

<b>Lázár György OTKA K-73141 zárójelentés</b> <b>A Barrett nyelőcső klinikai és kísérletes vizsgálata</b>
--

**2008-04-01 - 2011-06-30**

## **I. Barrett nyelőcső miatt antireflux műtéten átesett betegek klinikai vizsgálata**

A Barrett-oesophagus (BE) egy premalignus állapot, amely metaplasiából low-grade dysplasián (LGD) keresztül high-grade dysplasiához (HGD) végül invazív nyelőcső adenocarcinoma kialakulásáig vezethet. A BE adenocarcinomává való transzformációjának becsült éves rizikója 0,2 % és 2 % között változik, mely 30 ill. 120-szor gyakoribb, mint a hasonló korú átlag népességnek .

A BE szoros pathophysiológiai összefüggésben áll a gastro-oesophagalis reflux betegséggel (GERB): A GERB-es betegek 15-20 %-ában BE mutatható ki és BE általában súlyos GERB-bel jár együtt. A BE incidenciája az elmúlt 20 évben nagymértékben megnőtt, ez összefüggésbe hozható azzal, hogy az elmúlt évtizedben a nyelőcső adenocarcinoma megjelenése is tízszeresére növekedett. Mindezek az adatok rávilágítanak a BE megfelelő kezelésének szükségességére.

A BE terápiájának célja az, hogy kontrolláljuk és kezeljük a kapcsolódó gyulladós tüneteket, és megakadályozzuk az esetleges dysplasia és adenocarcinoma kialakulását. A kezelési lehetőségek az életen át tartó gyógyszeres terápia (protonpumpa gátló kezelés) vagy az antireflux műtét, melyek közül az egyik legelfogadottabb a kis morbiditással járó laparoscopos antireflux Nissen műtét. Habár mindkét módszer egyaránt alkalmas a tünetek megszüntetésére, klinikai vizsgálatok azt találták, hogy a megfelelő sebészi beavatkozás a társuló gyulladós elváltozásokat nagyobb mértékben csökkenti. A BE adenocarcinomává történő progresszióját is nagyobb mértékben akadályozza meg a műtéti kezelés. A laparoscopiás antireflux műtét általánosan elfogadott módszer a GERB és a BE kezelésében, kivételt jelent ez alól a HGD. Vizsgálatunk célja az volt, hogy retrospektív módon megvizsgáljuk a Nissen féle funduplicatio hatékonyságát Barrett nyelőcső miatt operált betegeken. Felmérni kívántuk az antireflux műtét hatását a reflux betegség klinikai tüneteire valamint a Barrett nyelőcső pathológiai megjelenésének változásaira (progresszió, regresszió). Tudomásunk szerint Magyarországon hasonló jellegű hosszútávú vizsgálat még nem történt.

## Betegek, módszerek

Intézetünkben 2001 és 2008 között 78 betegnél történt laparoscopos Nissen funduplicatio tüneteket okozó GERB és BE miatt. A 40 férfi és 38 nő esetében az átlagéletkor 53 év volt (24-78 év között). Az átlagos BMI  $28.3 \pm 5.4$  (19.8-37) volt. Mindegyik betegnél korábban sikertelen PPI (proton-pumpa gátló) kezelés történt (nem múló refluxos tünetek és BM) átlagosan  $20 \pm 2.73$  hónapon át (7 hónaptól - 14 évig). Az átlagos időtartam a tünetek jelentkezésétől a gyógyszeres kezelés kezdetéig  $65 \pm 4.67$  hónap volt (8 hónaptól - 20 évig). Hiatus hernia 50 esetben állt fenn, átlagos nagysága  $3.93 \pm 1.95$  (2-8 között) cm volt.

A preoperatív endoszkópos biopsziák szövettani eredménye alapján a betegeket három csoportra osztottuk: non intestinalis típusú csoport (NI, 63 beteg) fundus (FM) vagy cardia (CM) metaplasziával; intestinális csoport (I, 18 beteg) intestinális metaplasziával (IM); illetve dysplasiás csoport (D, 7 beteg), akiknél LGD állt fenn. A BE 67 esetben (85,9 %) rövid szegmentumot érintett (short segment, < 3 cm, SSBE), 11 esetben (14,1%) hosszú szakaszt érintett (long segment >3 cm, LSBE).

