

**ÚJ PATOFIZIOLÓGIAI FAKTOROK ÉS DIAGNOSZTIKAI
MARKER AZ ORGANIKUS ÉS FUNKCIONÁLIS
BÉLBETEGSÉGEKBEN**

Ph.D. értekezés tézisei

Dr. Inczeffi Orsolya

Szegedi Tudományegyetem
I. Belgyógyászati Klinika
Szeged

2020

A doktori értekezés alapját képző közlemények listája

- I. **Inczeffi O**, Bacquié V, Olier-Pierre M, Rincel M, Ringot-Destrez B, Ellero-Simatos S, Eutamène H, Bétoulières C, Thomas J, Laine J, Gros L, Lévêque M, Leonard R, Harkat C, Robbe-Masselot C, Roka R, Mercier-Bonin M, Theodorou V, Darnaudéry M, Turner JR, Ferrier L.: Targeted intestinal tight junction hyperpermeability alters the microbiome, behavior, and visceromotor responses. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2020 Mar 5 [Epub ahead of print]
D1
- II. Annaházi A, Molnár T, Farkas K, Rosztóczy A, Izbéki F, Gecse K, **Inczeffi O**, Nagy F, Földesi I, Szűcs M, Dabek M, Ferrier L, Theodorou V, Bueno L, Wittmann T, Róka R.: Fecal MMP-9: a new noninvasive differential diagnostic and activity marker in ulcerative colitis *Inflamm Bowel Dis*. 2013 Feb;19(2):316-20.
IF: 5.475, D1
- III. Annaházi A, Ábrahám S, Farkas K, Rosztóczy A, **Inczeffi O**, Földesi I, Szűcs M, Rutka M, Theodorou V, Eutamene H, Bueno L, Lázár G, Wittmann T, Molnár T, Róka R.: A pilot study on faecal MMP-9: a new noninvasive diagnostic marker of colorectal cancer *Br J Cancer*. 2016 Mar 29;114(7):787-92.
IF: 6.176, D1

A doktori értekezés alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: **11,651**

A doktori értekezés alapját nem képező publikációk listája

- I. Bálint L, Tiszai A, Kozák G, Dóczy I, Szekeres V, **Inczeffi O**, Ollé G, Helle K, Róka R, Rosztóczy A. Epidemiologic characteristics of *Helicobacter pylori* infection in southeast Hungary *World J Gastroenterol*. 2019 Nov 14;25(42):6365-6372.
IF²⁰¹⁸: 3,411, Q1

- II. Annaházi A, Ferrier L, Bézirard V, Lévêque M, Eutamène H, Ait-Belgnaoui A, Coëffier M, Ducrotté P, Róka R, **Inczeffi O**, Gecse K, Rosztóczy A, Molnár T, Ringel-Kulka T, Ringel Y, Piche T, Theodorou V, Wittmann T, Bueno L. Luminal cysteine-proteases degrade colonic tight junction structure and are responsible for abdominal pain in constipation-predominant IBS. *Am J Gastroenterol.* 2013 Aug;108(8):1322-31.

IF: 9.213, D1

Az összes közlemény összesített impakt faktora: 24,275

1. BEVEZETÉS

Állatkísérletek

Az irritábilis bél szindróma (IBS) funkcionális tápcsatornai kórkép, melynek jellemző tünetei a folyamatos vagy visszatérő hasi fájdalom, a puffadás és a széklethabitus változása. Funkcionális tápcsatornai betegségként a tünetek hátterében organikus eltérés nem igazolható. Napjainkban a földrajzi elhelyezkedéstől függően a népesség 5-20 %-a szenved az IBS tünetei miatt, mely betegszám rendkívül magas direkt és indirekt költségeket ró az egészségügyi ellátásra. A kórkép epidemiológiai szignifikanciája ellenére az IBS patofiziológiája nem teljes mértékben ismert, a betegség aktuális klasszifikációja, a Róma kritériumrendszer a betegek széklethabitusán alapul, így megkülönböztetünk hasmenés (IBS-D), székrekedés (IBS-C) predomináns, kevert (IBS-M) és nem meghatározható széklethabitusú (IBS-M) alcsoportot, illetve a diagnosztikus kritériumoknak megfelelő, ám az előbbi alcsoportokba nem sorolható betegek a nem osztályozható (IBS-U) csoportba kerülnek. A betegség kialakulásának legfontosabb ismert kóroki tényezői az agy-bél tengely eltérései, melyek a fájdalom érzékelés és moduláció zavarait okozzák, a tápcsatornai baktériumflóra megváltozása, mérsékelt immunaktiváció a bélrendszerben, intesztinális motoros diszfunkció és emelkedett bélpermeabilitás. A fentieken túl az IBS betegek fokozott anxietása is karakterisztikus eltérés. A betegség patofiziológiájának pontosabb megértése új terápiás lehetőségek kifejlesztéséhez nyithat utat.

