

A nyelőcső epitél sejtek szerepének vizsgálata gastro-oesophagealis reflux betegségben

Ph.D. Tézis

Dr. Laczkó Dorottya



Szegedi Tudományegyetem

Szent-Györgyi Albert Orvos- és Gyógyszerésztudományi Centrum

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

I. számú Belgyógyászati Klinika,

Szeged

2016

A nyelőcső epitél sejtek szerepének vizsgálata gastro-oesophagealis reflux betegségben

Ph.D. Tézis

Dr. Laczkó Dorottya

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezetők: dr. Venglovecz Viktória, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet
Szegedi Tudományegyetem

dr. Rosztóczy András, I. számú Belgyógyászati Klinika, Szegedi
Tudományegyetem

Szegedi Tudományegyetem

Szent-Györgyi Albert Orvos- és Gyógyszerésztudományi Centrum

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

I. számú Belgyógyászati Klinika,

Szeged

2016

1. A TÉZIS TÁRGYÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

A tézis tárgyához szorosan köthető és a tézisben felhasznált közlemények

- I. **Dorottya Laczkó**, András Rosztóczy, Klaudia Birkás, Máté Katona, Zoltán Rakonczay Jr., László Tizslavicz, Richárd Róka, Tibor Wittmann, Péter Hegyi, Viktória Venglovecz. Role of ion transporters in the bile acid-induced esophageal injury. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2016 Jul 1;311(1):G16-31. IF: **3,798**
- II. Jianping Kong*, Kelly A. Whelan*, **Dorottya Laczkó**, Brendan Dang, Angeliz Caro Monroig, Ali Soroush, John Falcone, Ravi K. Amaravadi, Anil K. Rustgi, Gregory G. Ginsberg, Gary W. Falk, Hiroshi Nakagawa, John P. Lynch. Autophagy levels are elevated in Barrett's esophagus and promote cell survival from acid and oxidative stress. *Molecular Carcinogenesis* 2016 Nov;55(11):1526-1541. IF: **4,808** (*Megosztott első szerzők)
- III. **Dorottya Laczkó**, Fang Wang, F. Bradley Johnson, Nirag Jhala, András Rosztóczy, Gregory G. Ginsberg, Gary W. Falk, Anil K. Rustgi, John P. Lynch. Modeling esophagitis using human 3D organotypic culture system. *American Journal of Pathology* (Bírálat alatt)

2. A TÉZIS TÁRGYÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNY

- IV. Andrea Szentesi, Emese Tóth, Emese Bálint, Júlia Fanczal, Tamara Madácsy, **Dorottya Laczkó**, Imre Ignáth, Anita Balázs, Petra Pallagi, József Maléth, Zoltán Rakonczay Jr, Balázs Kui, Dóra Illés, Katalin Márta, Alexandra Demcsák, Andrea Párniczky, Gabriella Pár, Szilárd Gódi, Dóra Mosztbacher, Ákos Szücs, Adrienn Halász, Ferenc Izbéki, Nelli Farkas, Péter Hegyi: Analysis of Research Activity in Gastroenterology: Pancreatitis is in Real Danger *Plos One* 2016 (Elfogadott eredeti közlemény PONE-D-16-26557R1) IF: **3,057**

Publikációk száma: 3 (1 első szerzős)

Összesített impakt faktor: **11,663**

3. RÖVIDÍTÉSEK

2D: 2 dimenziós

3D: 3 dimenziós

7AAD: 7-amino aktinomycin D

BCECF-AM: 2'7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymetil észter

BO: Barrett-oesophagus

$[Ca^{2+}]_i$: intracelluláris Ca^{2+} koncentráció

CBE: Cl^-/HCO_3^- kicserélő (anion kicserélő)

CQ: choloroquin

FURA-2-AM: 5-Oxazolecarboxylic acid, 2-(6-(bis(carboxymethyl)amino)-5-(2-(2-(bis(carboxymethyl)amino)-5-methylphenoxy)ethoxy)-2- benzofuranyl)-5-oxazolecarboxylic acetoxymethyl ester

HOE-642: 4-izopropil-3-metilszulfonilbenzoil-guanidin metánszulfonát

GORB: gastro-oesophagealis reflux betegség

H₂DIDS: diisothiocyanostilbene-2,2'-diszulfon sav

IL: interleukin

NBC: Na^+/HCO_3^- kotranszporter

NHE: Na^+/H^+ kicserélő

OTC: organotipikus sejtkultúra

pH_i: intracelluláris pH

PPI: proton pumpa inhibitor

4. BEVEZETÉS

A gastro-oesophageális reflux betegség (GORB) a felső gasztrointesztinális traktus komplex motilitászavarán alapuló kórkép, amelynek következtében a gyomorbennék a nyelőcsőbe vagy a légutakba kerülve klinikai tüneteket, illetve bizonyos esetekben makroszkóposan észlelhető elváltozásokat hoz létre a nyelőcsőben. A GORB az egyik leggyakrabban előforduló emésztőszervi eltérés. Epidemiológiai vizsgálatok szerint a lakosság közel 20%-nak vannak hetente jelentkező, gyomorégéssel járó panaszai. A GORB incidenciája és prevalenciája világszerte növekvő tendenciát mutat, ami leginkább a fejlett nyugati országokra jellemző.