## Tünetek értékelése, az eredmények objektív mérése

A korai posztoperatív időszakban funkcionális tesztek végeztünk (nyelőcső manometria, 24 órás pH mérés illetve Bilitec vizsgálat) átlagosan a műtétet követő  $16.7 \pm 17.00$  hónapig. A késői posztoperatív időszakban további endoszkópos vizsgálat történt a BE-ben létrejött változás ellenőrzésére. Az átlagos teljes utánkövetési idő  $42 \pm 16.19$  hónap volt (3-61 hónapig).

A három csoport pre- és posztoperatív vizsgálati eredményeit hasonlítottuk össze keresve a lehetséges rizikó faktorokat, melyek befolyásolják a BE malignus átalakulását. A laparoscopos műtét hatékonyságát a BM ill. LGD szövettani regressziójával vagy progressziójával, az alsó nyelőcső sphincter (LES) funkciójának, illetve a 24 órás pH mérés és Bilitec vizsgálat eredményeinek változása alapján értékeltük.

## Eredmények

### Beteganyag preoperatív adatai

A vártakkal ellentétben IM és LGD esetében nem állt fent hosszabb refluxos anamnézis mint az NI csoportban, míg az NI csoportba tartozó betegek panaszai korábban kezdődtek, mint az I csoportba tartozóknak ( $P=0,057$ ). A gyógyszeres kezelés hosszában sem volt különbség a csoportok között. Bár mindhárom csoportba tartozó betegek túlsúlyosak voltak, az átlagos BMI értékek sem különböztek. A hiatus hernia egyenlő incidenciával fordult elő a súlyosabb BM és LGD eseteiben, de ezek az értékek nem voltak szignifikánsan nagyobbak az NI csoportban mértnél. A LES funkciójában (nyomás, relaxációs idő és hossz) sem találtunk statisztikai különbséget a három csoport között. Szakirodalmi adatokkal egyezően, korai vizsgálati eredményeink alapján mi is úgy találtuk, hogy a BE-s betegek esetében súlyosabb savas reflux állt fent, mint kevésbé súlyos csak GERD-es betegek esetében. A vizsgált DeMeester pontszámok azonban nem különböztek szignifikánsan a három csoport esetében. A Bilitec vizsgálat eredményei alapján elmondható, hogy súlyosabb epés refluxot észleltünk a LGD csoportban a másik két csoporttal szemben. Univariancia analízis eredményeivel ellentétben az adatok multivariancia analízise nem mutatott szignifikáns különbséget a három csoport között.

### Operatív illetve korai posztoperatív eredmények

Az átlagos műtéti idő  $99 \pm 67,40$  perc volt. Egy betegnél került sor konverzióra (1,3 %). Nem volt major intraoperatív komplikációnk vagy halálozásunk. A kórházban töltött napok száma átlagosan  $3 \pm 1$  nap volt.

### Korai posztoperatív eredmények

#### Tünetek

A reflux betegség tüneteit mérő Visick score alapján a betegek 81 %-ában csökkentek vagy megszűntek a korábbi panaszok, változatlanok maradtak az esetek 15 %-ában, míg 4 %-ában rosszabbodtak. A Visick score eredmények a csoportok között különbözőek voltak, az intestinális BM és az LGD csoportokban relatíve nagyobb mértékben csökkentek a panaszok,

mint az NI metaplasziás csoportban. Az objektív illetve szubjektív panaszok vizsgálata alapján elmondható, hogy a fundoplicatiót követően az operációt megelőző tünetek csökkentek.

A dysphagia mértéke, várákosainknak megfelelően, növekedett.

