

A májfibrosis mérés invazív és non-invazív módszereinek összehasonlító elemzése különböző etiológiájú májbetegségekben

Doktori tézisek

Dr. Horváth Tünde

Semmelweis Egyetem
Patológiai Doktori Iskola



Konzulens: Dr. Schaff Zsuzsa akadémikus , egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Szende Béla MTA doktora, egyetemi tanár
Dr. Székely György PhD osztályvezető főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Veres Gábor MTA doktora , egyetemi docens

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Lengyel Gabriella DSC, egyetemi docens

Dr. Simon Károly PhD ny. osztályvezető főorvos

Budapest

2016

I. BEVEZETÉS

A chronicus májbetegségek nemcsak hazánkban, de világszerte is egyre jelentősebb népegészségügyi problémát jelentenek. A WHO 2014-ben publikált adatai szerint Magyarországon a májcirrhosis okozta halálozási arány 27,21/100.000 fő. Ezzel az „előkelő” 36. helyen állunk a világ vizsgált 172 országa közül. Ugyancsak a WHO adatai szerint 2012-ben 3.900 ember haláláért volt felelős a májcirrhosis, mely így a hetedik leggyakoribb halálok volt Magyarországon.

Az idült májbetegségek kialakulásában számos etiológiai tényező szerepelhet (vírus, autoimmun betegség, metabolikus zavar, toxikus ágens, genetikai rendellenesség stb). A betegség a legtöbb esetben tünetmentesen, vagy tünetszegényen zajlik, így az gyakran csak előrehaladott állapotban kerül diagnosztizálásra. Az etiológiától függetlenül a chronicus májbetegségek lefolyásában közös, hogy a májban valamilyen szintű gyulladással járó folyamat zajlik, melyet idővel kötőszövet szaporulat - fibrosis - majd szerkezeti torzulás és átépülés -cirrhosis - követ. A cirrhotikus májban nagy valószínűséggel alakul ki hepatocellularis carcinoma (HCC)- melynek incidenciája 3-5% évente. Az idült májbetegség korai felismerése alapvető jelentőségű a beteg és a társadalom szempontjából is. Az egyén

számára a felismerés és az eredményes kezelés az egészség, a munkaképesség, az életminőség megőrzését jelenti, míg a közösség szempontjából a fertőzés terjedésének a megállítását, a későbbi súlyos szövődmények (májzsugor és következményei: varix vérzés, vascularis és parenchymás decompensatio stb) megelőzését, és így jelentős egészségügyi költségmegtakarítást eredményezhet.

Az idült, diffúz májbetegségek estében a lefolyás, a prognózis megítéléséhez, a terápia módjának megválasztásához, valamint a terápia hatékonyságának megítéléséhez az egyik legfontosabb információ a betegség stádiumának felmérése, a fibrosis jelenlétének, illetve mértékének megállapítása, változásának követése. Napjainkban ez talán legmarkánsabban a chronicus vírushepatitisek – elsősorban a chronicus C hepatitis (CHC) – terápiájában a legaktuálisabb.

A fibrosis diagnosztikájának alapja („gold standard”) az elmúlt mintegy 50 évben a májbiopszia volt. Invazivitása, a mintavételi hiba, az egyes vizsgálók értékelése közötti eltérések („intra,- és interobserver error”) problémája miatt újabban sokan megkérdőjelezik a biopszia végzésének szükségességét a chronicus májbetegségek mindennapi diagnosztikájában. Ugyanakkor vitathatatlan előnye, hogy a biopszia során nyert

mintából számos molekuláris, immunhisztokémiai vizsgálat is elvégezhető és a fibrosis kvantitatív mérésére is lehetőség nyílik, digitális morphometriai analysissal (DMA).