A betegség endoszkópos megjelenési formája alapján három alcsoportra osztható: 1. nem erozív refluxbetegség, ahol a kóros fokú reflux sem mutat makroszkóposan észlelhető eltérést a nyelőcsőben. Ez a csoport adja az összes beteg mintegy 60%-át. 2. Erozív refluxbetegség, ahol az endoszkópos vizsgálat eróziók jelenlétét igazolja a nyelőcső nyálkahártya kisebb vagy nagyobb részén. Ebbe a csoportba olyan, nyelőcsövet érintő súlyos szövődmények is előfordulhatnak, mint vérzés, perforáció, nyelőcsőszűkület. 3. Barrett-oesophagus (BO), mely alatt a GORB azon alcsoportját értjük, amelyben az oesophago-gastricus junkció felett a normálisan jelen lévő többrétegű laphám helyét metaplasztikus hengerhám foglalja el. Míg az európai klasszifikációs rendszerek jelentős része ide sorolja a gyomorhám eredetű metapláziákat, addig az amerikai szerint pusztán az egyértelmű prekancerózist jelentő specializált intesztinális metaplázia jelenléte a diagnózis kritériuma. Noha a BO prekancerózis jellege régóta tudott, a nyelőcső adenokarcinómájának elmúlt évtizedekben a nyugati országokban tapasztalt növekedése miatt kiemelt tudományos figyelem fordult a kórkép irányába. Bár a pontos patomechanizmus máig intenzív kutatás tárgyát képezi, annyi bizonyosnak látszik, hogy a krónikusan fennálló, elhúzódó savas és epés refluxnak, illetve az ennek következményeként kialakult idült gyulladásnak fontos szerepe van.

4.1. Ion transzporterek protektív szerepe az epesav okozta nyelőcső nyálkahártya sérülésben

GORB-ban a nyelőcső epitél sejtek a gyomorsav és az epesavak károsító hatásának vannak kitéve. Reflux során a lumenális savterhelés hatására megváltozik a sejtek intracelluláris pH-ja is. Ennek helyreállításában feltételezhető a sejteken lévő ion transzporterek szerepe, melyek ezáltal a nyelőcső védekezési rendszerében is fontos szerephez jutnak. Korábbi tanulmányok már

azonosítottak a nyelőcső normál, többrétegű laphámjában ilyen transzportereket, azonban a krónikus reflux szövődményeként kialakuló BO metaplasztikusan átalakult hámsejtjeinek iontranszporteinek típusáról és működéséről nincsenek adatok.

4.2. Az autofágia szerepe Barrett- nyelőcsőben

Az autofágia az ubiquitin-proteáz rendszer mellett alapvető szerepet játszik a sejtek kiegyensúlyozott fehérje háztartásában. Az autofágia szabályozott működése elengedhetetlen a sejtek normális funkcionálásához, nem véletlen tehát, hogy az autofágia kóros szabályozását már több betegségben is (pl. eozinofil oesophagitis, gyulladáscélú bélbetegségek, neurodegeneratív betegségek) leírták. Az elmúlt években ezen kívül egyre inkább bebizonyosodni látszik patogenetikai szerepe a rosszindulatú daganatok növekedésében is, hiszen a tumorsejtek gyakran az autofágiát használják túlélésük érdekében. E kapcsolat ellenére a prekancerózus léziókban, mint például BO-ban, az autofágia szerepe kevésbé vizsgált.