A jelen értekezés az emelkedett bélpermeabilitás kóroki szerepére fókuszál. Stresszt okozó életesemények, tápcsatornai fertőzések és diszbiózis emelkedett bélpermeabilitáshoz

vezethet, mely összefüggést mutat a zsigeri túlérzékenységgel, így a betegek tüneteinek súlyosságával IBS-ben. Állatkísérletes modellben igazolták, hogy a stressz indukált tápcsatornai paracelluláris permeabilitás fokozódás a tight junction fehérjék csökkent expressziójához vezet (occludin, claudinok). Ezek a fehérjék az actinomyosin vezérelt epitheliális citoszkeleton kontrakció kulcs faktorai, mely folyamatban a miozin könnyűlánc kináz foszforilációja (MLCK) fontos szerepet játszik. Azok a transzgenikus egerek, melyekben a miozin könnyűlánc kináz specifikusan csak a bélben folyamatosan aktivált formában van jelen (*CA-MLCKTg*) veleszületetten emelkedett bélpermeabilitással rendelkeznek. Az emelkedett permeabilitás mellett ezekben az állatokban tünetek nélkül a tápcsatornában mérsékelt immunaktiváció van jelen, mely alapján ez a transzgenikus állatmodel ideális lehet az IBS patofiziológiájának vizsgálatára.

Humán vizsgálatok

A colitis ulcerosa (UC) krónikus, relapszusokkal járó gyulladásos bélbetegség (IBD) mely a relapszusok során a vastagbél nyálkahártyájának gyulladása miatt típusosan hasmenéssel jár. A colitis ulcerosa klinikailag kevésbé súlyos eseteiben a hasmenés predomináns IBS betegektől való elkülönítés kihívást jelent, a képet tovább színezi az a tény, hogy a remisszióban lévő IBD-s betegek egy része szenved funkcionális tápcsatornai panaszoktól. Nagy klinikai jelentőséggel bírhat olyan noninvazív diagnosztikai markerek használata, melyek elkülönítik az organikus és funkcionális betegeket, illetve korrelációt mutatnak az IBD betegség aktivitásával és az endoszkópos képpel. A laboratóriumi paraméterek közül a C reaktív protein (CRP) a leginkább vizsgált, ennek diagnosztikai értéke IBD-ben inkább a Crohn betegek (CD) esetén van, UC relapszusában a CRP a betegség kiterjedésétől függően nem, vagy csak mérsékelten emelkedett, a szérum CRP érték meghatározásának szenzitivitása a betegség aktivitásának megítélésére UC

betegekben csak 50-70%. Az IBD-ben létrejövő gyulladásos folyamat során a neutrofil granulociták megjelennek a vastagbél lumenében, az általuk szekretált, úgy, mint a polimorfonukleáris elasztáz, calprotectin és a catepszin-G mennyisége a székletben meghatározhatók. Ezek a mediátorok az UC ígéretes biomarkerei, a széklet calprotectin szint elkülöníti az IBD és IBS betegcsoportot, mindemellett a széklet calprotectin szint az UC aktivitásával is korrelál. A mátrix metalloproteáz (MMP) 1, 2, 3 és 9 szintén a neutrofilokból szabadul fel, korábbi vizsgálatok alapján az MMP-k szintje szignifikánsan emelkedik UC betegek vastagbél biopsziáiban a kontroll egyénekhez képest, mindemellett a betegekben ez az eltérés kifejezettebb az fekélyes bélszakaszon a nem-fekélyes területekhez képest. Az MMP-k közül az MMP-9 jelenléte a legkifejezettebb az UC betegek biopsziáiban. Az MMP-2 és MMP-9 szintje emelkedett UC és CD-s gyermekek vizeletében, mely azt sugallja, hogy az MMP-k az IBD diagnózisában ígéretes biomarkerek lehetnek. Mindezidáig egyetlen vizsgálat sem történt a széklet MMP meghatározás diagnosztikus értékének tisztázására IBD-ben.

