

**Az epitél sejtek szerepe nyelőcső és hasnyálmirigy betegségekben**

**Dr. Becskeházi Eszter**

**Doktori értekezés összefoglaló**

**Szeged**

**2023**

Szegedi Tudományegyetem  
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar  
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

## **Az epitél sejtek szerepe nyelőcső és hasnyálmirigy betegségekben**

Doktori értekezés összefoglaló

Dr. Becskeházi Eszter

Témavezető: Dr. Venglovecz Viktória Ph.D., D.Sc.



Szeged

2023

## Publikációk

### A disszertáció alapját képező publikációk

- I. **Becskeházi, E.**, Korsós, M. M., Gál, E., Tizslavicz, L., Hoyk, Z., Deli, M. A., Köhler, Z. M., Keller-Pintér, A., Horváth, A., Csekő, K., Helyes, Z., Hegyi, P., & Venglovecz, V. (2021). Inhibition of NHE-1 Increases Smoke-Induced Proliferative Activity of Barrett's Esophageal Cell Line. *International journal of molecular sciences*, 22(19), 10581. <https://doi.org/10.3390/ijms221910581>

IF: 5.924 (Q2)

- II. Gál, E., Veréb, Z., Kemény, L., Rakk, D., Szekeres, A., **Becskeházi, E.**, Tizslavicz, L., Takács, T., Czakó, L., Hegyi, P., & Venglovecz, V. (2020). Bile accelerates carcinogenic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma cells through the overexpression of MUC4. *Scientific reports*, 10(1), 22088. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79181-6>

IF: 4.38 (D1)

### A disszertáció témájához kapcsolódó publikációk

- III. Korsós, M. M., Bellák, T., **Becskeházi, E.**, Gál, E., Veréb, Z., Hegyi, P., & Venglovecz, V. (2021). Mouse organoid culture is a suitable model to study esophageal ion transport mechanisms. *American journal of physiology. Cell physiology*, 321(5), C798–C811. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00295.2021>

IF: 4.249 (Q1)

- IV. **Becskeházi, E.\***, Korsós, M. M.\*, Erőss, B., Hegyi, P., & Venglovecz, V. (2020). OEsophageal Ion Transport Mechanisms and Significance Under Pathological Conditions. *Frontiers in physiology*, 11, 855. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00855>

\*: contributed equally

IF: 4.566 (Q2)

Az I-IV. számú publikáció összesített impakt faktora: 19.119

### Egyéb publikációk

- V. Venglovecz, V., Pallagi, P., Kemény, L. V., Balázs, A., Balla, Z., **Becskeházi, E.**, Gál, E., Tóth, E., Zvara, Á., Puskás, L. G., Borka, K., Sandler, M., Lerch, M. M., Mayerle, J., Kühn, J. P., Rakonczay, Z., Jr, & Hegyi, P. (2018). The Importance of Aquaporin 1 in Pancreatitis and Its Relation to the CFTR Cl<sup>-</sup> Channel. *Frontiers in physiology*, 9, 854. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00854>

IF: 3.201 (Q2)

Összes publikáció impakt faktora: 22.32

# **1. Bevezetés**

## **1.1 Epitél sejtek a gasztrointesztinális traktusban**

Az epitélium egymással szorosan kapcsolódó sejtekből áll, melyeken keresztül az emberi szervezet számára nélkülözhetetlen folyamatok játszódhatnak le. Az egyik legfontosabb tulajdonságuk a polarizáltság, mely azt jelenti, hogy a sejten megkülönböztethető bazális és apikális felszín, melyek funkcionális és biokémiai tulajdonságaiban is eltérnek egymástól, így biztosítva az anyagok egyirányú áramlását. Kutatásom során a gasztrointesztinális (GI) epitél sejtek működésének vizsgálatára fókuszáltam. A GI epitél sejtek különböző funkciókat töltenek be a szervezetben. Kiemelt szerepük van például az alsóbb sejtrétegek védelmében, ahogyan az a szájüregben, garatban, nyelőcsőben jelen lévő többrétegű el nem szarusodó laphám esetében is megfigyelhető. Továbbá, segítenek a tápanyagok és a víz felszívásában, mint pl. a vékony- és vastagbél epitéliuma, vagy szekréciós funkciójuk is lehet, ahogyan a gyomorban, nyálmirigyekben vagy a hasnyálmirigyben. Kutatásaim során a nyelőcső és a hasnyálmirigy hámsejtek működésének vizsgálatára fókuszáltam. Bár e két szerv különböző funkciókat lát el a szervezetben, nevezetesen a nyelőcső továbbítja a táplálékot, míg a hasnyálmirigy az emésztésben vesz részt, közös jellemzőjük, hogy mindkét szervben fontos szerepet töltenek be a hámsejtek, és azok működési zavarai különféle gyulladásos és daganatos betegségek kialakulásához vezethetnek. Jelen dolgozatban e két szervre, nagyobb részben a nyelőcsőre, kisebb részben a hasnyálmirigyre vonatkozó kutatásaimat szeretném bemutatni.

## **1.2 A nyelőcső**

### **1.2.1 A nyelőcső anatómiai és szövettani áttekintése**

A nyelőcső a felső tápcsatornához tartozik, amely a gyűrűporc szintjén kezdődik, a mellkasban folytatódik a felső és hátsó mediastinumban, majd áthalad a rekeszizmon, ahol a gyomor cardia részében végződik. A nyelőcső a garatot és a gyomrot köti össze, két végén záróizom található, a felső nyelőcső záróizom (UOS) és az alsó nyelőcső záróizom (LOS). A nyelőcső fala négy rétegből áll, nevezetesen (belülről kifelé haladva) nyálkahártyából, submucosából, muscularis externából és adventitia rétegből.