4.3. A GORB patogenezisének modellezése

A GORB és a BE patofiziológiájának tanulmányozását nagyban nehezíti a megfelelő modellek hiánya. Az immortalizált, 2 dimenziós (2D) nyelőcső sejt kultúrák rendkívül elterjedtek, nagy hátrányuk azonban, hogy nem teszik lehetővé az epitel sejt és mikrokozonyezetük közötti bonyolult kölcsönhatások vizsgálatát. További probléma, hogy az állatmodellek használata a GORB és Barrett-kutatásban eddig kevésbé bizonyult alkalmasnak. Használatukat limitálja többek között a legtöbb állatfaj anatómiailag eltérő nyelőcsőve, illetve a reflux modellezésére kifejlesztett speciális műtéti eljárások komplikáltsága. Az imént felsorolt módszerek hátrányai inspirálták a 3 dimenziós (3D) organotipikus nyelőcső sejt kultúra (OTC = organotypic cell culture) kidolgozását, ami egy olyan *in vitro* rendszer, ami fiziológiailag relevánsabb, mivel lehetővé teszi a nyelőcső epitel sejtek és mikrokozonyezetük közötti kölcsönhatások vizsgálatát.

5. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink során célul tűztük ki:

- I. Humán nyelőcső Barrett-metapláziás nem-diszpláziás (CP-A) és diszpláziás (CP-D) szakaszából vett sejtvonalakon található ion transzporterek funkcionális azonosítását, valamint a refluxátumban található károsító anyagok közül az epesavak hatását ezek működésére, továbbá normál és metapláziás hámmal borított humán nyelőcső szakaszokból vett biopsziákban *ex vivo* vizsgálni az ion transzporterek kifejeződését.
- II. Az autofágia szerepének tisztázását az intracellularis reaktív oxigéngyökök képződésében, illetve a sejtek viabilitásában különböző nyelőcső sejtvonalakon (normál laphám, Barrett-metaplázia, adenokarcinóma) refluxot utánzó savas expozíciót követően.
- III. Kalabis *és mtsai.* által kifejlesztett organotipikus nyelőcső sejt kultúra protokollt továbbfejleszteni annak érdekében, hogy jobban tükrözze a gyulladásban lezajló változásokat és ezáltal alkalmasabb legyen a reflux által a nyelőcsőben okozott gyulladásos jelenségek modellezésére

6. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

6.1. Sejtvonalak

Kísérleteinkhez humán nyelőcső 1) normál, többrétegű laphámából (STR), 2) metapláziás, nem-diszpláziás (CP-A), 3) metapláziás, diszpláziás (CP-D) illetve 4) adenokarcinómás (OE19) szakaszából vett sejtvonalakat használtunk. Az STR, CP-A és CP-D sejteket speciális keratinocita médiumban (KSFM), míg az OE19 sejteket RPMI médiumban tenyésztettük, amit 10% főtális borjú szérummal (fetal calf serum-FCS) egészítettük ki. A tápfolyadékot minden második nap cseréltük. A sejteket 5%-os CO₂-tartalom mellett növesztettük 37°C-on.

6.2. Humán nyelőcső biopsziák

14 ismert BO beteget vizsgáltunk. Etikai engedély szám: 2348. A rendszeres ellenőrzés céljából végzett endoszkópos vizsgálat során biopsziás mintavétel történt a nyelőcső normál többrétegű laphámjából és a metaplasztikus Barrett-epitéliumból.

6.3. 3D organotipikus sejtkultúra

Az organotipikus nyelőcső sejtkultúra készítése során először a fibroblasztokat kollagén/Matrigel mátrixba ágyaztuk, majd humán nyelőcső epitel sejteket szélesztünk a tetejére. A gyulladás modellezésére perifériás mononukleáris sejteket adunk a kollagén/fibroblaszt mátrixhoz majd Th1 pro-inflammatorikus citokinekkal (IL-2, IL-7, IL-15) stimuláltuk. Utóbb hisztológiai elemzés céljából a mintákat paraffinba ágyaztuk, továbbá az epitel rétegből mRNS-t és proteint izolálunk.

6.4. Intracelluláris pH és Ca²⁺ detektálása

Az intracelluláris pH (pH_i) és Ca²⁺ [(Ca²⁺)_i] meghatározása céljából a CP-A és CP-D sejteket speciális intracelluláris fluoreszcens festékekkel (BCECF-AM és FURA-AM) inkubáltuk 30-45 percig 37°C-on. A Na⁺/H⁺ kicserélő transzporter (NHE), Na⁺/HCO₃⁻ ko-transzporter (NBC) és a Cl⁻/HCO₃⁻ kicserélő (CBE) aktivitásának változását ammónium pulzus technika segítségével vizsgáltuk.

6.5. Epesavas kezelés

Az epesavak krónikus hatásának *in vitro* modellezésére a sejteket 7 napon keresztül epesav koktéllal kezeltük 3x10 perces pulzusokkal 7,5-ös és 5,5-ös pH-n. Az epesav koktél a következő összetevőket tartalmazta: 170 μM glikokólsav, 125 μM glikokenodezoxikólsav, 100 μM dezoxikólsav, 50 μM glikodezoxikólsav, 25 μM taurokólsav, 25 μM taurokenodezoxikólsav és 8 μM taurodezoxikólsav.