A fenti okok miatt, az utóbbi években a fibrosis meghatározására irányuló non-invazív diagnosztikus technikák jelentős mértékben fejlődtek. Ezek egyrészt vérből kimutatható markerek, vagy ezek kombinációi – mint például az APRI (AST-to-Platelet Ratio Index) -, másrészt képkötő és scanning technikák (pl. Transiens Elastographia -Fibroscan). Ezen módszerek egyértelmű értéke, pontossága jelenleg is megbeszélés tárgya a nemzetközi irodalomban.

Jelen munkánk egyik célja az volt, hogy különböző kórokú májbetegségekben vizsgáljuk a májfibrosis pontos meghatározásának lehetőségeit, és összevessük az invazív és non-invazív technikák használhatóságát.

Számos májbetegségben a microRNS-ek (miR) - ezen kicsiny, nem-kódoló, a génexpressziót általában negatívan szabályozó RNS molekulák - jellegzetes változása mutatható ki. Felvetődik, hogy a fibrosis során is változik expressziós szintjük, mely a fibrosis mértékét és az esetleges progressziót jelezheti. Mindezek alapján, arra kerestük a választ, hogy a miR expresszió

változásának nyomon követésével növelhető-e a kórszöveti fibrosis mértéke meghatározásának pontossága.

II. CÉLKITŰZÉSEK

A fentiek alapján célunk volt, a "hagyományos" invazív és non-invazív módszerek, valamint újabb vizsgálati lehetőségek értékének megállapítása, egymással való összehasonlítása különböző etiológiájú májfibrosis során. Ezen célkitűzés megválaszolására a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Milyen korreláció figyelhető meg a hagyományos szemi-quantitatív fibrosis meghatározási módszer (Metavir) és a digitális morphometriai analysis (DMA) során nyert adatok között a máj tűbiopszáz anyag elemzése során?
2. Segítheti-e a fibrosis stádium pontosabb megítélését a digitális morphometriai analysis alkalmazása?
3. Milyen mértékben korrelálnak a hisztológiai vizsgálatok alapján megállapított és a non-invazív módszerekkel (transiens elastographia (TE) során mért Liver stiffness (LS) , valamint APRI) meghatározott fibrosis stádiumok?
4. Befolyásolja-e a steatosis mértéke, a minta nagysága (a portalis mezők száma), az egyidejű gyulladós aktivitás mértéke, illetve a nem, a különböző módszerekkel végzett fibrosis meghatározások pontosságát?
5. Korrelál-e a HCC-ban eltérést mutató miR-ek (miR-21, miR-122, miR-214, miR221/-222, miR-224) intrahepaticus

expressziója a fibrosis súlyosságával és a májbetegség biokémiai aktivitását jelző ALT értékkel?

6. Befolyásolja-e az idült, diffúz májbetegség etiológiája a hagyományos szemi-quantitatív módszerrel megállapított fibrosis stádium (Metavir), az LS érték és a különböző miR-ek expressziója közötti kapcsolatot?

III. MÓDSZEREK

A retrospektív vizsgálathoz olyan betegek májbiopsziás mintáit használtuk fel, akiknél Transiens elasztográfia (TE) is történt. Magyarország hepatológiai centrumaiból származó, mintegy 200 mintából azokat az eseteket dolgoztuk fel, melyekben a májbiopszia és a TE időpontja között eltelt idő nem haladta meg a 90 napot, valamint a biopszia időpontjában (+/-1 nap) ALT (alanin aminotranszferáz), AST (aszpartát aminotranszferáz) és thrombocytaszám meghatározás is történt. E kritériumoknak 96 minta felelt meg (nő:53, férfi:43 életkor:15-67 átlag:40,05).

A mintákból a májfibrosis mértékének meghatározása szemi-quantitativ módszerrel – a Metavir score (F0 – F4) szerint – történt, valamint a metszetek digitalizálása után a fibrosis mértékét digitalis morphometriai analysis (DMA) során százalékosan is meghatároztuk.

