden JM, Wall SM, Clarke LL, *et al.* Cfr and ENaC ion channels mediate NaCl absorption in the mouse submandibular gland: Functional interplay between Cfr and ENaC. *J Physiol.* 2010;588(Pt 4):713–24.
156. He X, Tse C-M, Donowitz M, Alper SL, Gabriel SE, Baum BJ. Polarized distribution of key membrane transport proteins in the rat submandibular gland. *Pflugers Arch.* 1996;433(3):260.
157. Roussa E. H<sup>+</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporters in human salivary ducts. An immunohistochemical study. *Histochem J.* 2001;33(6):337–44.
158. Ahn W, Kim KH, Lee JA, Kim JY, Choi JY, Moe OW, *et al.* Regulatory interaction between the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> salvage

- mechanisms in model systems and the mouse pancreatic duct. *J Biol Chem.* 2001;276(20):17236–43.
159. Steward MC, Ishiguro H, Case RM. Mechanisms of bicarbonate secretion in the pancreatic duct. *Annu Rev Physiol.* 2005;67(1):377–409.
160. Argent BE, Gray MA, Steward MC, Case RM. Cell physiology of pancreatic ducts. In: Johnson LR, Kaunitz JD, Said HM, Ghishan FK, Merchant JL, Wood JD. *Physiology of the Gastrointestinal Tract.* Elsevier; 5<sup>th</sup> ed. Vol. 2. London: Elsevier BV. 2012. p. 1399-1423.
161. Novak I, Haanes KA, Wang J. Acid-base transport in pancreas—new challenges. *Front Physiol.* 2013;4. 380
162. Ishiguro H, Steward MC, Lindsay AR, Case RM. Accumulation of intracellular HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> by Na<sup>(+)</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransport in interlobular ducts from guinea-pig pancreas. *J Physiol.* 1996;495(1):169–78.
163. Stewart AK, Yamamoto A, Nakakuki M, Kondo T, Alper SL, Ishiguro H. Functional coupling of apical Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange with CFTR in stimulated HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion by guinea pig interlobular pancreatic duct. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009;296(6):G1307-17.
164. Gray MA. Bicarbonate secretion: it takes two to tango. *Nat Cell Biol.* 2004;6(4):292–4.
165. Wang Y, Soyombo AA, Shcheynikov N, Zeng W, Dorwart M, Marino CR, *et al.* Slc26a6 regulates CFTR activity in vivo to determine pancreatic duct HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion: relevance to cystic fibrosis. *EMBO J.* 2006;25(21):5049–57.
166. Sohma Y, Gray MA, Imai Y, Argent BE. A mathematical model of the pancreatic ductal epithelium. *J Membr Biol.* 1996;154(1):53-67.
167. Sohma Y, Gray MA, Imai Y, Argent BE. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport in a mathematical model of the pancreatic ductal epithelium. *J Membr Biol.* 2000;176(1):77–100.
168. Ishiguro H, Steward MC, Sohma Y, Kubota T, Kitagawa M, Kondo T, *et al.* Membrane potential and bicarbonate secretion in isolated interlobular ducts from guinea-pig pancreas. *J Gen Physiol.* 2002;120(5):617–28.
169. Park M, Ko SB, Choi JY, Muallem G, Thomas PJ, Pushkin A, *et al.* The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator interacts with and regulates the activity of the HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> – salvage transporter human Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransport isoform 3. *J Biol Chem.* 2002;277:50503–9.
170. Shcheynikov N, Ko SBH, Zeng W, Choi JY, Dorwart MR, Thomas PJ, *et al.* Regulatory interaction between CFTR and the SLC26 transporters. *Novartis Found Symp.* 2006;273:177–86.
171. Domschke S, Domschke W, Rösch W, Konturek SJ, Sprügel W, Mitznegg P, *et al.* Inhibition by somatostatin of secretin-stimulated pancreatic secretion in man: a study with pure pancreatic juice. *Scand J Gastroenterol.* 1977;12(1):59–63.

172. Cook DI, Dinudom A, Komwatana P, Kumar S, Young JA. Patch-clamp studies on epithelial sodium channels in salivary duct cells. *Cell Biochem Biophys*. 2002;36(2–3):105–14.
173. Lennane RJ, Peart WS, Carey RM, Shaw J. A comparison of natriuresis after oral and intravenous sodium loading in sodium-depleted rabbits: Evidence for a gastrointestinal or portal monitor of sodium intake. *Clin Sci Mol Med*. 1975;49(5):433–6.
174. Carey RM. Evidence for a splanchnic sodium input monitor regulating renal sodium excretion in man. Lack of dependence upon aldosterone. *Circ Res*. 1978;43(1):19–23.
175. Simpson FO. Sodium intake, body sodium, and sodium excretion. *Lancet*. 1988;332(8601):25–9.
176. Currie MG, Fok KF, Kato J, Moore RJ, Hamra FK, Duffin KL, *et al*. Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(3):947–51.
177. Hamra FK, Forte LR, Eber SL, Pidhorodeckyj NV, Krause WJ, Freeman RH, *et al*. Uroguanylin: structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(22):10464–8.
178. Hughes JM, Murad F, Chang B, Guerrant RL. Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Nature*. 1978;271(5647):755–6.
179. Forte LR, Krause WJ, Freeman RH. Receptors and cGMP signalling mechanism for *E. coli* enterotoxin in opossum kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 1988;255(5):F1040–6.
180. Schulz S, Singh S, Bellet RA, Singh G, Tubb DJ, Chin H, *et al*. The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. *Cell*. 1989;58(6):1155–62.
181. Forte LR, Eber SL, Fan X, London RM, Wang Y, Rowland LM, *et al*. Lymphoguanylin: cloning and characterization of a unique member of the guanylin peptide family. *Endocrinology*. 1999;140(4):1800–6.
182. Yuge S, Inoue K, Hyodo S, Takei Y. A novel guanylin family (guanylin, uroguanylin, and renoguanylin) in eels: possible osmoregulatory hormones in intestine and kidney: Possible osmoregulatory hormones in intestine and kidney. *J Biol Chem*. 2003;278(25):22726–33.
183. Sack RB. Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol*. 1975;29(1):333–54.
184. Nandi A, Bhandari R, Visweswariah SS. Epitope conservation and immunohistochemical localization of the guanylin/stable toxin peptide receptor, guanylyl cyclase C. *J Cell Biochem*. 1997;66(4):500–11.
185. Basu N, Arshad N, Visweswariah SS. Receptor guanylyl cyclase C (GC-C): regulation and signal transduction. *Mol Cell Biochem*. 2010;334(1–2):67–80.