### **1.2.2 A nyelőcső védelmi mechanizmusai**

A nyelőcső a káros hatások ellen védekező mechanizmusokkal rendelkezik; ide tartozik az antireflux mechanizmus, lumenális clearance mechanizmusok, és a szöveti rezisztencia. Antireflux mechanizmust a LOS működése és a rekeszizom biztosítja. Lumenális clearance

mechanizmushoz tartozik a graviáció hatása, a nyál és a nyelés folyamata, melyek együttesen csökkentik a luminális tartalom kontakidejét. A szöveti rezisztencia három komponensből áll, melyek a pre-epiteliális, epitheliális és poszt-epiteliális védelmi mechanizmusok. A pre-epiteliális védelmi vonal a mukózus réteget, a vizet és a bikarbonát ionokat foglalja magában. Az epitheliális védelemnek strukturális és funkcionális része is van. A strukturális alkotók megakadályozzák bizonyos ionok és molekulák diffúzióját a luminális térből az intra- és intercelluláris térbe. A sejtrestitúció és proliferáció mellett a funkcionális mechanizmusok között nagy jelentősége van az epitheliális iontranszportereknek, az intra- és extracelluláris puffereknek. Döntő szerepük van a transzcelluláris vagy paracelluláris  $H^+$  bejutása által okozott acidózis kompenzálásában. A nyelőcső nyálkahártyájának fő poszt-epiteliális védekező mechanizmusa a véráramlás.

### **1.2.3 A nyelőcső epitél sejtek iontranszporterei**

Az iontranszporterek a laphámsejtek bazolaterális és apikális oldalán egyaránt megtalálhatók, eloszlásuk egyéni mintázatot alakít ki, amely biztosítja az egyirányú ion diffúziót. Az iontranszporterek összehangolt működése nemcsak a pH-homeosztázist tartja fenn, ami elengedhetetlen a sejtműködéshez, hanem fontos a sejtek növekedésében, migrációjában, differenciálódásában, restitúcióban és a sejt volumen szabályozásában is. Az epitheliális védelem részeként az iontranszporterek jelentős szerepet töltenek be a gyomor-bél traktus fiziológiájában. Számos cikk azonosította az iontranszporterek jelenlétét a GI sejtekben, és ezek szerepét egyes betegségekben is leírták, de csak néhány foglalkozott a nyelőcső iontranszport mechanizmusával. Ezidáig az alábbi iontranszportereket azonosították a nyelőcsőben: anion kicserélők (AEs),  $Na^+/HCO_3^-$  kotranszporter (NBC),  $Na^+/H^+$  kicserélő (NHE),  $Na^+/K^+/ATPáz$ ,  $Na^+/K^+/2Cl^-$  kotranszporter (NKCC1), cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR),  $Ca^{2+}$  szenzitív  $Cl^-$  csatorna, bazolaterális és apikális  $K^+$  csatornák,  $K^+/Cl^-$  kotranszporter (KCC) és az epitheliális  $Na^+$  csatorna három alegysége (ENaC).

### **1.2.4 A $Na^+/H^+$ -kicserélő-1 fiziológiai funkciója a nyelőcső epitél sejtekben**

A  $Na^+/H^+$ -cserélők (NHE) integrált membránfehérjék, amelyek 1:1 sztöchiometrikus arányú  $Na^+$  beáramlást és  $H^+$  kiáramlást közvetítenek a sejtekben, a  $Na^+/K^+/ATPáz$  által biztosított elektrokémiai  $Na^+$  gradiens energiáját felhasználva. Az NHE-1 a nyelőcső epitél sejtek bazolaterális plazmamembránján található. Az NHE-1 fehérjét háztartási géneként azonosítják, valamint részt vesz pl. sejtproliferáció, migráció és differenciálódás folyamatában, ami összetett szerepét mutatja. Ugyanakkor a nyelőcső epitéliumában az NHE-1 fő funkciója,

hogy a  $H^+$  eltávolításával megakadályozza az intracelluláris savasodást, így savas luminális tartalom esetén fenntartja a sejt  $pH_i$  homeosztázisát.

## **1.2.5 A $Na^+/H^+$ -kicserélő-1 pathofiziológiai relevanciája a nyelőcsőben**

### **1.2.5.1 A $Na^+/H^+$ -kicserélő-1 szerepe a gastro-osophagealis reflux betegségben és a Barrett-nyelőcsőben**

Hosszú ideje fennálló gastrooesophagealis reflux betegség (GORD) esetén a nyelőcső hám alkalmazkodik a savas környezethez, és kialakul a Barrett-nyelőcső (BO), amelyben a nyelőcső alsó szakaszában többrétegű laphámot kolumnális metaplázia váltja fel. A celluláris mechanizmusok még nem teljesen tisztázottak. Számos tanulmány felvetette az NHE-1 lehetséges érintettségét; egyes cikkek emelkedett NHE-1 expressziót is kimutattak GORD-ban és BO-ban, míg normál szövetmintákban és sejtvonalakban csak gyenge NHE-1 expresszió volt kimutatható.

### **1.2.5.2 $Na^+/H^+$ -kicserélő-1 a nyelőcsőrákban**

A nyelőcsőrák a nyolcadik leggyakoribb rákos megbetegedés a világon, melynek az 5 éves túlélési aránya igen alacsony. Szövettanilag kétféle típust különböztetünk meg, a nyelőcső laphámkarcinómát (OSCC) és a nyelőcső adenokarcinómát (OAC), mely utóbbi a BO-val szoros összefüggésbe hozható. A nyelőcső rosszindulatú daganatairól kevesebb kísérleti adat áll rendelkezésre az NHE-1-gyel kapcsolatos molekuláris mechanizmusokról, és az eredmények ellentmondásosak.

## **1.2.6 A dohányzás hatása a nyelőcsőre**

A dohányzás az egyik legfontosabb etiológiai tényező a nyelőcsőbetegségek kialakulásában, illetve klinikai vizsgálatok egyértelmű eredményeket mutattak arra vonatkozóan, hogy a dohányzás növeli a BO és az OAC kockázatát. A Barrett-betegeknél a dohányzás elősegíti a progressziót, és megkétszerezi a high-grade diszplázia és rák kockázatát. Meglepő módon a dohányzás nyelőcső epitél sejtekre gyakorolt hatását egyetlen alapkutatási közleményben vizsgálták, amelyben egy  $Na^+$  transzporter szerepét mutatatták ki a dohányfüst hatásában, viszont a szerzők nem azonosították az érintett transzportert/transzportereket, így a pontos mechanizmus továbbra is ismeretlen.