Posztoperatív funkcionális vizsgálatok (manometria, 24 órás pH monitorozás, Bilitec)

A posztoperatív manometria, pHmetria és Bilitec mérések eredményei nem mutattak szignifikáns különbséget a három csoport között. A LES működésében történő változások alapján, amelyek ugyancsak a műtét hatékonyságának jelzői, elmondható, hogy a LES nyomás a műtét után a preoperatív adatokhoz képest szignifikánsan növekedett mindhárom csoportban, míg a relaxációs idő nem változott. A műtési technika következtében (laza Nissen floppy fundoplicatio) a sphincter hossza nem módosult, míg a funkciója (nyomása) helyreállt, így akadályozva meg a refluxot. Ezt a három csoport esetében a műtét előtti és utáni pHmetriai adatok összehasonlítása is megerősíti, hiszen az átlagos DeMeester értékek egyértelműen csökkentek a műtét után. Az epés reflux gyakorisága és súlyossága szintén csökkent a műtét után. A multivariancia analízis azonban csak a LES nyomás értékek és a pHmetria adatok esetén talált szignifikáns különbséget a műtét előtti és utáni csoportok között.

Endoscopos utánkövetés

Átlagosan  $42 \pm 16,19$  hónapig történt a betegek endoszkópos követése. Posztoperatív endoscopia 64 betegnél történt (82 %, 64/78). A 14 beteget, akik nem vettek részt a posztoperatív endoscopos kontrollon, kizártuk a hosszútávú analízisből.

Az antireflux műtétet megelőzően 56 betegnél SSBE, míg 8 betegnél LSBE állt fent. A preoperatív szövettani vizsgálat FM-et 11 esetben, CM-et 33, IM-et 15, LGD-t 5 esetben írt le. A posztoperatív szövettani vizsgálat a BM teljes regresszióját igazolta 10 betegnél (15, 6 %). Részleges regresszió volt 9 esetben (14, 1 %), további progresszió nem történt 34 betegnél (53,1 %). FM-ből CM-be való progressziót 4 betegnél (6,2 %), míg CM-ből IM-be történő progressziót 7 betegnél (11 %) találtak. Nem volt malignus transzformáció vagy újabb dysplasia kialakulása. Az LGD-s betegek esetében további progressziót nem észleltünk és 5 beteg közül 3 esetben az LGD helyett már csak reziduális IM volt megfigyelhető.

## Megbeszélés

Eredményeink azt mutatják, hogy a laparoscopos antireflux műtét a BE-s, súlyos reflux betegeknél alacsony morbiditású beavatkozás, mely megszünteti, vagy mérsékli a betegek panaszait és a betegség (BM) regresszióját idézheti elő.

Funkcionális vizsgálataink azt igazolják, hogy a jól kivitelezett laparoscopiás beavatkozás hatékonyan visszaállítja a gastro-oesophagealis junctio szerepét és csökkenti, vagy megszünteti a savas és epés refluxot. A hosszútávú endoszkópos és hisztológiai utánkövetés során az esetek 30 %-ában volt regresszió, 53 %-ában nem történt változás, és progresszió csupán 17 %-ban fordult elő, utóbbiak mind az NI csoportba tartoztak. Dysplasia nem fordult elő az I. csoportban, további progresszió (HGD vagy in situ carcinoma) nem alakult ki az LGD csoportban.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a laparoscopiás Nissen féle fundoplicatio jó terápiás választás BE-s betegek esetében. Technikailag megfelelő antireflux műtét sikertelen gyógyszeres kezelés után tünetmentes állapotot biztosít a betegek nagy részében és a BM regressziójához vezet. Ahhoz, hogy bebizonyíthassuk, hogy a laparoscopiás Nissen fundoplicatio hosszú távon megállíthatja a BE adenocarcinomává történő transzformációját, illetve a carcinogenesis sebességét csökkentheti, további rendszeres endoszkopiás utánkövetéses és funkcionális vizsgálatok szükségesek.

Eredményeink közlés alatt vannak.