186. Field M, Graf LH Jr, Laird WJ, Smith PL. Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: in vitro effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75(6):2800–4.
187. Marx UC, Klodt J, Meyer M, Gerlach H, Rösch P, Forssmann W-G, *et al*. One peptide, two topologies: structure and interconversion dynamics of human uroguanylin isomers. *J Pept Res*. 2009;52(3):229–40.
188. Miyazato M, Nakazato M, Matsukura S, Kangawa K, Matsuo H. Uroguanylin gene expression in the alimentary tract and extra-gastrointestinal tissues. *FEBS Lett*. 1996;398(2–3):170–4.
189. Kita T, Smith CE, Fok KF, Duffin KL, Moore WM, Karabatsos PJ, *et al*. Characterization of human uroguanylin: a member of the guanylin peptide family. *Am J Physiol* . 1994;266(2 Pt 2): F342-8.
190. de Sauvage FJ, Keshav S, Kuang WJ, Gillett N, Henzel W, Goeddel DV. Precursor structure, expression, and tissue distribution of human guanylin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(19):9089–93.
191. Schulz S. Targeted gene disruption in the development of mouse models to elucidate the role of receptor guanylyl cyclase signaling pathways in physiological function. *Methods*. 1999;19(4):551–8.
192. Greenberg RN, Hill M, Crytzer J, Krause WJ, Eber SL, Hamra FK, *et al*. Comparison of effects of uroguanylin, guanylin, and *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STa in mouse intestine and kidney: evidence that uroguanylin is an intestinal natriuretic hormone. *J Investig Med*. 1997;45(5):276–82.
193. Forte LR, London RM, Freeman RH, Krause WJ. Guanylin peptides: renal actions mediated by cyclic GMP. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000;278(2):F180-91.
194. Perkins A, Goy MF, Li Z. Uroguanylin is expressed by enterochromaffin cells in the rat gastrointestinal tract. *Gastroenterology*. 1997;113(3):1007–14.
195. Hamra FK, Krause WJ, Eber SL, Freeman RH, Smith CE, Currie MG, *et al*. Opossum colonic mucosa contains uroguanylin and guanylin peptides. *Am J Physiol*. 1996;270(4 Pt 1): G708-16.
196. Miyazato M, Nakazato M, Matsukura S, Kangawa K, Matsuo H. Genomic structure and chromosomal localization of human uroguanylin. *Genomics*. 1997;43(3):359–65.
197. Nakazato M, Yamaguchi H, Kinoshita H, Kangawa K, Matsuo H, Chino N, *et al*. Identification of biologically active and inactive human uroguanylins in plasma and urine and their increases in renal insufficiency. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;220(3):586–93.
198. Moss NG, Riguera DA, Solinga RM, Kessler MM, Zimmer DP, Arendshorst WJ, *et al*. The natriuretic peptide uroguanylin elicits physiologic actions through 2 distinct topoisomers. *Hypertension*. 2009;53(5):867–76.

199. Klodt J, Kuhn M, Marx UC, Martin S, Rösch P, Forssmann W-G, *et al.* Synthesis, biological activity and isomerism of guanylate cyclase C-activating peptides guanylin and uroguanylin. *J Pept Res.* 1997;50(3):222-30.
200. Li Z, Goy MF. Peptide-regulated guanylate cyclase pathways in rat colon: in situ localization of GCA, GCC, and guanylin mRNA. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1993;265(2): G394–402.
201. Cetin Y, Kuhn M, Kulaksiz H, Adermann K, Bargsten G, Grube D, *et al.* Enterochromaffin cells of the digestive system: cellular source of guanylin, a guanylate cyclase-activating peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(8):2935–9.
202. Cohen MB, Witte DP, Hawkins JA, Currie MG. Immunohistochemical localization of guanylin in the rat small intestine and colon. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;209(3):803–8.
203. Kimura H, Murad F. Evidence for two different forms of guanylate cyclase in rat heart. *J Biol Chem.* 1974;249(21):6910–6.
204. Koesling D. Studying the structure and regulation of soluble guanylyl cyclase. *Methods.* 1999;19(4):485–93.
205. Sindić A, Dobrivojević M, Hirsch JR. Natriuretic peptides in brain physiology. *Transl Neurosci.* 2011;2(3):246-51.
206. Lowe DG, Chang MS, Hellmiss R, Chen E, Singh S, Garbers DL, *et al.* Human atrial natriuretic peptide receptor defines a new paradigm for second messenger signal transduction. *EMBO J.* 1989;8(5):1377–84.
207. Wilcox JN, Augustine A, Goeddel DV, Lowe DG. Differential regional expression of three natriuretic peptide receptor genes within primate tissues. *Mol Cell Biol.* 1991;11(7):3454–62.
208. Nagase M, Katafuchi T, Hirose S, Fujita T. Tissue distribution and localization of natriuretic peptide receptor subtypes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 1997;15(11):1235–43.
209. Goy MF, Oliver PM, Purdy KE, Knowles JW, Fox JE, Mohler PJ, *et al.* Evidence for a novel natriuretic peptide receptor that prefers brain natriuretic peptide over atrial natriuretic peptide. *Biochem J.* 2001;358(2):379.
210. Chinkers M, Garbers DL, Chang M-S, Lowe DG, Chin H, Goeddel DV, *et al.* A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. *Nature.* 1989;338(6210):78–83.
211. Miyagi M, Misono KS. Disulfide bond structure of the atrial natriuretic peptide receptor extracellular domain: conserved disulfide bonds among guanylate cyclase-coupled receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1478(1):30–8.