A colorektális rák (CRC) a tumoros morbiditás és mortalitás egyik vezető oka a nyugati országokban, a betegség incidenciája emelkedik. Európában a CRC a második leggyakoribb malignus kórkép mindkét nemben. A betegség gyakorisága és az a tény, hogy a kórkép prognózisa jelentős összefüggést mutat a diagnózis időpontjában észlelt betegség kiterjedéssel a CRC szűrőprogramok rendkívüli fontosságát igazolják. A kolonoszkópia a magas specificitásával és szenzitivitásával a szűrés aranystandardja. A beavatkozás költsége, szövődmény rátája és a betegek általi alacsony elfogadottsága azonban az egy lépcsős szűrés hátrányát jelenti. Mindezek miatt a noninvazív vizsgálati lehetőségek rendkívüli fontosságúak a kolonoszkópiát igénylő betegek kiszűrésében. A CRC szűrésre vonatkozó ajánlások országonként különböznek. Az 50 év feletti populációban többnyire évenkénti vagy kétévenkénti széklet okkult vérvizsgálatot javasolnak a pozitív eredmény esetén kolonoszkópiával kiegészítve, vagy 10 évenkénti

vastagbéltükrözést tartalmaznak az ajánlások. Az immunkémia módszert alkalmazó széklet okkult vérteszt során a humán albumin kimutatására használt monoklonális vagy poliklonális antitesteket alkalmaznak, irodalmi adatok alapján az immunkémia módszer szenzitivitása rendkívül változó, 5,4 és 98 % között a felhasznált tesztől függően, a specificitás 77 és 99 % között változik. Az MMP-k Zn^{2+} tartalmú endopeptidázok, melyek számos sejtben szekretálódnak, úgy, mint a tumorsejtek, mezenchimális sejtek, fibroblasztok és különböző gyulladásos sejtek. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy az MMP-9 expressziója emelkedett a kolorektális rákokból vett mintákban és az emelkedés mértéke korrelál a betegség prognózisával. A széklet MMP-9 szintje CRC betegekben mindeközéig nem volt vizsgálva.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A transzgenikus (*CA-MLCKTg*) egereken végzett kísérletekben célul tűztük ki:

- 1) A bélpermeabilitás és a tápcsatornai tranzit vizsgálatát.
- 2) Annak a tisztázását, hogy az emelkedett tápcsatornai permeabilitás hogyan befolyásolja a bél microbiom összetételét
- 3) A mérsékelten emelkedett bélpermeabilitás viselkedésre és a zsigeri érzékenységre kifejtett hatásának felmérését.
- 4) Az emelkedett bélpermeabilitás központi idegrendszerre kifejtett hatásának vizsgálatát.

A humán vizsgálatokban célul tűztük ki:

- 1) Az MMP-9 ELISA Kit validálását széklet MMP-9 mérésére
- 2) A széklet MMP-9 szint meghatározását és összehasonlítását UC, hasmenés predominán IBS (IBS-D) betegekben és kontroll egyénekben

- 3) A széklet MMP-9 szint és a betegség aktivitása közötti összefüggés tisztázását UC betegekben
- 4) A széklet MMP-9 szint diagnosztikai értékének összehasonlítását az UC ismert széklet biomarkerével a calprotectinnel.
- 5) A széklet MMP-9 meghatározását vastagbél daganatos, vastagbél polyppal rendelkező és normál kolonoszkópos eredményű egyéneknél.