6.6. RNS izolálás, reverz transzkripció, valós idejű PCR

A biopsziákból, humán sejtvonalakból illetve OTC epitél rétegből a totál RNS-t Nucleospin RAI RNS izoláló kit segítségével izoláltuk, míg a reverz transzkripciót 3 μg RNS felhasználásával High-Capacity cDNA Archive Kit-tel végeztük, a gyártók protokollja szerint. Az NHE-1, NHE-2, NBC, Slc26a6 illetve az IRF-1 gének kifejeződésének változását qRT-PCR technika segítségével vizsgáltuk, TaqMan illetve SYBR Green primer/próbák felhasználásával.

6.7. Immunohisztokémia

Formalinban fixált, 5 μm -es vastagságú, paraffinba ágyazott humán nyelőcső illetve OTC metszeteket használtunk fel immunfestésre. Az NHE-1, NHE-2 transzporterek, CD45 sejtfelszíni marker, illetve Ki-67 proliferációs marker kimutatásához a metszeteket az adott antigénre specifikus nyúl poliklonális ellenanyagokkal egy éjszakán keresztül inkubáltuk. Ezt követően a metszeteket anti-nyúl IgG másodlagos ellenanyaggal kezeltük. Az immunreakciót 3,3'-diaminobenzidin-nel tettük láthatóvá. Az NHE-1-et, NHE-2-t, CD45-öt, illetve Ki-67-et tartalmazó sejtek sötét vörös/barna színreakciót adtak.

6.8. Western blot analízis

A CP-A és CP-D sejtvonalakból, illetve OTC epitél rétegből történő fehérje izolálást követően SDS-gélelektroforézis segítségével azonos tömegű fehérje mintákat frakcionáltunk majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk. Ezt követően a membránt specifikus elsődleges ellenanyagokkal (NHE-1, IRF-1) inkubáltuk egy éjszakán keresztül. Loading kontrollként GAPDH, illetve tubulin ellenanyagokat használtunk. Másnap a membránokat HRP-vel konjugált másodlagos antitestekkel kezeltük 1 órán keresztül. Végül a membránokat enhanced chemiluminescence reagens (ECL) segítségével röntgenfilmekre exponáltuk.

6.9. Áramlási citometria

Az intracelluláris reaktív oxigéngyök képződését (DCF), az autofágiás aktivitás mértékét (Cyto-ID), illetve a sejtek viabilitásának (7AAD) vizsgálatát speciális intracelluláris festékekkel végeztük a gyártó protokollja szerint, majd a változásokat áramlási citometriával detektáltuk.

6.10. Statisztikai analízis

Az eredményeket átlag +/- standard hiba (SEM) formájában fejeztük ki. A kísérletek statisztikai kiértékeléséhez variancia analízist (ANOVA) illetve student t-tesztet alkalmaztunk. A szignifikancia szintet $p < 0.05$ -ben határoztuk meg.

7. EREDMÉNYEK

7.1. Az iontranszporterek szerepe a metapláziás nyelőcső sejtekben az epesav okozta sérülés elleni védekezésben

A nyelőcső metapláziás szakaszából izolált epitél sejtvonalakban (CP-A és CP-D) a pH_i kalibrálását követően a sejteken lévő ion transzporterek funkcionális azonosítását végeztük el ion-elvonásos, ammónium pulzus módszerek illetve transzporter specifikus inhibitorok segítségével. Ezen kísérletek során az NHE, NBC illetve CBE ion transzportereket sikerült azonosítanunk. Az NHE specifikus inhibitor, HOE-642 segítségével kimutattuk, hogy az NHE-1 és 2 funkcionálisan aktívak a nyelőcső epitél sejteken, illetve hogy ezek közül az NHE1 az aktívabb izoforma. Továbbá HOE-642 és az NBC inhibitor, H₂DIDS segítségével megállapítottuk, hogy az NHE és NBC egyforma mértékben vesznek részt a sejtek alkalizációjában.

Az epesav koktél dóziszfüggő $[(Ca^{2+})]_i$ emelkedést váltott ki a CP-A sejtekben, ami sokkal kifejezettebb volt savas (pH=5,5) körülmények között. Ez a hatás kivédhető volt az endoplazmatikus retikulum (ER) inozitol trifoszfát (IP₃) receptorának specifikus inhibitorával, koffeinnel miután a Ca²⁺-ot elvontuk az extracelluláris térből. A sejtplazma membránon jelen lévő, Ca²⁺-csatornákat blokkoló Gd³⁺ jelenlétében szintén jelentős $[(Ca^{2+})]_i$ szignál csökkenés volt tapasztalható.