212. Miyagi M, Zhang X, Misono KS. Glycosylation sites in the atrial natriuretic peptide receptor: oligosaccharide structures are not required for hormone binding. *Eur J Biochem.* 2000;267(18):5758–68.
213. Pandey KN. Biology of natriuretic peptides and their receptors. *Peptides.* 2005;26(6):901–32.
214. Lowe DG, Klisak I, Sparkes RS, Mohandas T, Goeddel DV. Chromosomal distribution of three members of the human natriuretic peptide receptor/guanylyl cyclase gene family. *Genomics.* 1990;8(2):304–12.
215. Rehemudula D, Nakayama T, Soma M, Takahashi Y, Uwabo J, Sato M, *et al.* Structure of the type B human natriuretic peptide receptor gene and association of a novel microsatellite polymorphism with essential hypertension. *Circ Res.* 1999;84(5):605–10.
216. Potter LR. Phosphorylation-dependent regulation of the guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptor B: dephosphorylation is a mechanism of desensitization. *Biochemistry.* 1998;37(8):2422–9.
217. Potter LR, Hunter T. Activation of protein kinase C stimulates the dephosphorylation of natriuretic peptide receptor-B at a single serine residue: a possible mechanism of heterologous desensitization. *J Biol Chem.* 2000;275(40):31099–106.
218. Potter LR, Garbers DL. Protein kinase C-dependent desensitization of the atrial natriuretic peptide receptor is mediated by dephosphorylation. *J Biol Chem.* 1994;269(20):14636–42.
219. Chrisman TD, Schulz S, Potter LR, Garbers DL. Seminal plasma factors that cause large elevations in cellular cyclic GMP are C-type natriuretic peptides. *J Biol Chem.* 1993;268(5):3698–703.
220. Langub MC Jr, Dolgas CM, Watson RE Jr, Herman JP. The C-type natriuretic peptide receptor is the predominant natriuretic peptide receptor mRNA expressed in rat hypothalamus. *J Neuroendocrinol.* 1995;7(4):305–9.
221. Herman JP, Dolgas CM, Rucker D, Langub MC Jr. Localization of natriuretic peptide-activated guanylate cyclase mRNAs in the rat brain. *J Comp Neurol.* 1996;369(2):165–87.
222. Bryan PM, Smirnov D, Smolenski A, Feil S, Feil R, Hofmann F. A sensitive method for determining the phosphorylation status of natriuretic peptide receptors: cGK-I $\alpha$  does not regulate NPR-A. *Biochemistry.* 2006;45(4):1295–303.
223. Dickey DM, Flora DR, Bryan PM, Xu X, Chen Y, Potter LR. Differential regulation of membrane guanylyl cyclases in congestive heart failure: natriuretic peptide receptor (NPR)-B, Not NPR-A, is the predominant natriuretic peptide receptor in the failing heart. *Endocrinology.* 2007;148(7):3518–22.
224. Tamura N, Doolittle LK, Hammer RE, Shelton JM, Richardson JA, Garbers DL. Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(49):17300–5.