3. ESZKÖZÖK ÉS MÓDSZEREK

Állatkísérletek

Az állatkísérleteket *CAMLCKTg* (Tg(Vil-FLAG-CAMLCK)#Jrt, CA-MLCKTG) és vad típusú C57BL/6J egerekben végeztük. Minden vizsgálat 8 hetes életkorban történt. Az in vivo bélpermeabilitás nyelőcsőszonda segítségével beadott FITC-4kDa dextrán vérplazmában történő mérésével határoztuk meg. A jejunum in vitro permeabilitás mérése Ussing kamrában történt. A tápcsatornai tranzit 1 órával nyelőcsőszonda alkalmazásával beadott TRITC-70kDa dextrán fluoreszcenciájának mérésével történt a tápcsatorna 11 egyenlő hosszúságú szakaszán. A bél microbiom analízist 16S rRNA qRTPCR technikával végeztük. Az „Open field test” 50x50 cm arénában a videofelvétel mellett történt. A vizszerális hyperszenzitivitás indikátoraként colorectalis ballondisztenzióra (CRD) kialakult EMG választ detektáltunk a hasfalban rögzített elektródok segítségével. Az állatok egy részében ML-7 vagy naloxone sulfate intraperitoneális előkezelés történt a CRD előtt 1 órával, másik állatcsoportban “water avoidance stress” történt négy napig 1-1 órán át, ebben a csoportban a stressz és a CRD között 30 perc telt el. Az agy

különböző területeiből készült metszeteken C-Fos analízis történt nyúl anti-C-Fos és tormaperoxidáz conjugált antiszérum használatával. A statisztikai analízis kettős t-próbával, kettős Mann-Whitney U teszttel, illetve ANOVA vizsgálattal történt. A microbiom analízishez univariáns analízis történt párhuzamosan, mely összehasonlította minden egyes amplikont t-teszttel, melyet Benjamini-Hochberg teszt követett.

Humán vizsgálatok

Az **UC vizsgálat**ba 24 egészséges kontroll, 47 UC és 23 IBS-D beteg került bevonásra. Az UC betegekben a betegség aktivitásának felmérése parciális és totális Mayo pontrendszer segítségével zajlott. Az UC betegcsoportban az endoszkópia időpontjában vérvétel is történt. A **CRC vizsgálat**ba 109 kolonoszkópiás vizsgálaton átesett beteg került. Az endoszkópos és szövettani eredmény alapján öt alcsoportot képeztünk: negatív kolonoszkópos lelet, diverticulosis, hyperplastikus polyp, adenoma és CRC. A széklet MMP-9 mérés ELISA módszerrel, a széklet calprotectin meghatározás kvantitatív lateral flow assay segítségével történt. A statisztikai analízis során Kruskal-Wallis tesztet, Sperman korrelációs vizsgálatot, illetve ROC analízist alkalmaztunk.

4. EREDMÉNYEK

Állatkísérletek

A transzgenikus egerekben a tápcsatornában folyamatosan aktív MLCK expresszió fokozott intesztinális permeabilitáshoz vezet, miközben a posztnatális növekedés, tápcsatornai tranzit nem változik. A microbiota analízis eltérést igazolt a *CAMLCKTg* egerekben a vad típushoz képest, ebben a csoportban a *Clostridium* speciestek mennyiségében emelkedését, míg a *Bacteroidetes*, *Enterococcus spp.*, and *Prevotella* csökkenését igazoltuk. Az „Open field” teszt során mind a központi részben bejárt távolság aránya, mind a központi részben töltött idő csökkent a *CAMLCKTg* egerekben. Ez nem a csökkent lokomotoros aktivitás következménye, mivel a teljes megtett távolság egyező volt a vad típusú és a *CAMLCKTg* egerekben. A *CAMLCKTg* egerek kifejezett viscerális analgeziát mutattak CRD-ra a vad típushoz képest. A zsigeri érzékenység visszaállítható volt enzimatis MLCK gátlással, “water avoidance” stresszel, vagy naloxon mediált opioid receptor gátlással. A *CAMLCKTg* egerekben C-Fos immunjelölés, mint a neuronális aktivitás indikátora, szignifikánsan emelkedett volt a thalamus paraventriculáris magjában, a hypothalamus paraventricularis magjában és a hippocampusban, míg nem találtunk változást a mediális prefrontalis cortex, nucleus accumbens és az amygdala C-Fos expressziójában a két állatcsoport között.