## **1.3 A hasnyálmirigy**

### **1.3.1 A hasnyálmirigy anatómiája és funkciója**

A hasnyálmirigy egy megnyúlt, járulékos emésztőmirigy, amely retroperitoneálisan, a nyombél és a lép között keresztirányban helyezkedik el. Exokrin és endokrin funkciókat egyaránt ellát. A hasnyálmirigy exokrin része felelős az emésztőenzimek és a  $\text{HCO}_3^-$ -ban gazdag folyadék kiválasztásáért, amelyek együttesen a hasnyálmirigynedvet adják. A Langerhans-szigetek alkotják a hasnyálmirigy kisebb, endokrin részét, melyek a glükóz homeosztázishoz nélkülözhetetlen hormonokat termelnek, az inzulint, a glukagont, és a szomatostatint.

### **1.3.2 Az epitél sejtek szerepe a hasnyálmirigyben**

Az emberi hasnyálmirigy naponta 2,5 l lúgos, izotóniás hasnyálmirigynedvet választ el, amely alapvető fontosságú a szerv normál működésében. Az polarizált acináris sejtek szegmenseket alkotnak, ahol  $\text{NaCl}$ -t tartalmazó izotóniás folyadékot termelnek. A hasnyálmirigy duktális vezetékrendszere  $\text{Cl}^-$  iont képes felvenni, és viszonylag magas, 140 mM koncentrációjú  $\text{HCO}_3^-$ -ot és vizet kiválasztani, mellyel semlegesíti a savas acináris folyadékot. Az interkalált csatornák összegyűjtik az acináris folyadékot, majd befolyanak az intralobuláris, interlobuláris és interlobaris duktuszokba, amelyek végül elérik a fő duktális vezetékét.

### **1.3.3 Hasnyálmirigy duktuszok malignus betegségei**

A hasnyálmirigyrák egy agresszív, rosszindulatú daganattípus a gyomor-bél traktusban, amelynek az 5 éves túlélési aránya rendkívül alacsony. A tünetek hiánya és a hasnyálmirigy nehéz vizsgálhatósága miatt a diagnózis felállítása nehéz és gyakran kései. A hasnyálmirigyrákok 80%-a szövettanilag duktális adenokarcinóma és 60%-ban a pankréász feji részében alakulnak ki. A növekvő daganat a Wirsung-vezeték elzáródását okozza, obstrukciós sárgaság alakul ki, mely rossz prognózist jelent. A hasnyálmirigy intraepiteliális neoplázia (PanIN) és az intraduktális papilláris mucinózus neoplázia (IPMN) a pankréász duktális adenokarcinóma prekursor lézióinak tekinthetők.

### **1.3.4 Az epesavak mint etiológiai tényezők a hasnyálmirigyrákban**

Az epesavaknak jelentős szerepe van a lipidek emésztésében, a zsírban oldódó vitaminok felszívásában, valamint kulcsfontosságú molekulák anyagcserével, génexpresszióval vagy sejtproliferációval kapcsolatos jelátviteli útvonalakban. Az epesavak hasnyálmirigy sejtekre gyakorolt hatása a hasnyálmirigyrák kutatásának kiemelten fontos témája. Bár számos tanulmány leírta, hogy az epesavak, különösen a hidrofób epesavak hozzájárulhatnak a GI

daganatok kialakulásához és progressziójához, nincs olyan komprehenzív tanulmány, amely az összes, humán epében leggyakrabban előforduló epesavak hatását vizsgálta volna hasnyálmirigyrákban.

## 2. Célkitűzések

A dohányzásnak a BO patofiziológiájára és progressziójára gyakorolt hatásáról kevés információ áll a rendelkezésünkre. Ahogy a bevezetőben is láttuk, az iontranszportereknek kiemelt szerepe van a nyelőcsőkárosodás megelőzésében. Ennek alapján feltételeztük, hogy a nyelőcsőhám fő iontranszporterének, az NHE-1-nek a működése és kifejeződése megváltozik káros hatások, például dohányzás hatására, így jelentősége van a füst által kiváltott nyelőcsősérülés patofiziológiájában. A dolgozat első részében az alábbi célokat tűztük ki:

- I. a cigarettafüst kivonat NHE-1 izoforma aktivitására és kifejeződésére gyakorolt hatásának vizsgálata primer tengerimalac nyelőcső epitél sejteken, valamint humán metaplázis és diszplázis BO sejtvonalakon *in vitro*
- II. a dohányzás NHE-1-re gyakorolt hatásának vizsgálata *in vivo* tengerimalac modellen
- III. az NHE-1 hosszútávú dohányzás által kiváltott expresszióbeli változásainak vizsgálata egészséges és BO betegek nyelőcső mintáiban
- IV. az NHE-1 szerepének tanulmányozása a cigarettafüst kivonat hatásában

Számos tanulmány kifejtette az epesavak rákkeltő tulajdonságát. A hasnyálmirigy daganatok nagy része a hasnyálmirigy feji részében alakul ki, majd később a növekvő daganat a közös csatorna elzáródását okozza, és obstrukciós sárgaságot vált ki. Az egyes epesavak pontos hatása nem ismert a pankreászrák progressziójára nézve. Ezért a dolgozat második részének célja a következő volt:

- V. pankreász duktális adenokarcinóma sejtek proliferációjának vizsgálata különböző epesavakkal történt kezelést követően

## 3. Anyagok és módszerek

### 3.1 Humán minták

A betegek retrospektív adatgyűjtése a Szegedi Tudományegyetem Etikai Bizottságának jóváhagyásával (No. 4658), valamint a Helsinki Deklaráció és a GDPR elvei szerint történt. A 2018 januárja és 2021 májusa között gyűjtött kórszöveti mintákra vonatkozó betegadatokat



a Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar által használt orvosi adatbázisból, a MedSolution rendszerből nyertük ki. A BO betegeket kor, diagnózis, a betegség állapota, dohányzási anamnézis, valamint a nyelőcsőlezió hisztopathológiai leírása alapján válogattuk be a tanulmányba. A formalinnal fixált, paraffinba ágyazott nyelőcső mintákat a Szegedi Tudományegyetem Patológiai Intézete bocsájtotta rendelkezésünkre. A betegeket alapvetően két csoportra osztottuk: dohányosnak tekintettük a 20 éve, vagy annál hosszabb ideje dohányzókat, nem dohányzónak pedig azokat, akik soha nem dohányoztak, vagy az elmúlt egy évben nem dohányoztak. Kontrollként tumormentes rezekciós szélből vagy normál egészséges nyelőcsőből származó mintákat használtunk. A BO csoportban a betegek átlagos kora  $55.1 \pm 4.6$  év volt a dohányos csoportban ( $n = 7$ ), és  $57.3 \pm 3.8$  év a nem-dohányos csoportban ( $n = 20$ ). A kontroll csoportban a dohányosok átlagos életkora  $38.5 \pm 11.5$  év ( $n = 3$ ), és a nem dohányosoké  $59.7 \pm 3.8$  év volt ( $n = 7$ ).