225. Zhang F-X, Liu X-J, Gong L-Q, Yao J-R, Li K-C, Li Z-Y, *et al.* Inhibition of inflammatory pain by activating B-type natriuretic peptide signal pathway in nociceptive sensory neurons. *J Neurosci.* 2010;30(32):10927–38.
226. Yasoda A, Ogawa Y, Suda M, Tamura N, Mori K, Sakuma Y, *et al.* Natriuretic peptide regulation of endochondral ossification. *J Biol Chem.* 1998;273(19):11695–700.
227. de Jonge HR. Properties of guanylate cyclase and levels of cyclic GMP in rat small intestinal villous and crypt cells. *FEBS Lett.* 1975;55(1):143–52.
228. de Sauvage FJ, Camerato TR, Goeddel DV. Primary structure and functional expression of the human receptor for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *J Biol Chem.* 1991;266(27):17912-8
229. Vaandrager AB, van der Wiel E, de Jonge HR. Heat-stable enterotoxin activation of immunopurified guanylyl cyclase C. Modulation by adenine nucleotides. *J Biol Chem.* 1993;268(26):19598–603.
230. Vaandrager AB, Bot AG, De Jonge HR. Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase II mediates heat-stable enterotoxin-provoked chloride secretion in rat intestine. *Gastroenterology.* 1997;112(2):437-43.
231. Vaandrager AB, Bot AG, Ruth P, Pfeifer A, Hofmann F, De Jonge HR. Differential role of cyclic GMP-dependent protein kinase II in ion transport in murine small intestine and colon. *Gastroenterology.* 2000;118(1):108–14.
232. Weikel CS, Spann CL, Chambers CP, Crane JK, Linden J, Hewlett EL. Phorbol esters enhance the cyclic GMP response of T84 cells to the heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* (STa). *Infect Immun.* 1990;58(5):1402–7.
233. Crane MR, Hugues M, O'Hanley PD, Waldman SA. Identification of two affinity states of low affinity receptors for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin: correlation of occupation of lower affinity state with guanylate cyclase activation. *Mol Pharmacol.* 1992;41(6):1073–80.
234. Crane JK, Shanks KL. Phosphorylation and activation of the intestinal guanylyl cyclase receptor for *Escherichia coli* heat-stable toxin by protein kinase C. *Mol Cell Biochem.* 1996;165(2):111-20.
235. Fan X, Wang Y, London RM, Eber SL, Krause WJ, Freeman RH, *et al.* Signaling pathways for guanylin and uroguanylin in the digestive, renal, central nervous, reproductive, and lymphoid systems. *Endocrinology.* 1997;138(11):4636–48.
236. Range SP, Holland ED, Basten GP, Knox AJ. Regulation of guanosine 3':5'-cyclic monophosphate in ovine tracheal epithelial cells: Cyclic GMP in tracheal epithelial cells. *Br J Pharmacol.* 1997;120(7):1249–54.
237. Schulz S, Chrisman TD, Garbers DL. Cloning and expression of guanylin its existence in various mammalian tissues. *J Biol Chem.* 1992;267(23):16019–21.

238. Kulaksiz H, Cetin Y. Uroguanylin and guanylate cyclase C in the human pancreas: expression and mutuality of ligand/receptor localization as indicators of intercellular paracrine signaling pathways. *J Endocrinol.* 2001;170(1):267–75.
239. Kulaksiz H, Schmid A, Hönscheid M, Eissele R, Klempnauer J, Cetin Y. Guanylin in the human pancreas: a novel luminocrine regulatory pathway of electrolyte secretion via cGMP and CFTR in the ductal system. *Histochem Cell Biol.* 2001;115(2):131–45.
240. Schwabe K, Cetin Y. Guanylin and functional coupling proteins in the hepatobiliary system of rat and guinea pig. *Histochem Cell Biol.* 2012;137(5):589–97.
241. Jaleel M, London RM, Eber SL, Forte LR, Visweswariah SS. Expression of the receptor guanylyl cyclase C and its ligands in reproductive tissues of the rat: a potential role for a novel signaling pathway in the epididymis. *Biol Reprod.* 2002;67(6):1975–80.
242. Clark VL, Bernlohr RW. Guanyl cyclase of bacilluslicheniformis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1972;46(4):1570–5.
243. Ashman DF, Lipton R, Melicow MM, Price TD. Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. *Biochem Biophys Res Commun.* 1963;11:330–4.
244. Hardman JG, Sutherland EW. Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J Biol Chem.* 1969;244(23):6363–70.
245. Schultz G, Böhme E, Munske K. Guanyl cyclase. Determination of enzyme activity. *Life Sci.* 1969;8(24):1323–32.
246. White AA, Aurbach GD. Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology.* 1969;191(3):686–97.
247. Potter LR. Guanylyl cyclase structure, function and regulation. *Cell Signal.* 2011;23(12):1921–6.
248. Wall ME, Francis SH, Corbin JD, Grimes K, Richie-Jannetta R, Kotera J, *et al.* Mechanisms associated with cGMP binding and activation of cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(5):2380–5.
249. Ruth P. Cyclic GMP-dependent protein Kinases Understanding *in vivo* functions by gene targeting. *Pharmacol Ther.* 1999;82(2–3):355–72.
250. Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci.* 1997;22(8):307–12.
251. Kuhn M. Molecular physiology of membrane guanylyl cyclase receptors. *Physiol Rev.* 2016;96(2):751–804.
252. Orstavik S, Solberg R, Taskén K, Nordahl M, Altherr MR, Hansson V, *et al.* Molecular cloning, cDNA structure, and chromosomal localization of the human type II cGMP-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;220(3):759–65.