Humán vizsgálatok

A széklet MMP-9 validációjának vizsgálata bizonyította, hogy a széklet mátrix önmagában nem befolyásolja a mérést, R&D Systems kitje alkalmas az MMP-9 szintjének meghatározására human széklet extraktumból. Az **UC vizsgálat** azt igazolta, hogy az UC betegek székletében az MMP-9 szintje szignifikánsan emelkedett az egészséges és IBS-D csoporthoz képest. Az UC és a másik két csoport közötti elkülönítés küszöbérték értékét 0,245 ng/ml-ben határoztuk meg, ennél az értéknél a mérés szenzitivitása 85,1%-nak, míg a specificitása 99,9%-nak bizonyult. Az UC csoportban a széklet MMP-9 aktivitás szignifikáns korrelációt mutat a Mayo score-ral. A széklet MMP-9 aktivitás szignifikánsan alacsonyabb az inaktív betegekben a közepsúlyos és kifejezett aktivitást mutató betegekhez képest. Kifejezett összefüggés mutatható ki továbbá az MMP-9 érték az endoszkópos aktivitás között. Az aktív és remisszióban lévő UC betegek elkülönítésére meghatározott 2,38 ng/ ml küszöbérték mellett a vizsgálat szenzitivitása 97,1%-nak, míg a specificitása 83,3%-nak bizonyult. Szignifikáns összefüggés volt megfigyelhető a széklet MMP-9 és calprotectin szint között is. A **CRC vizsgálatban** az endoszkóposan negatív és hyperplaziogén polypussal rendelkező betegekben a széklet MMP-9 érték rendkívül alacsony. Az adenomás betegekben mérsékelt, de nem szignifikáns széklet MMP-9 emelkedés figyelhető meg a fenti két csoporthoz képest, míg a CRC betegek székletében szignifikáns széklet MMP-9-szint emelkedés látható. A CRC és kontroll betegek közötti elkülönítésre a 0,23 ng/ml értéket határoztuk meg, ennél az értéknél a vizsgálat szenzitivitása 89,3%-nak, a specificitása 91,2%-nak bizonyult. A hyperplaziogén polypusos betegek a kontrolloktól a széklet MMP-9 meghatározással nem különíthetők el. Az alacsony malignitás rizikójú polypusos betegekben a széklet MMP-9 szint szignifikánsan emelkedett az alacsony rizikójú adenomas csoporthoz képest, azonban az alacsony rizikójú adenomas betegcsoport nem

különíthető el a széklet MMP-9 mérés alapján a kontroll csoporttól. A magas rizikójú illetve CRC betegek kontrolloktól történő elkülönítésére a ROC analízis alapján számított küszöbérték 0,085 ng/ml, ebben az esetben a mérés szenzitivitása 76%, specificitása 85,3%. Ezzel az alacsonyabb küszöbértékkel a magas rizikójú adenomák 59%-a azonosítható. A CRC betegcsoportban nem volt szignifikáns összefüggés a széklet MMP-9 szint és a tumor lokalizációja, illetve Dukes stádiuma között.

5. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Állatkísérletek

1. A *CAMLCKTg* transzgén diszkrét vékonybél permeabilitás emelkedést okoz. Ez a változás nem jár együtt a testsúly és az intesztinális tranzit változásával, azonban diszbiózis-szerű eltéréshez vezet a bél microbiomban.

2. *CAMLCKTg* egerekben a zsigeri érzékenység szignifikánsan csökken a vad típusú egerekhez képest, ez a genotípus specifikus változás kivédhető MLCK gátlással, “water avoidance” stressz alkalmazásával vagy naloxon kezeléssel.

3. *CAMLCKTg* egerekben az intesztinális permeabilitás emelkedés anxiétás szerű viselkedészavart okoz a vad típusú egerekhez hasonlóan.