### **3.2 Állatok**

Kísérleteinkhez 4-12 hetes hím tengerimalacokat használtunk. Az állatokat szobahőmérsékleten ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ), műanyag ketrecekben, 12:12 óra világos-sötét ciklusban tartottuk, biztosítva a szabad hozzáférést a laboratóriumi táphoz és a C-vitaminnal kiegészített vízhez. Minden állatkísérletet a Laboratóriumi állatok gondozási és használati útmutatója szerint (Amerikai Egyesült Államok, Egészségügyi és Humán szolgáltatási Minisztérium) és a Szegedi Tudományegyetem helyi Etikai Testületének jóváhagyásával végeztünk.

### **3.3 Sejtvonalak**

Kísérleteinkhez CP-A (humán metapláziás nyelőcső sejtvonal), CP-D (humán diszpláziás nyelőcső sejtvonal) és Capan-1 (humán pankreász duktális adenokarcinóma) sejtvonalakat használtunk. A sejteket 90-100% konfluencia elérését követően szélesztettük, a CP-A és CP-D sejteket 3-19 passzázs szám között, illetve a Capan-1 sejteket 30-35 passzázs szám között használtuk.

### **3.4 Cigarettafüst kivonat**

A krónikus cigarettafüst expozíció hatásának vizsgálatát a Pécsi Tudományegyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Tanszékén található dohányzókamrában végeztük. A hím tengerimalacokat három csoportra osztottuk a cigarettafüstnek való kitettség időtartama szerint (1, 2 és 4 hónapos expozíció,  $n=3$ /csoport). Az állatokat 5 hónapos korukban áldoztuk fel. Az állatokat napi 5 alkalommal, 10-10 percig tettük ki cigarettafüstnek TE2 zártkamrás kézi dohányzórendszerben. A kísérletben 3R4F Kentucky kísérleti cigaretta füstjét áramoltattuk a

kamra belsejébe. 24-48 órával az utolsó dohányoztatást követően áldoztuk fel az állatokat, majd nyelvcső epitél sejteket izoláltunk. A korban és nemben azonos kontroll állatokat nem dohányoztattuk. Minden kísérletet az intézményi irányelveknek megfelelően, jóváhagyott protokollok szerint végeztünk (No.: XII./2222/2018, Pécsi Tudományegyetem).

### **3.5 Cigarettafüst kivonat készítése és kezelés**

A cigarettafüst kivonatot (CSE) a Szegedi Tudományegyetem Farmakognóziái Intézet munkatársai állították elő. Röviden, 15 szűrő nélküli 3R4F Kentucky kísérleti cigaretta (12 mg kátrány és 1,0 mg nikotin/cigaretta) füstjét folyamatosan buborékolatták át 20 ml desztillált vízben. Ezután a CSE steril szűrése történt egy 0,22 µm-es szűrőn, és meghatározták a szárazanyag tartalmat. A CSE oldatot ezután HEPES oldat vagy médium segítségével a kívánt koncentrációra hígítottuk. A sejteket cigarettafüst-kivonattal kezeltük 6, 24 és 72 órán keresztül 1, 10 és 100 µg/ml koncentrációban.

### **3.6 Tengerimalac nyelvcső epitél sejtek izolálása**

Munkacsoportunk Kalabis és munkatársai által kidolgozott izolálási protokollt optimalizálta tengerimalac nyelvcső epitél sejtekhez. Röviden, az állatok feláldozását követően a nyelvcsövet eltávolítottuk, hosszirányban felvágtuk, Hank's Balanced Salt Solution-ban (HBSS) mostuk, majd diszpáz I oldatban (2 U/ml) 40 percig emésztettük. Ezt követően a belső, epitél réteget könnyedén eltávolítottuk a submucosáról, majd ismételten HBSS-sel öblítettük a mintát. Az epitél réteget ismételten enzimatis emésztésnek vetettük alá, melyhez 0,25% tripszin-EDTA 1% (v/v) antimikotikum/antibiotikummal kiegészített oldatát használtuk 2 × 15 percen keresztül, gyakori vortexelés mellett. Az emésztés leállításához szűrt Soybean tripszin inhibitorot adtunk az eppendorf tartalmához, majd a lizátumot 5 percig 1000 rpm-en centrifugáltuk. A sejt pelletet antimikotikum/antibiotikummal kiegészített szérumentes keratinocita médiumba vettük fel és fedőlemezre adagoltuk és felhasználásig inkubáltuk.

### **3.7 Immunhisztokémia**

Az NHE-1 expresszió immunhisztokémiai analizését humán nyelvcsőminták paraffinba ágyazott 4%-os, pufferolt, formalinnal fixált metszetén végeztük. Az 5 µm vastag metszeteket automatizált rendszerben festettük. Röviden, a tárgylemezeket paraffinmentesítettük, és az endogén peroxidáz aktivitást blokkoltuk 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-val (10 perc) történő inkubálással. Az antigén helyeket citrát pufferrel tártuk fel gyorsfőzőben (120 °C, 3 perc). A nem specifikus háttérfestődés minimalizálása érdekében a metszeteket előinkubáltuk tejjel (30 perc). Ezt

követően a metszeteket humán anti-NHE-1 (1:100 hígítás, 30 perc, Alomone Laboratories) elsődleges poliklonális antitesttel inkubáltuk, és LSAB2 jelölésnek  $2 \times 10$  percig tettük ki. Az immunreaktivitást 3,3'-diaminobenzidinnel tettük láthatóvá (10 perc); majd a metszeteket dehidratáltuk, lefedtük és megvizsgáltuk. Az NHE-1-et expresszáló sejteket sötétvörös/barna kromogén jelenlétével azonosítottuk. Az NHE-1 expressziójának értékelésére félkvantitatív pontozási rendszert alkalmaztunk. A festődés intenzitásának (0 = negatív, 1 = gyenge, 2 = közepes és 3 = erős) és a pozitív sejtek arányának (1 = 0-25% pozitív, 2 = 25-50% pozitív, 3 = 50-75% pozitív és 4 = 75-100% pozitív) pontozása történt, majd e két kapott pontszám szorzatával kaptuk meg az összesített pontszámot.