Hepes oldatban az epesav koktél a CP-A sejtekben dózis függően csökkentette, míg a CP-D sejtekben növelte az NHE aktivitást, továbbá kimutattuk, hogy CP-A sejtek esetén az epesavak gátló hatása leginkább az NHE-1 iontranszporterén keresztül valósul meg. Ezzel szemben HCO₃⁻ jelenlétében az epesavak mindkét sejtvonal esetén dóziszfüggően fokozták mind a CBE, mind a NBC aktivitását.

Az epesavak krónikus hatásának modellezésére a sejteket epesav koktéllal kezeltük naponta 3x10 percen keresztül 7 napon át. A kezelést követően neutrális pH-n a CP-A sejtekben az összes vizsgált ion transzporter (NHE-1, NHE-2, NBC, Slc26a6 CBE izoforma), míg CP-D-ben az NHE-1 és az NBC mRNS szintjében tapasztaltunk szignifikáns növekedést. Ezzel szemben savas pH-n történt kezelést követően mindkét sejtvonalban csak az NHE-1 szintje emelkedett meg. Fehérje szinten csak az NHE-1 protein szintjében tapasztaltunk növekedést mindkét sejtvonal esetében.

A Barrett-nyelőcsöves betegekből vett biopsziás mintákban az NHE-1, NHE-2, NBC, illetve a CBE izoforma, Slc26a6 mRNS szintjeszignifikánsan emelkedett volt a metapláziás

szakaszokból vett mintákban, a normál laphámmal borított hámterületekkel összehasonlítva. Immunohisztokémiával kimutattuk, hogy az NHE-1 illetve 2 izoformák erősebben festődtek a metaplasztikus hám felszínén, mint a laphámon.

7.2. Az autofágia szerepe a Barrett-nyelőcső patogenezisében

STR, CP-A, CP-D illetve OE19 sejtvonalakban savas (pH=3,5) pulzussal történő kezelést követően a reaktív oxigéngyök képződést, illetve az autofágiás aktivitást vizsgáltuk. Ha az autofágiát chloroquin (CQ) segítségével blokkoltuk, akkor savas kezelést követően az STR és CP-A sejtekben a reaktív oxigéngyök szint szignifikánsan megnövekedett. Ezzel szemben CP-D és OE19 diszplázias sejtvonalakban az autofágia gátlása nem volt jelentős hatással a reaktív oxigéngyök képződésre. Az autofágia aktivitásának vizsgálata során STR és CP-A sejtekben az autofágia szintje jelentős emelkedést mutatott mindhárom kezelési körülmény között (savas kezelés, CQ kezelés, kombinált (sav+CQ) kezelés). Ezzel szemben CP-D-ben egyik esetben sem láttunk szignifikáns változást, míg OE19 esetén jelentős csökkenést tapasztaltunk az autofágia szintjében. Mivel ezek az eredmények jelentősen eltértek a vártaktól, ezért más módszerrel is megnéztük ezen kezelések hatását, aminek során GFP-vel jelölt LC3 autofagoszóma-specifikus fehérjét jelző ponttátumok detektálásával következtettünk az autofágia mértékére. Ugyanezen protokoll alkalmazása mellett az autofágiás aktivitás növekedését tapasztaltuk a kezelések hatására.

STR, CP-A, CP-D és OE19 sejteket savas pulzusokkal kezeltük a korábban ismertetett protokoll szerint és 24 órával később megvizsgáltuk a sejtek viabilitását 7AAD festék segítségével. Az autofágia blokkolása a savas kezeléssel együtt az összes sejtvonalban szignifikánsan fokozta a sejtpusztulást a többi kezelési protokollhoz viszonyítva.

7.3. A nyelőcsőgyulladás organotipikus modellezése

Az OTC rendszer lehetővé tette a mátrixba ágyazott immunsejtek túlélését és proliferációját, ha azokat pro-inflammatorikus citokinekkal (IL-2, IL-7 és IL-15) stimuláltuk, amit a megnövekedett CD45 leukocita marker és Ki-67 proliferációs marker festődése jelzett. Továbbá ezen immunsejtek aktiválódását is kimutattuk Interferon Regulatory Factor-1 (IRF-1) segítségével, ami szignifikáns növekedést mutatott mRNS és protein szinten is a citokinekkal kezelt immunsejt ko-kultúrákban.