4. *CAMLCKTg* egerekben a neuronális aktivitás szignifikánsan emelkedett a thalamus és a hypothalamus paraventriculáris nucleusaiban és a hippocampus vad típusú egerekhez képest, míg a neuronális aktivitás nem változik a mediális prefrontális cortexben, a nucleus accumbensben és az amygdalában.

Eredményeink alapján a *CAMLCKTg* egér ígéretes experimentális modellje lehet az IBS-nek. Az ebben a modellen elvégzett kísérletek új, értékes információkkal szolgálhatnak a betegség pathogenezisével kapcsolatban.

Humán vizsgálatok

1. A standard ELISA Kit alkalmas az MMP-9 detektálására széklet mintákban.

2. A széklet MMP-9 szint emelkedett UC betegekben funkcionális kórképekhez (IBS-D) és egészségesekhez képest.
3. UC-ban a széklet MMP-9 szintje a betegség aktivitásának kiváló prediktora, szignifikáns korrelációt mutat a klinikai és endoszkópos aktivitási pontrendszerrel.
4. A széklet MMP-9 szintje szignifikánsan korrelál a széklet calprotectin értékkel UC-ban.
5. A széklet MMP-9 mérés magas szenzitivitás és specificitás mellett alkalmas a CRC betegek elkülönítésére a polypoid lézió mentes betegektől.
6. Alacsonyabb küszöbérték mellett a széklet MMP-9 meghatározás a betegek közel 60 %-ában alkalmas a magas rizikójú adenomák elkülönítésére is.

A vizsgálatok alapján a széklet MMP-9 meghatározása ígéretes differenciáldiagnosztikai marker lehet a hasmenéssel járó kórképekben és alkalmas a betegségaktivitás és a mukózális gyulladás megítélésére UC-ben. A széklet MMP-9 mérés továbbá a kolorektális karcinoma diagnosztikájának is új, nninvazív markere lehet.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, **Dr. Róka Richárdnak** a tudományos munkám segítéséért. Hálával tartozom a toulouse-i INRA laboratóriumban végzett munkáim témavezetőinek, **Prof. Vassilia Theodorounak** és **Dr. Laurent Ferriernek** a támogatásukért.

Köszönöm a klinikánk korábbi és jelenlegi vezetőinek, **Prof. Lonovics Jánosnak**, **Prof. Wittmann Tibornak**, **Prof. Ábrahám Györgynek**, **Prof. Lengyel Csabának**, hogy lehetővé tették az experimentális és klinikai kutatások körülményeit számomra tanszékünkön.

Különleges köszönettel tartozom **Dr Annaházi Anitának**, aki kitartóan segített és támogatott mind klinikai, mind experimentális munkáimban.

Szeretném megköszönni kollegáim és társszerzőim, **Valerie Bacquié**, **Dr. Maïwenn Olier-Pierre**, **Dr. Marion Rincel**, **Dr. Belinda Ringot-Destrez**, **Sandrine Ellero-Simatos**, **Prof. Hélène Eutamène**, **Colette Bétoulières**, **Julie Thomas**, **Justin Lainé**, **Louise Gros**, **Mathilde Lévêque**, **Dr. Renaud Leonard**, **Cherryl Harkat**, **Dr. Catherine Robbe-Masselot**, **Dr. Muriel Mercier-Bonin**, **Prof. Muriel Darnaudéry**, **Prof. Molnár Tamás**, **Dr. Farkas Klaudia**, **Dr. Rosztóczy András**, **Prof. Izbéki Ferenc**, **Dr. Gecse Krisztina**, **Prof. Nagy Ferenc**, **Dr. Földesi Imre**, **Szűcs Mónika**, **Dr. Marta Dabek**, **Prof. Lionel Bueno**, **Dr. Ábrahám Szabolcs**, **Dr. Rutka Mariann**, **Vadászi Klára** és **Prof. Lázár György** segítségét és a szegedi I. sz. Belgyógyászati Klinika és a Toulouse-I INRA TOXALIM munkacsoport minden dolgozójának a támogatását..

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a családomnak azt a támogató szeretetet, mellyel segítették a tudományos munkámat.