### 3.8 Western blot

A sejteket teljes EDTA-mentes proteáz inhibitorral kiegészített Cell Lysis Pufferben lizáltuk. Ezután a mintákat 2500 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk 20 percig 4 °C-on, és a felülúszót használtuk fel. A minták fehérje koncentrációját BCA assayel vagy Bradford reagenssel határoztuk meg, és azonos mennyiségű fehérjét (20 vagy 30 µg) poliakrilamid gélen rezolváltunk, és Protran vagy PVDF membránokra vittük át. A membránokat egy éjszakán át nyúl poliklonális anti-NHE-1, egér monoklonális anti-GAPDH vagy egér monoklonális anti- $\alpha$ -tubulin antitesttel inkubáltuk, majd a megfelelő HRP-konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk. A peroxidáz aktivitást fokozott kemilumineszcencia vizsgálattal vagy Clarity kemilumineszcencia szubsztráttal tettük láthatóvá. A jelintenzitást a QuantityOne szoftver vagy az Image Lab Software 5.2-es verziójával határoztuk meg. Az egyes membránok eredményeit a GAPDH vagy  $\alpha$ -Tubulin értékekre normalizáltuk, és összehasonlítottuk a 6 órás kontrollal.

### 3.9 Intracellular pH mérés

A sejteket 24 mm átmérőjű fedőlemezekre szélesztettük, amelyeket egy Xcellence képalkotó rendszerrel összekapcsolt fluoreszcens, inverz mikroszkóp (IX-71) tárgyasztalára helyeztünk. A sejteket pH-érzékeny fluoreszcens festékkel, BCECF-AM-mel inkubáltuk 30-60 percig, sejtípustól függően. A sejteket 37 °C-os oldatokkal perfundáltuk 5-6 ml/perc perfúziós sebességgel. Átlagosan 5-12 ROI-t jelöltünk ki minden mérésnél, és másodpercenként egy képet készítettünk CCD kamerával. A sejteket 440 és 495 nm-es hullámhosszal gerjesztettük, és a 440/495 arányt 535 nm-en detektáltuk. Egy  $pH_i$  mérést detektáltunk másodpercenként. A fluoreszcencia jel *in situ* kalibrálását magas  $K^+$ -nigericin technikával végeztük.

### 3.10 Pufferkapacitás mérés

A sejtek teljes pufferkapacitását ( $\beta_{\text{total}}$ ) a  $\text{NH}_4\text{Cl}$  pulzus technika segítségével határoztuk meg. Röviden, a nyelőcső epitél sejteket különböző koncentrációjú  $\text{NH}_4\text{Cl}$  oldatot áramoltattuk  $\text{Na}^+$ - és  $\text{HCO}_3^-$ -mentes környezetben. A teljes pufferkapacitást a következő egyenlet segítségével számoltuk ki:  $\beta_{\text{total}} = \beta_i + \beta_{\text{HCO}_3^-} = \beta_i + 2.3 \times [\text{HCO}_3^-]_i$ , ahol a  $\beta_i$  a belső sejtalkotók  $\text{pH}_i$  változásokat pufferoló képességére utal, melyet a Henderson–Hasselbach egyenletet segítségével határoztunk meg.

### 3.11 A $\text{Na}^+/\text{H}^+$ kicserélő aktivitásának mérése

Az NHE-1 aktivitásának értékelésére  $\text{NH}_4\text{Cl}$  pulzus technikát alkalmaztunk. A sejtekre 3 percen keresztül  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -t (20 mM) áramoltattunk, ami az  $\text{NH}_3$  sejtekbe való diffúziója miatt hirtelen  $\text{pH}_i$  emelkedést okozott. A  $\text{NH}_4\text{Cl}$  elvonás hatására a  $\text{pH}_i$  gyors csökkenését követően a  $\text{pH}_i$  regenerációja volt megfigyelhető. Az acidózisból történő regeneráció sebessége (az első 60 s) az NHE-k aktivitását tükrözi standard HEPES-pufferolt oldatban. Az NHE-1 aktivitás számszerűsítése érdekében a mért  $\text{pH}_i$  változásokat ( $\Delta\text{pH}/\Delta t$ ) transzmembrán bázis fluxussá ( $J(\text{B}^-)$ ) konvertáltuk a következő egyenlet segítségével:  $J(\text{B}^-) = \Delta\text{pH}/\Delta t \times \beta_i$ , ahol a  $\beta_i$  a belső pufferkapacitást jelenti. A  $J(\text{B}^-)$  kiszámításához, a kezdő  $\text{pH}_i$ -hoz tartozó  $\beta_i$ -t használtuk.

### 3.12 RT-qPCR

A teljes mRNS-t Macherey-Nagel RNS-izolációs kittel izoláltuk a gyártó utasításai szerint. Az RNS koncentrációját spektrofotometriával határoztuk meg. 2  $\mu\text{g}$  teljes RNS reverz transzkripciója High-Capacity cDNA Archive Kit használatával történt a gyártó utasításai szerint. Kvantitatív valós idejű PCR reakcióban *SLC9A1* TaqMan próbát használtunk a NHE-1 gén expresszió meghatározására, az értékeket  $\beta$ -actin-ra normalizáltuk (*ACTB*), majd a relatív génexpressziót a  $\Delta\Delta\text{C}_T$  módszerrel számoltuk ki. A változások mértékét  $2^{-\Delta\Delta\text{C}_T}$ -ben adtuk meg. A 0.5 alatti és 2.0 feletti értékeket tekintettük szignifikánsnak.

### 3.13 *SLC9A1* géncsendesítés

*SLC9A1* géncsendesítéshez  $3 \times 10^5$  sejtet 6-welles lemezre szélesztettük antibiotikum-mentes médiumban, majd éjszakán át inkubáltuk, melyet követően a médiumot 800  $\mu\text{l}$ /well friss, antibiotikum-mentes, teljes médiumra cseréltünk. *SLC9A1* géncsendesítést 40-50% konfluencián kezdtük meg. 100 pmol *SLC9A1* siRNA-t 250  $\mu\text{l}$  Opti-MEM szérumentes médiumban oldottunk. A sejtvonaltól és a transzfekció időtartamától függően 5-7.5  $\mu\text{l}$  Lipofectamine 2000-t adtunk 250  $\mu\text{l}$  Opti-MEM-hez, majd 5 perc szobahőmérsékleten történő inkubáció után az előkészített siRNA és Lipofectamine 2000 oldatokat összekevertük, majd

további 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk a komplexek létrejöttéhez. A komplexeket a wellekhez adtuk, majd óvatos keverést követően 72 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk. A transzfekció után RT-qPCR és immunhisztokémiai módszerrel határoztuk meg az mRNA és fehérje szinteket.