Az OTC-kben létrejött gyulladásos mikro környezet hatására az epitél rétegben morfológiai változásokat tapasztalunk: mind a bazális, mind a szuprabazális réteg jelentősen megvastagodott, illetve regeneratív változások (pl. hiperkeratinizáció és keratin gyöngyök jelenléte) voltak megfigyelhetők.

A gyulladásos környezet stimulálta a nyelőcső epitél sejtek proliferációját, amit Ki-67 proliferációs marker segítségével mutattunk ki. Ugyanakkor a szuprabazális rétegben a sejtek szignifikánsan nagyobb apoptotikus aktivitást is mutattak, amit a TUNEL pozitív sejtek emelkedett szintje jelzett.

8. DISZKUSSZIÓ

8.1. Az iontranszporterek szerepe a metapláziás nyelőcső sejtekben az epesav okozta sérülés elleni védekezésben

A GORB során a nyelőcső nyálkahártyája a regurgitált gyomortartalomban található anyagok károsító hatásainak van kitéve, melyek kivédésére különböző védekező mechanizmusok léteznek. A nyelőcső hámsejtjein található ion transzporterek a védelmi rendszer fontos elemét képezik, mivel alapvetően hozzájárulnak az ozmotikus egyensúly, illetve a pH_i fenntartásához, melyek elengedhetetlenek a sejtek normális működéséhez. Feltételezéseink szerint ezen transzporterek megváltozott működése szerepet játszhat a szövődmények (például a Barrett-nyelőcső) kialakulásában.

Kísérleteink során a metaplasztikusan átalakult Barrett-nyelőcső sejtvonalakon (CP-A és CP-D) három olyan ion transzportert sikerült funkcionálisan azonosítanunk, amik a nyelőcső sejtek pH_i regulációjában intenzíven részt vesznek: az NHE-t, az NBC-t és a CBE-t. Az NHE izoformák azonosításához, az NHE specifikus inhibitor, HOE-642-t alkalmaztuk, és megállapítottuk, hogy a metaplasztikus epitél sejteken az NHE-1 és NHE-2 a funkcionálisan aktív izoformák, amik közül az NHE-1 az aktívabb. Ez az eredmény összhangban van Goldman és mtsai. által tett megfigyeléssel, akik szintén az NHE-1-et írták le az aktívabban működő izoformának.

További kísérleteink során kimutattuk, hogy a különböző koncentrációban alkalmazott epesav koktél dózis-függő Ca^{2+} -emelkedést hoz létre, ami sokkal kifejezettebb volt savas pH-n. Ez a jelenség az epesavak ionofór tulajdonságával magyarázható, ugyanis savas körülmények között a refluxátumban található epesavak legnagyobb része nem-ionizált formában van jelen, ami által könnyebben penetrálnak a sejtmembránon és eredményeznek sejtkárosodást. Az $(Ca^{2+})_i$ szint emelkedésének forrását vizsgálva a sejteket különböző Ca^{2+} raktárakat gátló inhibitorokkal kezeltük. Az ER IP_3 receptorát blokkoló koffein teljesen kivédte a Ca^{2+} -szignált, ha a sejteket Ca^{2+} -mentes oldattal perfundáltuk. Az epesavak hatására megemelkedett, IP_3 -mediált Ca^{2+} -szignált korábban kolon kriptákban, hepatocitákban és pancreas epitél sejtekben írták le. A membránon lévő Ca^{2+} -csatorna blokkoló, Gd^{3+} -jelenlétében csökkent Ca^{2+} -szignált tapasztaltunk, ami arra enged következtetni, hogy az intracelluláris raktárak mellett a $(Ca^{2+})_i$ szignál részben az extracelluláris térből is származik.

A következő kísérlet sorozatban azt vizsgáltuk, hogy az epesavak hogyan befolyásolják a különböző ion transzporterek aktivitását. Standard Hepes oldatban az epesavak dózis-függően

gátolták az NHE aktivitását CP-A sejtekben, és ez a hatás 77%-ban az NHE-1 gátló hatásán keresztül valósult meg. Ezzel szemben CP-D sejtekben az epesavas koktél stimulálta az NHE-1 működését. Ennek a jelenségnek a pontos hátterét egyelőre nem ismerjük, azonban összefüggésben lehet a CP-D sejt vonal diszpláziás, azaz patológiásan előrehaladottabb voltával. HCO_3^- tartalmú oldatban mindkét sejt vonalban azt tapasztaltuk, hogy az epesavas terhelés egyaránt stimulálta az NBC és a CBE működését. Valószínűsíthető, hogy ez egy védekező mechanizmus a sejtek részéről, amelynek során fokozott HCO_3^- termeléssel próbálják kompenzálni a megemelkedett lúminális savterhelést.