253. Jarchau T, Häusler C, Markert T, Pöhler D, Vanderkerckhove J, De Jonge HR, *et al.* Cloning, expression, and in situ localization of rat intestinal cGMP-dependent protein kinase II. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(20):9426–30.
254. Maurice DH, Palmer D, Tilley DG, Dunkerley HA, Netherton SJ, Raymond DR, *et al.* Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. *Mol Pharmacol.* 2003;64(3):533–46.
255. Maurice DH, Ke H, Ahmad F, Wang Y, Chung J, Manganiello VC. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(4):290–314.
256. Suga S, Nakao K, Kishimoto I, Hosoda K, Mukoyama M, Arai H, *et al.* Phenotype-related alteration in expression of natriuretic peptide receptors in aortic smooth muscle cells. *Circ Res.* 1992;71(1):34-9.
257. Fuller F, Porter JG, Arfsten AE, Miller J, Schilling JW, Scarborough RM, *et al.* Atrial natriuretic peptide clearance receptor. Complete sequence and functional expression of cDNA clones. *J Biol Chem.* 1988;263(19):9395–401.
258. Maack T. Receptors of atrial natriuretic factor. *Annu Rev Physiol.* 1992;54(1):11–27.
259. Nussenzveig DR, Lewicki JA, Maack T. Cellular mechanisms of the clearance function of type C receptors of atrial natriuretic factor. *J Biol Chem.* 1990;265(34):20952–8.
260. Bennett BD, Bennett GL, Vitangcol RV, Jewett JR, Burnier J, Henzel W, Lowe DG. Extracellular domain-IgG fusion proteins for three human natriuretic peptide receptors. Hormone pharmacology and application to solid phase screening of synthetic peptide antisera. *J Biol Chem.* 1991;266(34):23060-7.
261. Porter JG, Arfsten A, Fuller F, Miller JA, Gregory LC, Lewicki JA. Isolation and functional expression of the human atrial natriuretic peptide clearance receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;171(2):796–803.
262. Mizuno T, Iwashina M, Itakura M, Hagiwara H, Hirose S. A variant form of the type C atrial natriuretic peptide receptor generated by alternative RNA splicing. *J Biol Chem.* 1993;268(7):5162–7.
263. Qian X, Prabhakar S, Nandi A, Visweswariah SS, Goy MF. Expression of GC-C, a receptor-guanylate cyclase, and its endogenous ligands uroguanylin and guanylin along the rostrocaudal axis of the intestine. *Endocrinology.* 2000;141(9):3210–24.
264. Ganguly U, Chaudhury AG, Basu A, Sen PC. STa-induced translocation of protein kinase C from cytosol to membrane in rat enterocytes. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;204(1):65–9.
265. Gupta DD, Saha S, Chakrabarti MK. Involvement of protein kinase C in the mechanism of action of Escherichia coli heat-stable enterotoxin (STa) in a human colonic carcinoma cell line, COLO-205. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;206(1):9–16.
266. London RM, Eber SL, Visweswariah SS, Krause WJ, Forte LR. Structure and activity of OK-GC: a kidney receptor guanylate cyclase activated by guanylin peptides. *Am J Physiol.* 1999;276(6):F882-91.

267. Sindić A, Başoglu C, Cerçi A, Hirsch JR, Potthast R, Kuhn M. Guanylin, uroguanylin, and heat-stable euterotoxin activate guanylate cyclase C and/or a pertussis toxin-sensitive G protein in human proximal tubule cells. *J Biol Chem.* 2002;277(20):17758–64.
268. Carrithers SL, Ott CE, Hill MJ, Johnson BR, Cai W, Chang JJ, *et al.* Guanylin and uroguanylin induce natriuresis in mice lacking guanylyl cyclase-C receptor. *Kidney Int.* 2004;65(1):40–53.
269. Sindić A, Hirsch JR, Velic A, Piechota H, Schlatter E. Guanylin and uroguanylin regulate electrolyte transport in isolated human cortical collecting ducts. *Kidney Int.* 2005;67(4):1420–7.
270. Sindić A, Schlatter E. Mechanisms of actions of guanylin peptides in the kidney. *Pflugers Arch.* 2005;450(5):283–91.
271. Sindić A, Velic A, Başoglu C, Hirsch JR, Edemir B, Kuhn M, *et al.* Uroguanylin and guanylin regulate transport of mouse cortical collecting duct independent of guanylate cyclase C. *Kidney Int.* 2005;68(3):1008–17.
272. Lorenz JN, Nieman M, Sabo J, Sanford LP, Hawkins JA, Elitsur N, *et al.* Uroguanylin knockout mice have increased blood pressure and impaired natriuretic response to enteral NaCl load. *J Clin Invest.* 2003;112(8):1244–54.
273. Dugandzic A, Ratko M, Habek N. Anxiety-like behavior in female mice changes by feeding, possible effect of guanylate cyclase C. *Eur J Neurosci.* 2020;52(1):2781–90.
274. Habek N, Dobrivojević Radmilović M, Kordić M, Ilić K, Grgić S, Farkaš V, *et al.* Activation of brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis is GC-C dependent. *Pflugers Arch.* 2020;472(3):405–17.
275. Habek N, Ratko M, Dugandžić A. Uroguanylin increases Ca<sup>2+</sup> concentration in astrocytes via guanylate cyclase C-independent signaling pathway. *Croat Med J.* 2021;62(3):250–63.
276. Hill O, Kuhn M, Zucht HD, Cetin Y, Kulaksiz H, Adermann K, *et al.* Analysis of the human guanylin gene and the processing and cellular localization of the peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(6):2046–50.
277. Li Z, Perkins AG, Peters MF, Campa MJ, Goy MF. Purification, cDNA sequence, and tissue distribution of rat uroguanylin. *Regul Pept.* 1997;68(1):45–56.
278. London RM, Krause WJ, Fan X, Eber SL, Forte LR. Signal transduction pathways via guanylin and uroguanylin in stomach and intestine. *Am J Physiol.* 1997;273(1Pt 1):G93-105.
279. Wiegand RC, Kato J, Currie MG. Rat guanylin cDNA: Characterization of the precursor of an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;185(3):812–7.
280. Fan X, Hamra FK, London RM, Eber SL, Krause WJ, Freeman RH, *et al.* Structure and activity of uroguanylin and guanylin from the intestine and urine of rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1997;273(5): E957–64.