### **3.14 Citotoxicitás vizsgálata**

100 µl sejtszuszpenziót szélesztettünk 96-welles sejttenyésztő lemezre  $2 \times 10^4$  sejt/well sűrűséggel, és egy éjszakán át inkubáltuk. Ezután a sejteket CSE-vel (1, 10 vagy 100 µg/ml) kezeltük 6, 24 és 72 órán keresztül, majd a Cytotoxicity Detection Kit Plus-t használtuk a gyártó utasításai szerint. A laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitást 490 nm-en mértük. A kontroll csoportokat a kit utasításai szerint határoztuk meg. A Triton-X 100 által kiváltott LDH-felszabadulást 100%-nak tekintettük. A citotoxicitás százalékos arányát az alábbiak szerint számítottuk ki:  $\text{Cytotoxicitás (\%)} = (\text{exp. value} - \text{low control} / \text{high control} - \text{low control}) \times 100$ .

### **3.15 Proliferáció vizsgálata**

$10^3$ /well CP-A vagy CP-D sejtet szélesztettünk 96-welles lemezre (100 µl/well) komplett médiumban, majd a sejteket egy éjszakán át inkubáltuk. A sejteket ezután CSE-vel (1 és 10 µg/ml) kezeltük 6, 24 és 72 órán keresztül. A kezeléseket követően CCK8 assayt használtunk a gyártó utasításai szerint. Capan-1 sejtek esetében  $5 \times 10^3$  sejt/100 µl/well mennyiséget szélesztettünk a lemezre, majd éjszakán át történő inkubációt követően a sejteket epesavakkal kezeltük (glikokólsav (GCA); taurokólsav (TCA); glikodezoxikólsav (GDCA); taurodezoxikólsav (TDCA); glikokenodezoxikólsav (GCDCA); taurokenodezoxikólsav (TCDCA)) kétféle koncentrációban (100 and 500 µM) 24, 48 és 72 órán keresztül. A kezeléseket követően elvégeztük a CCK8 assayt.

### **3.16 Statisztikai analízis**

Az eredményeket átlag  $\pm$  SEM –ben közöltük. A statisztikai analízishez egyutas ANOVA-t, és Student-féle t-próbát alkalmaztunk.  $p \leq 0,05$  értéket tekintettük szignifikánsnak.

## **4. Eredmények**

### **4.1 A dohányzás hatása a nyelőcső epitél sejtek proliferációjára és viabilitására**

A CP-A és CP-D sejteket 96-welles lemezre oltottuk, egy éjszakán át hagytuk megtapadni, és 1, 10 és 100 µg/ml CSE-vel kezeltük 6, 24 és 72 órán keresztül. Az inkubációs

periódus végén a sejtek életképességét a Roche Cytotoxicity Detection Kit Plus segítségével vizsgáltuk. Mindkét sejtvonal esetében a CSE alacsonyabb koncentrációja (1 és 10 µg/ml) mérsékelt sejthalált okozott mindhárom inkubációs periódusban, ezzel szemben a 100 µg/ml CSE időfüggő, magas sejthalalozási arányt váltott ki. 72 órával a CSE kezelés után a sejtpusztulás 80% felett volt. Mivel a CSE 100 µg/ml koncentrációja toxikus volt a sejtek számára, a proliferatív aktivitás vizsgálatát csak alacsonyabb (1 és 10 µg/ml) CSE koncentrációban folytattuk. A sejtek 6, 24 és 72 órás CSE-kezelése után a sejtek proliferatív aktivitását CCK-8 assay használatával vizsgáltuk. A CP-A sejtek proliferációja dóziszfüggően csökkent 24 és 72 órás CSE kezelés után a kontrollhoz képest. A CP-D sejtekben a proliferációs ráta nőtt a 72 órás kezelési csoportban, mindkét koncentrációnál.

#### **4.2 A Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-kicszerelő-1 aktivitása és kifejeződése metapláziás és diszpláziás Barrett-sejtvonalakban**

Az NHE funkciójának vizsgálatára NH<sub>4</sub>Cl pulzus technikát alkalmaztuk. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> hiányában az acidózisból való regeneráció üteme az NHE-k aktivitását tükrözi. Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy az NHE-1 az elsődleges izoforma a CP-A és CP-D sejtvonalakban, és ennek az ioncsatornának van a legnagyobb szerepe a pH<sub>i</sub> regenerációban. Az acidózisból való regeneráció mértéke, következésképpen az NHE-1 funkcionális aktivitása szignifikánsan magasabb volt a CP-A sejtekben (BF: 5.47 ±0.52) mint a CP-D sejtekben (BF: 3.36 ±0.24). Megvizsgáltuk az NHE-1 mRNS és fehérje expresszióját is ezekben a sejtvonalakban bizonyos időpontokban (6, 24 és 72 óra). Az mRNS expressziójának vizsgálatára RT-qPCR-t végeztünk, és az adatokat β-aktinra (*ACTB*) normalizáltuk. Azt találtuk, hogy nem volt szignifikáns különbség az NHE-1 mRNS expressziójában a CP-A és CP-D sejtek között a vizsgált időpontokban, melyet fehérje szinten is sikerült igazolni.