Az epesavak szerepének tanulmányozására a sejt szintű adaptációban először a CP-A és CP-D sejteket egy héten keresztül epesav koktéllal kezeltük. CP-A sejtekben az összes vizsgált ion transzporter szintje szignifikánsan megnövekedett a nem kezelt, kontrollhoz képest. CP-D-ben csak az NHE-1 és NBC mRNS szintjében tapasztaltunk változást. Ugyanazon protokoll alapján savas körülmények között csak az NHE-1 mRNS expresszióban tapasztaltunk szignifikáns növekedést. Fehérje szinten az NHE-1 mind savas mind neutrális körülmények között megnövekedett expressziót mutatott, mindkét sejt vonalban. Az epesavak krónikus hatásainak további elemzése céljából normál, illetve Barrett-epitéliumból vett biopsziás mintákon megvizsgáltuk az NHE-1, NHE-2, NBC és Slc26a6 transzporterek kifejeződését. A BO nemzetközileg eltérő definíciói miatt külön vizsgáltuk az intesztinális és a nem-intesztinális metapláziát. A BO mintákban az összes vizsgált transzporter mRNS szintjében növekedést tapasztaltunk, intesztinális és nem-intesztinális típusú metapláziákban egyaránt. Az NHE-1 és az NHE-2 erősebben festődött a sejt membránon a BO mintákban a laphámhoz képest, megerősítve a qPCR-ral kapott eredményeket. Az NHE-1 fokozott expressziója alátámasztja Goldman és *mtsai* korábbi megfigyeléseit, akik szintén az NHE-1 emelkedett szintjét írta le BO mintákban. Mindenezen eredmények arra utalnak, hogy az ion transzporterek fokozott expressziója egy védekező mechanizmus lehet a sejtek részéről a krónikus sav expozíció kompenzálására.

8.2. Az autofágia szerepe a Barrett-nyelőcső patogenezisében

A tézis második felében az autofágiának a BO patofiziológiájában betöltött szerepét vizsgáltuk. Jelen tanulmányban igyekeztünk feltárni az autofágia funkcionális szerepét STR (normál laphám), CP-A (metapláziás, nem-diszpláziás), CP-D (metapláziás, diszpláziás) illetve OE19 (adenokarcinóma) sejt vonalakon. Az autofágia blokkolása CQ-val szignifikánsan

megnövelte az intracelulláris reaktív oxigéngyök szintet a diszplázia jeleit még nem mutata, STR es CP-A sejtvonalakban. Ez a megfigyelés összhangban van korábbi tanulmányokkal, amik kimutatták az autofágia reaktív oxigéngyök szintet csökkentő szerepét. A patológiás elváltozásokat mutató CP-D es OE19 sejtekben ez a jelenség nem volt tapasztalható, azt sugallva, hogy ezen sejttípusok más mechanizmust használnak az oxidatív stressz csökkentésére. Megfigyeltük azt is, hogy az autofágia esszenciális szerepet tölt be a sejtek életben maradásában, refluxot utánzó savas expozíciót követően. Mivel várakozásainkkal ellentétben a hagyományosan alkalmazott módszerünkkel az autofágia szintjében csökkenést tapasztaltunk savas illetve kombinált kezelést követően, a kísérletet megismételtük egy másik módszerrel, a GFP-fúziós LC3 riporter vizsgálatával, aminek segítségével az autofagoszóma képződést tudjuk nyomon követni. Ezzel a módszerrel az autofagoszómák fokozott képződését tapasztaltuk. Bár jelen tanulmányban nem találtunk egyértelmű magyarázatot erre a jelenségre, mégis ezen eredmények arra utalhatnak, hogy a diszplázias sejtekben az autofagoszómák biokémiája eltérő lehet a normális sejtektől, ami miatt bizonyos módszerek téves eredményt adhatnak. Ezen jelenség mélyebb felderítése új és izgalmas területe lehet a kutatásoknak a továbbiakban.

8.3. A nyelőcsőgyulladás organotipikus modellezése

A GORB és szövődményeinek a kutatását nagyban megnehezíti a fiziológiásan releváns modellek hiánya. Az eddigi gyakorlatban használt *in vitro* és *in vivo* módszerek limitációi inspirálták a 3D-s OTC kifejlesztését, ami egy olyan multicelluláris *in vitro* rendszer, amiben az epitél sejtek *in vivo* körülmények közt tapasztalhatóhoz hasonlóan képesek növekedni és differenciálódni.