A fibrosis mellett a mintákban meghatároztuk az értékelhető portális terek számát, valamint Brunt szerint a zsír mennyiségét (Grade1 <33%, Grade2 34-66%, Grade 3 >66%)

Digitális morphometriai analysis

A quantitativ analysis során Mirax Midi slide scannert (3D Histech, Budapest, Hungary) használtunk a tárgylemezek digitalizálására. A kamera 20x Zeiss Plan-Apochromat objektívvel Marlin F14C volt ellátva. A fibrosis mértékének megítélése Leica QWin V3 morphometriai software segítségével történt (Leica Microsystem Imaging Solution Ltd., Cambridge, UK.)

Biokémiai vizsgálatok

A biopszia időpontjában (+/-1 nap) minden betegől vért vettek és az ALT (U/L), az AST (U/L) és a thrombocyta szám (G/L) meghatározásra került. Ezen adatok alapján számoltuk ki az APRI értékét ($APRI = \frac{AST}{ULN}{thrombocyta\ szám(10^9/l)} \times 100$ (ahol ULN az AST-szint normális értékének felső határa, általában 40 IU/l).

RNS izolálás

A minták RNS tartalmát RNeasy FFPE kit (Cat.Number:74404, QIAGEN, Hilden, Germany) segítségével vontuk ki.

Reverz transzkripció (RT) és kvantitatív polimeráz láncreakció (qPCR)

52 mintán végeztük el a miR-21, a miR-122, a miR-214, a miR-221/222 és a miR-224 expressziójának meghatározását TaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA) segítségével. A relative expressziót $2^{-\Delta\Delta Cq}$ képlet alapján számoltuk, amelyhez a miR-140-et használtuk, mint a legstabilabb referenciagént – NormFinder applikációval meghatározva – és az F0 májminták ΔCq középértékéhez (medián) normalizálva.

A vizsgálat során etiológia szerint három alcsoportot képeztünk: chronicus virus hepatitis (24 eset), autoimmun eredetű chronicus májbeteg (19 eset) és egyéb etiológia (9 eset)

Statisztikai analysis

Az F0-F4 fibrosis stádiumok közötti miR expressziós különbségeket non-parametrikus Kruskal-Wallis ANOVA teszttel vizsgáltuk STATISZTICA szoftver (9.1-es verzió) (StatSoft Inc.,Tulsa, OK) segítségével. A *micro RNS* expresszió összefüggését a fibrosis stádiummal, a LS és az ALT értékekkel non-parametrikus Spearman korrelációval végeztük, GraphPad PRISM szoftver (verzió 5.01) (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA) alkalmazásával. A $p < 0,05$ feltétel teljesülése esetén tekintettük a különbséget statisztikailag szignifikánsnak

A digitális morfometriai vizsgálat során nyert adatok elemzésére a Spearman korrelációt használtunk, szignifikánsnak tekintettük a p értéket 0,05 alatt. A vizsgálat során a Statistica 9.0 (StatSoft Inc, Tulsa, OK.) szoftver verziót alkalmaztuk.

IV. EREDMÉNYEK

A Digitális Morphometriai Analysis(DMA) vizsgálat eredményei

A 96 beteg adatainak értékelése során a fibrosis mértékének megítélésére használt hisztológiai és non-invazív módszerekkel kapott eredmények szignifikáns, pozitív korrelációt mutattak. A legerősebb korreláció a Metavir és a DMA eredmények között mutatkozott majd - csökkenő sorrendben - a LS és a Metavir, a LS és DMA, a LS és az APRI valamint a Metavir és az APRI következett.

Az előrehaladott fibrosis stádiumokat (F3- F4) együtt értékelve a LS és DMA adatok között kifejezettebb szignifikáns pozitív korrelációt találtunk, mint az összes esetet együtt vizsgálva.