#### **4.3 A cigarettafüst kivonat hatása a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-kicszerelő-1 aktivitására és kifejeződésére metapláziás és diszpláziás Barrett-sejtvonalakban**

A CSE az NHE-1 aktivitásra gyakorolt akut hatását a fent említett NH<sub>4</sub>Cl pulzus technikával vizsgáltuk. A sejteket a kísérletek előtt egy órán át inkubáltuk CSE-vel (1, 10 és 100 µg/ml). CP-A sejtekben 1 µg/ml CSE csökkentette az NHE-1 aktivitását a kontrollhoz képest (5.47±0.52 to 3.08 ± 0.55). A magasabb koncentrációjú CSE-kezelés (10 µg/ml) azonban a kicszerelő működésének a növekedését váltotta ki, a 100 µg/ml-es CSE-előkezelés pedig több mint kétszeres emelkedést okozott (8.18 ± 1.3 at 10 µg/ml CSE and 12.28 ± 0.73 at 100 µg/ml CSE). A CP-D sejtek esetében a CSE mindhárom csoportban csökkentette az NHE-1

aktivitását. Az NHE-1 expressziós vizsgálatokhoz a sejteket 1 µg/ml és 10 µg/ml CSE-vel kezeltük 6, 24 és 72 órán keresztül, majd qPCR és Western blot analízist végeztünk. Egyik sejtvonalban sem észleltünk szignifikáns változást az NHE-1 mRNS expressziójában CSE kezelés után. Ezzel szemben, a CP-A sejtekben szinte minden csoportban megemelkedett az NHE-1 fehérjeszint a kezelés hatására. Meglepő módon a CP-D sejtekben csak a 6 órás 1 µg/ml-es CSE kezelés okozott növekedést az NHE-1 fehérje kifejeződésében, a többi csoportban nem volt szignifikáns különbség.

#### **4.4 A dohányzás hatása a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-kicserélő-1 aktivitására normál nyelőcső epitél sejtekben**

Annak vizsgálatára, hogy a CSE hogyan befolyásolja az NHE aktivitást fiziológias körülmények között, megvizsgáltuk a CSE hatását a tengerimalacokból izolált normál nyelőcső epitél sejteken. A CSE-vel történő előkezeléshez a sejtvonalaknál alkalmazott koncentrációkat és módszereket alkalmaztuk. Az NHE-1 aktivitást szignifikánsan csökkentette a CSE kezelés (az 1 µg/ml CSE 12.19 ± 0.46 értéket 4.64 ± 0.94-re, a 10 µg/ml CSE 3.96 ± 0.43-re és a 100 µg/ml CSE 4.49 ± 0.4-re csökkentette). A krónikus vizsgálatok során tengerimalac modell segítségével vizsgáltuk a dohányzás nyelőcső epitél sejtekre gyakorolt hosszú távú hatásait. A hím tengerimalacokat három csoportba választottuk a cigarettafüstnek való kitettség időtartamától függően. Nyelőcső epitél sejteket izoláltunk a korábban említett protokoll szerint, és NH<sub>4</sub>Cl pulzus technikát végeztünk az NHE-1 funkció változásának meghatározására. Az eredmények hasonlóak voltak az akut kísérlet eredményeihez; hosszú távú cigarettafüst expozíció után a regeneráció mértéke mindhárom csoportban csökkent a saját kontroll csoportokéhoz képest, tehát a cigarettafüst expozíció csökkentette az NHE-1 aktivitást.

#### **4.5 A hosszútávú dohányzás hatása a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-kicserélő-1 kifejeződésére humán nyelőcsőben**

NHE-1 immunfestést végeztünk normál laphámból és BO-ból származó biopsziás mintákon. A betegeket négy csoportba soroltuk diagnózisuk és dohányzási anamnézisük alapján. Dohányosnak minősítettük azokat a betegeket, akik legalább 20 éve dohányoztak, nem dohányzónak azokat, akik soha, vagy a biopsziás mintavétel előtt egy évig nem dohányoztak. A fehérje expressziót félkvantitatív pontozási rendszerrel határoztuk meg, és a DAB intenzitásokat számítottuk ki a számszerűsítéshez. Normál, nem-dohányzó csoportban alacsony NHE-1 expresszió volt kimutatható, a dohányzó csoportban még alacsonyabb volt. Ezzel

szemben a BO betegek mintáiban erős NHE-1 expresszió volt megfigyelhető, amit a dohányzás tovább fokozott.

#### **4.6 A *SLC9A1* géncsendesítés hatása a proliferációra metapláziás és diszpláziás nyelőcső sejtvonalakban**

Annak vizsgálatára, hogy az NHE-1 megváltozott expressziójának vagy aktivitásának van-e szerepe a CSE proliferációra gyakorolt hatásában, az *SLC9A1* gént specifikus siRNS segítségével csendesítettük. A csendesítés hatékonyságát mRNS és fehérje szinten is igazoltuk. A CP-A sejtekben az NHE-1 knockdown minden inkubációs időpontban csökkentette a proliferáció sebességét, ami arra utal, hogy az NHE-1 nélkülözhetetlen a sejtek normál működéséhez. A CP-D sejtekben az NHE-1 fehérje hiánya kezdetben növelte a proliferáció sebességét, míg a további inkubációs idők során nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget. NHE-1 hiányában a CSE-kezelés szinte minden kezelt csoportban megnövelte a proliferáció sebességét a CP-A sejtekben. A CP-D sejtek esetében a proliferáció egyedül a 72 órás kezelési csoportban növekedett.

#### **4.7 Az epesavak hatása a Capan-1 sejtek proliferációjára**

A PDAC sejteket epesavakkal (GCA-val, TCA-val, GDCA-val, TDCA-val, GCDCA-val és TCDCA-val) inkubáltuk 24, 48 és 72 órán keresztül, két különböző koncentrációban (100 és 500  $\mu\text{M}$ ), majd megvizsgáltuk a sejtek proliferációs aktivitását. A TDCA kivételével az epesavak szinte minden kezelt csoportban fokozták a Capan-1 sejtek proliferációját. A TDCA 100  $\mu\text{M}$  koncentrációban csökkentette a sejtek proliferatív aktivitását, azonban a dózist emelve (500  $\mu\text{M}$ ) növelte azt.

### **5. Megbeszélés és új megállapítások**

Jelen munkában az epitel sejtek sejtleletani változásait vizsgáltuk a GI betegségek patofiziológiájában. A dolgozat nagy részében a CSE hatását vizsgáltuk a nyelőcső epitel sejteken található NHE-1-re, illetve a dohányzás szerepét a BO patofiziológiájában. A dolgozat második, kisebb részében, az emberi epében gyakran előforduló különböző epesavak hatását vizsgáltuk a PDAC sejtek proliferációs aktivitására.

Tanulmányunk új megállapításai a következők:

- Az NHE-1 aktivitása eltér a normál, metaplasztikus és diszpláziás nyelőcső sejtekben, és a dohányzás eltérőképpen befolyásolja az NHE-1 működését az egyes sejtípusokban.