A tézis harmadik részében az eredeti OTC protokollt fejlesztettük tovább, hogy a nyelőcsőgyulladásos folyamatait modellezni tudjuk. Bebizonyítottuk, hogy az OTC képes az immunsejtek életben tartására, illetve megfelelő pro-inflammatorikus citokinek segítségével aktiválni is lehet őket. Igazoltuk azt is, hogy a gyulladásos mikrokörnyezet morfológiai változásokat (hiperplázia, fokozott proliferáció, hiperkeratinizáció) hozott létre az epitél rétegben, míg szuprabazális rétegben a sejtek fokozott apoptotikus aktivitását észleltük. E megfigyelések összhangban vannak korábbi *in vitro* es *ex vivo* tanulmányokkal, amelyek hasonló elváltozásokat írtak le a nyelőcső epitél rétegében gyulladásos körülmények között.

9. KÖVETKEZTÉSEK ÉS ÚJ EREDMÉNYEK

- A tézis első felében megvizsgáltuk az ion transzporterek szerepét metaplasztikusan átalakult nyelőcső sejtekben illetve szövettani mintákban. Eredményeinkkel alátámasztjuk azon feltételezést, miszerint a BO egy adaptív mechanizmus a sejtek részéről a fokozott savterhelés kompenzálására. Úgy gondoljuk, hogy ezen transzporterek aktiválása a jövőben egy fontos terápiás célpont lehet a későbbi szövődmények elkerülése céljából.
- A dolgozat második felében kimutattuk, hogy a savas refluxot utánzó stimulus a nem diszpláziás sejtekben alapvető szerepet játszik az oxidatív stressz csökkentésében. Igazoltuk továbbá, hogy az autofágia elengedhetetlen a sejtek életben maradásához mind rákosan elfajult, mind normál morfológiájú sejtekben, savas terhelést követően.
- Végül kimutattuk, hogy az OTC rendszer alkalmas eszköz a nyelőcső gyulladós folyamatainak tanulmányozására és elősegítheti a GORB és a BO sejtszintű patofiziológiai tényezőinek megismerését. Ezáltal fény derülhet a metaplázia – diszplázia – karcinóma szekvencia további, eddig ismeretlen tényezőire is.

10.KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani a munkámban közreműködő és segítséget nyújtó személyeknek.

Hálával tartozom **Prof. Dr. Varró Andrásnak**, a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet vezetőjének, valamint **Prof. Dr. Ábrahám Györgynek** és **Prof. Dr. Wittmann Tibornak**, az I.sz. Belgyógyászati Klinika jelenlegi és korábbi tanszékvezetőinek, hogy lehetőséget kaptam arra, hogy az általuk igazgatott intézetekben dolgozhassak.

Köszönöm témavezetőimnek, **Dr. Venglovecz Viktóriának** és **Dr. Rosztóczy Andrásnak** a PhD munkám során nyújtott segítségüket.

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Hegyi Péternek** és **Prof. Dr. ifj. Rakonczay Zoltánnak**, hogy lehetőséget biztosítottak kutatómunkám elvégzéséhez a laboratóriumukban és konstruktív tanácsaikkal segítették azt.

Továbbá szeretném megköszönni kollégáimnak **Dr. Katona Máténak**, **Dr. Tóth Krisztinának**, **Dr. Balázs Anitának**, **Balla Zsoltnak**, **Dr. Kui Balázsnak**, **Dr. Kormányos Eszternek**, **Madácsy Tamarának**, **Dr. Maléth Józsefnek**, **Dr. Pallagi Petrának** és **Dr. Végh Eszternek** a sok segítséget, jókedvet és törődést, amit tőlük kaptam. Ez a munka nem jöhetett volna létre kiváló asszisztensek nélkül, ezért köszönettel tartozom **Pritz Tündének**, **Árva Miklósnénak**, **Fritz Reának**, és **Magyarné Pálfi Editnek** és az **Endoszkópos Labor asszisztenseinek**. Külön szeretném köszönetemet kifejezni **Fuksz Zoltánnénak**, aki precíz munkájával elősegítette kísérleteim sikerességét és akinek a segítségére mindig számíthattam.

Hálával tartozom továbbá **Dr. John P. Lynch**-nek a University of Pennsylvania-ról, aki kiváló mentorom volt a laborjában töltött idő alatt.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni **Szüleimnek** és **Pardi Norbertnek** a szeretetüket, támogatásukat és soha el nem fogyó türelmüket. Nekik szeretném ajánlani ezt a tézist.

Kutatásunkat a Nemzeti Fejlesztési Ügynökség (TÁMOP-4.2.2.A- 11/1/KONV-2012-0035, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0073, TÁMOP-4.2.2- 11/1/KONV-2012-0052), az NCI BETRNet program és a **Rosztóczy alapítvány** pályázatai támogatták.