## **II. In vivo állatkísérletes vizsgálataink**

A reflux betegséget szimuláló állatkísérletes modellt sikerült beállítani. A vizsgálatok során 22-35 g közötti súlyú CFLP hím egereken Ketamin-Xylazin által végzett IP narcosisban mikrosebészeti módszerekkel oesophago-jejunostomiát végeztünk. Az állatokat 20-24 hétig követjük, ezt követően öljük le. Az első vizsgálati eredményeink kiértékelése folyamatban van.

### III. In vitro vizsgálatok

A projektben célul tűztük ki egy olyan kísérleti rendszer kidolgozását, amely alkalmas a humán nyelőcső epitél sejtek iontranszport folyamatainak (elsősorban a savasodást gátló mechanizmusok ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$  kicserélő (NHE) és a  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  kicserélő (AE)) karakterizálására valamint az egyes toxikus ágensek (epesav, sósav) nyelőcső epitél sejtekre kifejtett hatásának a vizsgálatára.

Ehhez egyrészt célunk volt (1) egy olyan sejtizolálási módszer kifejlesztése, amely lehetővé teszi a humán nyelőcső biopsziákból történő „basal” illetve „squamous” epitél sejtek izolálását; másrészt terveink közt szerepelt, hogy az iontranszport folyamatokat (2) humán nyelőcső sejtvonalon is megvizsgáljuk és a kapott eredményeket összevessük az izolált sejteknél kapott eredményekkel.

1. A nyelőcső epitél sejtek vizsgálatára alkalmas kísérleti rendszer kidolgozása:

**1.a. Nyelőcső epitél sejtek izolálása biopsziából enzimatis módszerrel.** A sejtizolálási technika során a biopsziás mintákat (4-5 db) jéghideg HBSS oldatban mostuk kétszer. Ezt követően kollagenáz A-t (1000 U/mL) illetve elastase-t (50 U/mL) tartalmazó MCDB153 komplett médiumban inkubáltuk 1.5-2 órán keresztül 37°C-os rázó vízfürdőben. Az enzimatis emésztést követően az epitél sejteket fénymikroszkóp alatt, mikrodisszekciós technikával izoláltuk (fig. 1) és az így kinyert sejteket közvetlen felhasználtuk a kísérleteinkhez.



Fig. 1. Humán nyelőcső biopsziából enzimatis módszerrel izolált epitél sejtek. Az izolálást követően a sejtek egy sejtrétegű 10-15 sejtől álló csoportokban helyezkedtek el.

### **1.b. Nyelőcső epitél sejtek izolálása biopsziából homogenizátor felhasználásával.**

A biopsziás mintákat (4-5 db) jéghideg HBSS oldatban mostuk kétszer. Ezt követően MCDB153 komplett médiumban homogenizáltuk dounce homogenizátor segítségével. 5-10 nyomás hatására a biopsziák néhány sejtből álló sejtcsoportokra estek szét.

### **1.c. Nyelőcső epitél sejtek izolálása kefebiopsziából.**

A nyelőcső kefebiopszia során kinyert sejteket jéghideg MCDB-153 komplett médiumban mostuk majd a kísérleteinkhez közvetlenül felhasználtuk.

A három módszer (1.a-c) közül az enzimatis emésztést követő izolálás bizonyult a legeredményesebbnek, ezért a funkcionális mérések során az 1.a izolálási eljárást alkalmaztuk.

## **2. Humán biopsziából enzimatis módszerrel izolált nyelőcső epitél sejtek karakterizálása mikrofluorimetriás rendszerrel**

A sejtek intracelluláris pH-jában ( $pH_i$ ) bekövetkező változások detektálásához egy pH-érzékeny fluorescens festéket, BCECF-AM-et használtunk. Kísérleteink során a biopsziából izolált epitél sejteket sejtragasztó segítségével egy üveglemezhez rögzítettük, mely egy perfúziós kamra alját képezte. A sejteket ezt követően 30 percen keresztül töltöttük BCECF-AM-mel szobahőn, majd a  $pH_i$  bekövetkező változásokat Cell R képalkotó rendszer segítségével vizsgáltuk. Első lépésben megvizsgáltuk a sejtek kezdő  $pH_i$  értékét a magas  $K^+$ /nigericin technika felhasználásával. Kísérleteink azt mutatták, hogy a nyelőcső epitél sejtek nyugalmi  $pH_i$  értéke  $7.36 \pm 0.004$  bizonyult. (fig. 2A)