281. Krause WJ, Freeman RH, Forte LR. Autoradiographic demonstration of specific binding sites for *E. coli* enterotoxin in various epithelia of the North American opossum. *Cell Tissue Res.* 1990;260(2):387–94.
282. Whitaker TL, Witte DP, Scott MC, Cohen MB. Uroguanylin and guanylin: Distinct but overlapping patterns of messenger RNA expression in mouse intestine. *Gastroenterology.* 1997;113(3):1000–6.
283. Guba M, Kuhn M, Forssmann WG, Classen M, Gregor M, Seidler U. Guanylin strongly stimulates rat duodenal HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion: Proposed mechanism and comparison with other secretagogues. *Gastroenterology.* 1996;111(6):1558–68.
284. Joo NS, London RM, Kim HD, Forte LR, Clarke LL. Regulation of intestinal Cl<sup>-</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion by uroguanylin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1998;274(4):G633–44.
285. Dousa TP. Cyclic-3', 5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney Int.* 1999;55(1):29–62.
286. Liu X, Li T, Riederer B, Lenzen H, Ludolph L, Yeruva S, Tuo B, Soleimani M, Seidler U. Loss of Slc26a9 anion transporter alters intestinal electrolyte and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport and reduces survival in CFTR-deficient mice. *Pflugers Arch.* 2015;467(6):1261–75.
287. Chao AC, de Sauvage FJ, Dong YJ, Wagner JA, Goeddel DV, Gardner P. Activation of intestinal CFTR Cl<sup>-</sup> channel by heat-stable enterotoxin and guanylin via cAMP-dependent protein kinase. *EMBO J.* 1994;13(5):1065–72.
288. Cuthbert AW, Hickman ME, MacVinish LJ, Evans MJ, Colledge WH, Ratcliff R, *et al.* Chloride secretion in response to guanylin in colonic epithelia from normal and transgenic cystic fibrosis mice. *Br J Pharmacol.* 1994;112(1):31–6.
289. Crawford I, Maloney PC, Zeitlin PL, Guggino WB, Hyde SC, Turley H, *et al.* Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(20):9262–6.
290. French PJ, Bijman J, Edixhoven M, Vaandrager AB, Scholte BJ, Lohmann SM, *et al.* Isotype-specific activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-chloride channels by cGMP-dependent protein kinase II. *J Biol Chem.* 1995;270(44):26626–31.
291. Strinić I, Habek N, Dugandžić A. Guanylin Peptides Signaling: Insights into Guanylate Cyclase C Dependent and Independent Signaling Pathways. *J Cell Signal.* 2021;2(4):261–8.
292. Liu L, Zhang W, Zhao W, Guo S, Wang Y, *et al.* Linaclotide for treating patients with irritable bowel syndrome with predominant constipation: a multicentre study of real-world data in China. *Therap Adv Gastroenterol.* 2022;15:17562848221092596.

293. Hamra FK, Eber SL, Chin DT, Currie MG, Forte LR. Regulation of intestinal uroguanylin/guanylin receptor-mediated responses by mucosal acidity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(6):2705–10.
294. Rao SP, Sellers Z, Crombie DL, Hogan DL, Mann EA, Childs D, *et al*. A role for guanylate cyclase C in acid-stimulated duodenal mucosal bicarbonate secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;286(1): G95–101.
295. Kulaksiz H, Rehberg E, Stremmel W, Cetin Y. Guanylin and functional coupling proteins in the human salivary glands and gland tumors: expression, cellular localization, and target membrane domains. *Am J Pathol*. 2002;161(2):655–64.
296. Aps JK, Delanghe J, Martens LC. Salivary electrolyte concentrations are associated with cystic fibrosis transmembrane regulator genotypes. *Clin Chem Lab Med*. 2002;40(4):345-50.
297. Gonçalves AC, Marson FA, Mendonça RM, Ribeiro JD, Ribeiro AF, Paschoal IA, Levy CE. Saliva as a potential tool for cystic fibrosis diagnosis. *Diagn Pathol*. 2013;8:46.
298. Gonçalves AC, Marson FAL, Mendonça RMH, Bertuzzo CS, Paschoal IA, Ribeiro JD, *et al*. Chloride and sodium ion concentrations in saliva and sweat as a method to diagnose cystic fibrosis. *J Pediatr (Rio J)*. 2019;95(4):443-450.
299. da Silva Modesto KB, de Godói Simões JB, de Souza AF, Damaceno N, Duarte DA, Leite MF, *et al*. Salivary flow rate and biochemical composition analysis in stimulated whole saliva of children with cystic fibrosis. *Arch Oral Biol*. 2015;60(11):1650–4.
300. Peker S, Mete S, Gokdemir Y, Karadag B, Kargul B. Related factors of dental caries and molar incisor hypomineralisation in a group of children with cystic fibrosis. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2014 Aug;15(4):275-80.
301. Chi DL. Dental caries prevalence in children and adolescents with cystic fibrosis: a qualitative systematic review and recommendations for future research. *Int J Paediatr Dent*. 2013;23(5):376–86.
302. Aps JK, Van Maele GO, Claeys G, Martens LC. Mutans streptococci, lactobacilli and caries experience in cystic fibrosis homozygotes, heterozygotes and healthy controls. *Caries Res*. 2001;35(6):407-11.
303. John M, Wiedenmann B, Kruhøffer M, Adermann K, Ankorina-Stark I, Schlatter E, *et al*. Guanylin stimulates regulated secretion from human neuroendocrine pancreatic cells. *Gastroenterology*. 1998;114(4):791–7.
304. Shailubhai K, Yu HH, Karunanandaa K, Wang JY, Eber SL, Wang Y, *et al*. Uroguanylin treatment suppresses polyp formation in the Apc (Min/+) mouse and induces apoptosis in human colon adenocarcinoma cells via cyclic GMP. *Cancer Res*. 2000;60(18):5151–7.
305. Kloeters O, Friess H, Giese N, Buechler MW, Cetin Y, Kulaksiz H. Uroguanylin inhibits proliferation of pancreatic cancer cells. *Scand J Gastroenterol*. 2008;43(4):447–55.