- **Fiziológiai körülmények között** az NHE-1 aktivitása és expressziója egyaránt csökken a dohányzás hatására, ami intracelluláris acidózist eredményez. A tudományos irodalom szerint a pH-optimum megváltozása apoptózist, vagy transzdifferentiálódás révén metaplasia megjelenését idézheti elő, amelyben a sejtek hajlamosabbak a malignus transzformációra.
- **Metapláziás állapotban** a dohányzás fokozza az NHE-1 működését, ami feltehetően egy kompenzációs mechanizmus, amely az intracelluláris pH normál tartományban tartásával megakadályozza a rákos folyamatok beindulását. Az NHE-1 expressziójának csökkenésével ez a védőmechanizmus megszűnik, és a sejtek proliferációs potenciálja megnő.
- A BO-val ellentétben az NHE-1 csökkent aktivitása vagy expressziója nem volt hatással a dohányzás által kiváltott proliferációra **diszpláziás állapotban**, ami más mechanizmusok érintettségére utal.

Eredményeink megerősítik azt a megfigyelést, hogy a dohányzás jelentős szerepet játszik a BO patomechanizmusában. Az NHE-1 alapvető szerepet játszik a sejtek pH-homeosztázisában. Normál nyelőcső epitél sejtekben a dohányzás csökkenti az NHE-1 aktivitását és hosszú távon az NHE-1 expressziója is csökken. A romló alkalizáló funkció már nem tudja fenntartani a normál pH-tartományt, és ez az állapot a nyelőcső epitéliumának metaplasztikus átalakulásához vezethet. A metaplasztikus sejtekben az NHE-1 expressziója és aktivitása is magasabb, hogy kompenzálja a dohányzás vagy más toxikus szerek okozta pH-változásokat. Az NHE-1 szintén részt vesz a proliferációban, és NHE-1 hiányában a metaplasztikus sejtek nagy proliferatív aktivitással reagálnak a dohányzásra. Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy a metaplasztikus sejtek megpróbálják kompenzálni a káros hatások, például a dohányzás hatását. Ezek a sejtek nagyon hajlamosak a malignus átalakulásra, és könnyen előfordulhat diszpláziás állapot. A diszpláziás sejtekben az NHE-1 aktivitása szignifikánsan alacsonyabb, mint a metaplasztikus sejtekben, és a dohányzás nem befolyásolja ezen iontranszporter expresszióját vagy aktivitását. Az NHE-1 csendesítése után a diszpláziás sejtek proliferációja nem változik, de a hosszú távú kezelés fokozza azt. Ezen eredmények alapján feltételezzük, hogy az NHE-1-nek védő szerepe van metaplasztikus állapotban, azonban a diszpláziás sejtek már nem reagálnak a CSE kezelésre, ami azt jelezheti, hogy ebben a sejttypusban nem változtathatók meg a kialakult változások. Érdekes lenne annak vizsgálata, hogy a dohányzás abbahagyása esetén megváltozna-e az NHE-1 expressziója vagy aktivitása, valamint a dohányzás által okozott kóros változások visszafordíthatóak-e. Azonban minden

dohányzó betegnek javasolt a dohányzás mielőbbi abbahagyása annak érdekében, hogy csökkenjen a nyelőcső rosszindulatú daganatos megbetegedések kialakulásának esélye.

Összességében úgy gondoljuk, hogy az NHE-1 expressziójának növekedése a dohányzás káros hatásai elleni védekező mechanizmus része; ennek a hipotézisnek az alátámasztásához azonban további vizsgálatok szükségesek. Mindazonáltal a jelen eredmények azt mutatják, hogy az NHE-1 funkció közvetlen fokozása új utakat kínálhat a dohányzás káros hatásának csökkentésében.

A pankreasz rákos sejtvonalon végzett eredményeink megerősítették az epesavak karcinogén hatását, mivel kimutattuk, hogy fokozzák a rákos sejtek egyik fontos jellemzőjét, a proliferatív aktivitást. Ez a funkció agresszívebbé teheti a hasnyálmirigyrákot, mely fontos információ lehet a terápia szempontjából.

## **6. Köszönetnyilvánítás**

Szeretném őszinte hálámat és köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Venglovecz Viktóriának, aki tanított és vezetett PhD képzésem során. Szakmai útmutatása, logikus gondolkodásmódja és bátorítása segítette a fejlődésemet és a tudományos gondolkodásmód elsajátítását.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Baczkó István Professzor Úrnak és Dr. Varró András Professzor Úrnak, hogy lehetőséget biztosítottak a munkavégzésre és PhD képzésem teljesítésére a Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetében. Hálával tartozom Dr. Hegyi Péter Professzor Úrnak iránymutatásaiért és szakmai támogatásáért.

Örömmre szolgált az együttműködés a megjelent cikkek társszerzőivel, és köszönetemet fejezem ki a Szegedi Tudományegyetem Farmakognóziái Intézetének, Biokémiai Intézetének, Pathológiai Intézetének és a Pécsi Tudományegyetem Farmakológiai Intézetének munkatársainak a közös munkáért. Külön köszönetet érdemel Köhler Zoltán Márton, Dr. Csekő Kata, Daru Krisztián és Horváth Attila.

Őszinte köszönetemet fejezem ki Gál Eleonóranak, Pritz Tündének, Ébert Attilának, Dr. Molnár Rékának, Korsós Margarétának, Árva Miklósnének, Magyarne Pálfi Editnek, Tóth Zsoltnak és minden kollégámnak. Segítségük, tanításuk, és támogatásuk nélkül az a dolgozat nem születethetett volna meg.

Az alábbi anyagi támogatások nélkül kutatásunk nem jöhetett volna létre: Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (FK123982), the Economic Development and Innovation

Operative Programme Grants (GINOP-2.3.2-15-2016-00015), a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal, az Emberi Erőforrások Minisztériuma (EFOP 3.6.2-16-2017-00006), a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai Posztdoktori Ösztöndíja (HAS) Viktória Venglovecz (00509/16), HAS-USZ Momentum Pályázat (LP2014-10/2017) és az UNKP-18-4 Emberi Erőforrások Minisztériumának új Nemzeti Kiválósági Programja.

Végül, de nem utolsósorban hálás vagyok családomnak és barátaimnak, akik mellettem álltak és támogattak a képzésem során.