Ezt követően a nem-konjugált kenodezoxikólsav (CDC) hatását vizsgáltuk az epitél sejtek  $pH_i$  változására. Azt kaptuk, hogy 1 mM CDC hatására a  $pH_i$  jelentősen lecsökkent, amely az epesav elvonását követően teljes mértékben regenerálódott. (fig. 2B) Ezzel szemben, a CDC glicinnel konjugált formája, a glikokenodezoxikólsav (GCDC) adására nem tapasztaltunk változást a  $pH_i$ -ben, ami azt sugallja, hogy a nyelőcső epitél sejtek felszínén nem találhatóak epesav transzporterek.

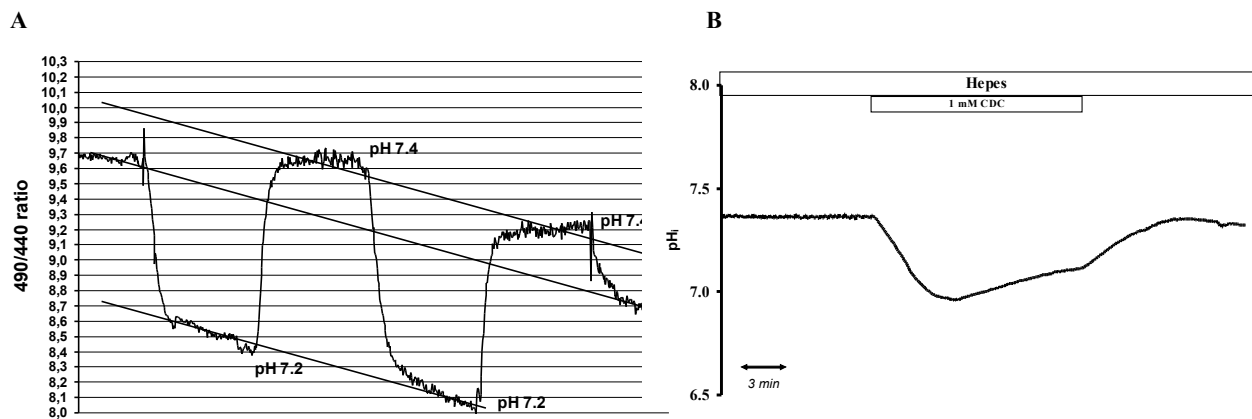


Fig. 2. Humán nyelőcső biopsziából izolált epitél sejtek karakterizálása. A. nyelőcső epitél sejtek nyugalmi pH értékének meghatározása a magas  $K^+$ /Nigericin technika felhasználásával. B. 1 mM CDC reverzibilis pH csökkenést indukált a sejtekben.

### 3. CRL-4027 nyelőcső epitél sejt vonal karakterizálása mikrofluorimetriás módszerrel

A CRL-4027 sejt vonal nem-diszpláziás metapláziából izolált humán nyelőcső epitél sejt vonal, melyet pLSN-TERT retrovírust expresszáló vektorral immortalizáltak.

A mikrofluorimetriás módszer felhasználásával megvizsgáltuk a sejtek iontranszporter aktivitását. A funkcionális mérések azt mutatták, hogy a nátrium elvonása a külső Hepes oldatból jelentős  $pH_i$  csökkenést okozott a sejtekben, amely a nátrium visszaadásával teljes mértékben regenerálódott. (fig. 3A) Ezen eredmény arra utal, hogy a CRL-4027 sejtek NHE aktivitással rendelkeznek. A sejtek NHE aktivitását egy másik módszerrel, alkali load technikával is tanulmányoztuk. Ennek során a sejteket 20 mM  $NH_4Cl$  oldattal 3 percig inkubáltuk Hepes oldatban, majd az  $NH_4Cl$  elvonását követően vizsgáltuk az acidózisból történő regeneráció mértékét. Nátrium-mentes Hepes oldatban a  $NH_4Cl$  elvonását követő  $pH_i$  csökkenés jóval nagyobb volt a normál Hepes oldathoz képest. (fig. 3B) Ezenkívül nátrium hiányában a  $pH_i$  nem regenerálódott acidózisból, amely az NHE aktivitásának gátlásával magyarázható.