306. Fonteles MC, Greenberg RN, Monteiro HSA, Currie MG, Forte LR. Natriuretic and kaliuretic activities of guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 1998;275(2): F191–7.
307. Qian X, Moss NG, Fellner RC, Taylor-Blake B, Goy MF. The rat kidney contains high levels of prouroguanylin (the uroguanylin precursor) but does not express GC-C (the enteric uroguanylin receptor). *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011;300(2): F561–73.
308. Moss NG, Riguera DA, Fellner RC, Cazzolla C, Goy MF. Natriuretic and antikaliuretic effects of uroguanylin and prouroguanylin in the rat. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;299(6): F1433–42.
309. Kinoshita H, Fujimoto S, Nakazato M, Yokota N, Date Y, Yamaguchi H, *et al.* Urine and plasma levels of uroguanylin and its molecular forms in renal diseases. *Kidney Int.* 1997;52(4):1028–34.
310. Potthast R, Ehler E, Scheving LA, Sindic A, Schlatter E, Kuhn M. High salt intake increases uroguanylin expression in mouse kidney. *Endocrinology.* 2001;142(7):3087–97.
311. Cetin Y, Kulaksiz H, Redecker P, Bargsten G, Adermann K, Grube D, *et al.* Bronchiolar nonciliated secretory (Clara) cells: source of guanylin in the mammalian lung. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(13):5925–9.
312. Zhang ZH, Jow F, Numann R, Hinson J. The airway-epithelium: a novel site of action by guanylin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;244(1):50–6.
313. Awatade NT, Wong SL, Hewson CK, Fawcett LK, Kicic A, Jaffe A, *et al.* Human primary epithelial cell models: Promising tools in the era of cystic fibrosis personalized medicine. *Front Pharmacol.* 2018;9:1429.
314. Veit G, Avramescu RG, Chiang AN, Houck SA, Cai Z, Peters KW, *et al.* From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Mol Biol Cell.* 2016;27(3):424–33.
315. Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell.* 1993;73(7):1251–4.
316. Hull J. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction and its treatment. *J R Soc Med.* 2012;105(2\_suppl):2–8.
317. Marson FAL, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. Classification of CFTR mutation classes. *Lancet Respir Med.* 2016;4(8): e37–8.
318. Ohbayashi H, Yamaki K, Suzuki R, Takagi K. Effects of uroguanylin and guanylin against antigen-induced bronchoconstriction and airway microvascular leakage in sensitized guinea-pigs. *Life Sci.* 1998;62(20):1833–44.
319. Ohbayashi H, Yamaki KI. Both inhalant and intravenous uroguanylin inhibit leukotriene C4-induced airway changes. *Peptides.* 2000;21(10):1467–72.



320. Holmdahl R, Malissen B. The need for littermate controls: HIGHLIGHTS. *Eur J Immunol.* 2012;42(1):45–7.
321. Bagavant H, Trzeciak M, Papinska J, Biswas I, Dunkleberger ML, Sosnowska A, *et al.* A method for the measurement of salivary gland function in mice. *J Vis Exp.* 2018;(131) 57203
322. Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature.* 1988;332(6159):78-81.
323. Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;168(2):863–70.
324. Bianciotti LG, Elverdin JC, Vatta MS, Colatrella C, Fernández BE. Atrial natriuretic factor enhances induced salivary secretion in the rat. *Regul Pept.* 1994;49(3):195–202.
325. Bianciotti LG, Elverdín JC, Vatta MS, Fernández BE. Atrial natriuretic factor modifies the composition of induced-salivary secretion in the rat. *RegulPept.* 1996;65(2):139–43.
326. Su S, Rugis J, Wahl A, Doak S, Li Y, Suresh V, *et al.* A mathematical model of salivary gland duct cells. *Bull Math Biol.* 2022;84(8):84.
327. Argent BE, Case RM. Cellular mechanism and control of bicarbonate secretion. In: Johnson LR, editor. *Physiology of the gastrointestinal tract.* 5th ed. Elsevier; 2012.p.1473-97.
328. Ishibashi K, Hara S, Kondo S. Aquaporin water channels in mammals. *Clin Exp Nephrol.* 2009;13(2):107–17.
329. Matsuzaki T, Susa T, Shimizu K, Sawai N, Suzuki T, Aoki T, *et al.* Function of the membrane water channel aquaporin-5 in the salivary gland. *Acta Histochem Cytochem.* 2012;45(5):251–9.
330. Akamatsu T, Parvin MN, Murdiastuti K, Kosugi-Tanaka C, Yao C, Miki O, *et al.* Expression and localization of aquaporins, members of the water channel family, during development of the rat submandibular gland. *Pflugers Arch.* 2003;446(6):641–51.
331. Rozenfeld J, Tal O, Kladnitsky O, Adler L, Efrati E, Carrithers SL, *et al.* The pendrin anion exchanger gene is transcriptionally regulated by uroguanylin: a novel enterorenal link. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;302(5): F614-24.
332. Amin R, Sharma S, Ratakonda S, Hassan HA. Extracellular nucleotides inhibit oxalate transport by human intestinal Caco-2-BBe cells through PKC- $\delta$  activation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2013;305(1):C78-89.
333. Mukaibo T, Munemasa T, George AT, Tran DT, Gao X, Herche JL, *et al.* The apical anion exchanger Slc26a6 promotes oxalate secretion by murine submandibular gland acinar cells. *J Biol Chem.* 2018;293(17):6259–68.

334. Fawcus K, Gorton VJ, Lucas ML, McEwan GT. Stimulation of three distinct guanylate cyclases induces mucosal surface alkalinisation in rat small intestine in vitro. *Comp Biochem Physiol A Physiol.* 1997;118(2):291–5.
335. Lessa LMA, Carraro-Lacroix LR, Crajoinas RO, Bezerra CN, Dariolli R, Girardi ACC, *et al.* Mechanisms underlying the inhibitory effects of uroguanylin on NHE3 transport activity in renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;303(10): F1399-408.
336. Sindic A. Current understanding of guanylin peptides actions. *ISRN Nephrol.* 2013; 2013:813648.
337. Matsuzaki T, Hata H, Ozawa H, Takata K. Immunohistochemical localization of the aquaporins AQP1, AQP3, AQP4, and AQP5 in the mouse respiratory system. *Acta Histochem Cytochem.* 2009;42(6):159–69.
338. Jin H, Wen G, Deng S, Wan S, Xu J, Liu X, *et al.* Oestrogen upregulates the expression levels and functional activities of duodenal mucosal CFTR and SLC26A6. *Exp Physiol.* 2016;101(11):1371-82.



Domagoj Jakovac, rođen je 06. studenog 1982. u Zagrebu. Osnovnu školu i opću gimnaziju završio je u Zagrebu. Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu završio je 2009. godine i stekao zvanje doktora dentalne medicine (dr.med.dent). Od 2009. do 2011. godine radio je kao asistent na Katedri za fiziologiju Stomatološkog fakulteta u Zagrebu. Iste godine odlazi na pripravnički staž u Dom zdravlja Centar, a državni ispit polaže iduće godine. U razdoblju od 2012. do 2019. godine radio je na Kineziološkom fakultetu u Zagrebu kao asistent i vanjski suradnik na predmetima fiziologija sporta i vježbanja, te fiziologija u ekstremnim uvjetima. Od studenoga 2019. do danas zaposlen je kao asistent na Katedri za fiziologiju Stomatološkog fakulteta u Zagrebu. Kao polaznik poslijediplomskog studija, obnašao je dužnost predstavnika redova poslijediplomskih studija, Studenskoga zbora. Sudjelovao je na domaćim i stranim kongresima, te je autor i koautor pet kongresnih priopćenja.

#### Radovi:

1. **Jakovac D**, Ratko M, Marolt Banek I, Lapić I, Dugandžić A. The Role of Uroguanylin in Regulation of Ion Transport in Salivary Glands. *Acta stomatologica Croatica: International journal of oral sciences and dental medicine*. 2023 57(3):273–83. Q2, 49<sup>th</sup> Scopus. Rad iz doktorata
2. Vuletić L, Lapić I, Špalj S, Marolt Banek I, **Jakovac D**, Šipkar J, *et al.* Comparison of salivary sodium and potassium concentrations measured by handheld ion-selective electrode meters and an automated biochemical analyser. *Electroanalysis*. 2023 35(5) e202200399. Q2, 69<sup>th</sup> Scopus

#### Kongresna priopćenja:

1. **Domagoj Jakovac**, Martina Ratko, Iva Marolt Banek, Ivana Lapić, Aleksandra Dugandžić. Physiological role of systemic uroguanylin in mouse salivary glands, 16<sup>th</sup> Annual Meeting of Croatian Physiological Society with International participation Osijek, Osijek, Hrvatska, 28.-30. rujna 2023.

2. **Domagoj Jakovac**, Iva Marolt Banek, Martina Ratko, Ivana Lapić, Aleksandra Dugandžić. The Uroguanylin effect on stimulated saliva volume flow, the pH and concentration of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> in mice, 3<sup>rd</sup> Regional Congress of Physiological Societies and 5<sup>th</sup> Congress of Croatian Physiological Society, Plitvička jezera, Hrvatska, 22.-24. rujna 2022.
3. **Domagoj Jakovac**, Iva Marolt Banek, Jasmina Šipkar, Ivana Lapić, Dunja Rogić, Stjepan Špalj, Lea Vuletić. Influence of centrifugation on salivary sodium and potassium concentrations measured using handheld LAQUAtwin meters, 7<sup>th</sup> International Congress of the School of Dental Medicine University of Zagreb, Rovinj, Hrvatska, 21.-22. svibnja 2021.
4. Jasmina Šipkar, **Domagoj Jakovac**, Iva Marolt Banek, Ivana Lapić, Dunja Rogić, Stjepan Špalj, Lea Vuletić. Comparison of salivary sodium and potassium concentrations measured by portable meters and an automated biochemical analyser, 8<sup>th</sup> European virtual congress of pharmacology Ephar 2021, Prague, Češka republika, 6.-8. prosinca 2021.
5. Jagoda Rosa, Aleksandra Sindić, **Domagoj Jakovac**, Josip Rosa. Metabolic changes in hepatocytes from rats on raw soybean diet, 1<sup>st</sup> Congress of Fatty Liver and Metabolic Syndrome, Budapest, Mađarska, 12.-14. studenog 2009.