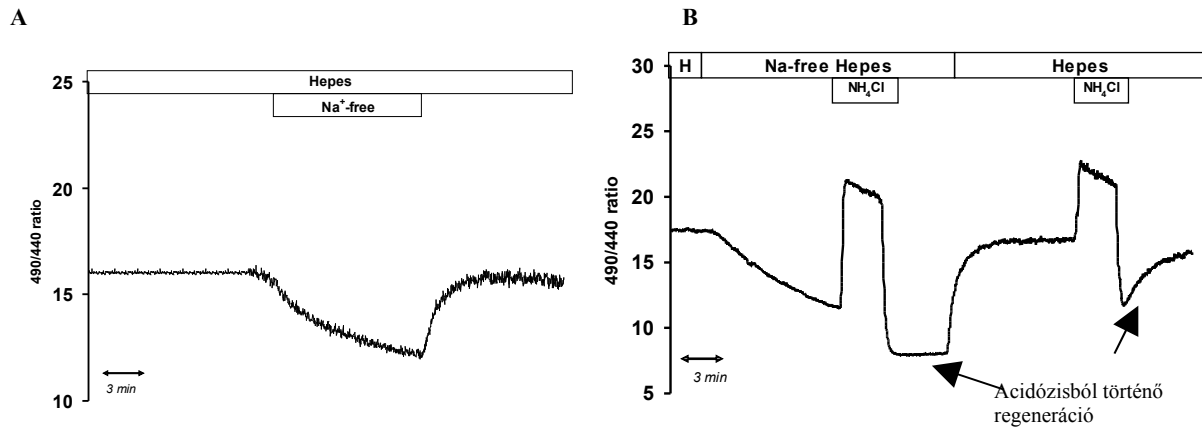


Fig. 3. CRL-4027 sejtek funkcionális karakterizálása. A. A nátrium elvonása az extracellulár oldatból gyors pH csökkenést okozott a sejtekben. B. A sejteket 20 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  oldattal 3 percig inkubáltuk majd az  $\text{NH}_4\text{Cl}$  elvonását követően vizsgáltuk az acidózisból történő regenerációt. A nátrium elvonása az extracellulár oldatból teljes mértékben gátolta az acidózisból történő regenerációt, mely a nátrium visszaadásával helyreállt.

#### 4. Epessav terhelés vizsgálata nyelőcső sejtvonalon.

A karakterizálást követően a nem-konjugált kenodezoxikólsav (CDC) hatását vizsgáltuk az epitel sejtek  $\text{pH}_i$  változására. Azt kaptuk, hogy 1 mM CDC hatására a  $\text{pH}_i$  jelentősen lecsökkent, amely az epessav elvonását követően teljes mértékben regenerálódott. Ezzel szemben, a CDC glicinnel konjugált formája, a glikokenodezoxikólsav (GCDC) lényegesen kisebb  $\text{pH}_i$  változást váltott ki, ami azt sugallja, hogy a nyelőcső epitel sejtek felszínén kis mennyiségű epessav transzporter található.

A következő évben szeretnénk megvizsgálni a nyelőcső epitel sejteken elhelyezkedő iontranszportereket illetve az epessavak valamint sósav egyes iontranszporterekre kifejtett hatását mind a normál mind pedig a gyulladásos nyelőcsőből vett minták esetén. Ezen kísérletsorozattal azon transzportereket szeretnénk karakterizálni, amelyek egy esetleges savas reflux esetén megakadályozzák a sejten belüli pH drasztikus lecsökkenését ezáltal alapvető védekező mechanizmust jelentenek.