A portális mezők száma szerint felosztottuk a vizsgált mintákat két csoportra: a 10 alatti portális mezőt tartalmazó mintákban a LS és DMA eredménye szignifikáns, de relative gyenge korrelációs értékeket mutatott, míg ≥ 10 portaszám esetén szignifikáns erős korreláció tapasztalható a LS és a DMA értékek között. Előrehaladott fibrosis stádiumokban (F3-F4) mind a kevés (5-9), mind a több (≥ 10) portális mezőt tartalmazó mintákban egyaránt szignifikáns, erős pozitív korreláció volt a LS és a DMA

mérési eredmények között, de itt is a nagyobb minták esetében volt az összefüggés kifejezettebb.

Megvizsgáltuk külön a női és férfi mintákban a DMA és a Metavir kapcsolatát és mindkét nemből azonosan erős korrelációt kaptunk. Az LS és Metavir közti korrelációs értékek is igen hasonlóak voltak. Nagyobb különbség a LS és DMA összevetése esetén mutatkozott.

A steatosist nem, vagy csak enyhe fokban (Garde 0-1) és a jelentős fokú steatosist (Grade 2-3) mutató mintákban a fibrosis mértékét vizsgálva nem találtunk érdemi eltérést a különböző módszerek közötti korrelációkban

Chronicus hepatitis C (CHC)

53 CHC- ben szenvedő beteg mintáit külön is elemeztük. A legerősebb szignifikáns korrelációt a LS-Metavir között észleltük. Az LS-DMA és a LS-APRI alacsonyabb, azonos szinten korrelált.

HAI szerinti vizsgálat

A CHC- ben szenvedő betegek közel felének (24 beteg) a szövettani aktivitási indexe (HAI) mérsékelt vagy annál súlyosabb aktivitást mutatott (HAI > 6). Vizsgáltuk, hogy a 6

score érték alatti és a 6 feletti csoportban hogyan alakulnak a különböző fibrosis mérési módszerekkel nyert eredmények összefüggései. Mindkét csoportban azonos mértékben korrelált a DMA és a Metavir. A LS- Metavir összefüggései sem mutattak lényeges különbséget mérsékeltebb, vagy kifejezett gyulladásoz aktivitás esetén.

MicroRNS vizsgálat eredményei

Ötvenkét esetben végeztük el a microRNS-ek relatív expressziójának meghatározását kvantitatív valós idejű PCR-val

A miR expresszió összefüggése a Metavir értékkel

F0 stádiummal összehasonlítva általában csökkent miR expressziót figyeltünk meg az F1-F4 stádiumokban, melyek statisztikailag nem bizonyultak szignifikánsnak, kivéve a miR-122 esetében, ahol is F4-ben szignifikánsan alacsonyabb expressziót detektáltunk F0-hoz képest.

A különböző etiológiai csoportok tekintetében szignifikánsan eltérő miR expressziós mintázatot nem találtunk, azonban a miR-122, miR-214, miR-222 és a miR-224 esetében a mintázat hasonlított az autoimmun és vírus hepatitiszes

csoporthoz, valamint a miR-21 tekintetében a vegyes etiológiájú, autoimmun és vírushepatitises csoportokban.

A miR-122 és miR-221 expresszió negatív korrelációját találtuk a Metavir stádiumokkal, valamint etiológia szerint a miR-221 negatív korrelációt mutatott a vírushepatitises csoportban, a miR-122 pedig a vegyes etiológiájú csoportban.

A miR expresszió és a transiens elasztográfia összefüggései

A szemi-quantitativ módon mért fibrosis értékekkel két miR mutatott korrelációt, a miR-122 esetében negatív, míg a miR-224 esetében pozitív korrelációt kaptunk. Az alcsoportok közül a vegyes etiológiájú csoportnál tapasztaltunk negatív korrelációt a miR-122 expressziójával míg az autoimmun és a vírushepatitis alcsoportokban a tendencia megfigyelhető ugyan, de a statisztikailag szignifikáns mértéket nem érte el.

A miR és ALT szintek összefüggése

A miR-21 esetében észleltünk pozitív korrelációt a szérum ALT értékkel mely hasonlóan megfigyelhető volt az autoimmun alcsoportban is, szemben a másik két alcsoporttal.

V. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Hazánkban először készült ilyen esetszámú vizsgálat, mely digitális morphometriai analysist is felhasznált az invasiv és non-invasiv fibrosis markerek összehasonlítására különböző etiológiájú chronicus májbetegségekben.
2. A digitális morphometriai analysissel (DMA) mért értékek igen jól korreláltak a Metavir score-ral és a non-invasiv fibrosis meghatározási módszerek eredményeivel, elsősorban a LS értékkel. Ennek alapján a DMA hasznos kiegészítője lehet a histopathologiai fibrosis stádium meghatározásnak.
3. A non-invasiv fibrosis stádium meghatározás módszerei, így az LS és az APRI is igen jó korrelációt mutattak a histopathologiai módszerekkel. Az LS és APRI közül az előbbi mutatott erősebb korrelációt.
4. Mind a DMA, mind a non-invasiv technikák pontossága nőtt az előrehaladottabb fibrosis stádiumokban.

5. A biopsziás minta nagyságának növekedésével az invazív és non-invazív technikákkal mért fibrosis meghatározás közötti korreláció szorosabb volt.
6. A steatosis jelenléte és mértéke, a nem, a hisztológiailag meghatározott gyulladáshoz viszonyított aktivitás (HAI) mértéke, a DMA, illetve a non-invasív fibrosis meghatározások eredményét nem befolyásolta.
7. Először írtuk le a miR-122 csökkenését a fibrosis függvényében eltérő etiológiájú chronicus májbetegségekben. Három - a hepatocarcinogenesisben is szerepet játszó - microRNS (miR-122, miR-221 és a miR-224) mutatott összefüggést- etiológiától függetlenül- a Metavir és/ vagy a LS értékekkel. Közülük a miR-122 bizonyult a jövőben leginkább használható molekulának a fibrosis diagnosztika tekintetében.
8. A gyulladáshoz viszonyított aktivitás mértékére utaló ALT értékkel a miR- 21 mutatott pozitív összefüggést.
9. A különböző etiológiai csoportok tekintetében szignifikánsan eltérő miR expressziós mintázatot nem találtunk

VI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

1. Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények

1. **Halász Tünde**, Horváth Gábor, Pár Gabriella, Werling Klára, Kiss András, Schaff Zsuzsa, Lendvai Gábor: miR-122 negativly correlates with liver fibrosis as detected by histology and FibroScan World Journal of Gastroenterology 2015 July 7; 21(25): 7814-7823
2. **Halász Tünde**, Horváth Gábor, Kiss András, Pár Gabriella, Szombati Andrea, Gelley Fanni, Nemes Balázs, Kenessey István, Piurkó Violetta, Schaff Zsuzsa: Evaluation of Histological and non-Invasive Methods for the Detection of Liver Fibrosis: The Values of Histological and Digital Morphometric Analysis, Liver Stiffness Measurement and APRI Score. Pathology Oncology Research. 2016 Jan; 22(1): 1-6

2. Az értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

1. Lendvai Gábor, Jármay Katalin, Karácsony Gizella, **Halász Tünde**, Kovalszky Ilona, Baghy Kornélia, Wittman Tibor, Schaff Zsuzsa, Kiss András: Elevated miR-33a and miR-

224 in steatotic chronic hepatitis C liver biopsies World J Gastroenterol. 2014. Nov 20(41): 15343-15350

2. **Halász Tünde**, Farkas Anna, Tolvaj Gyula, Horváth Gábor: Pegylált interferonkezelés mellékhatása chronicus C-hepatitisben: agranulocytosis Orvosi Hetilap 2006, 147, 321-324.
3. Horváth Gábor, Tolvaj Gyula, **Halász Tünde**, Stotz Gyula: A természetes interferon helye és lehetőségei a chronicus C-hepatitis kezelésében: a stopszabály miatt a kombinált antivirális terápiából kizárt betegek kezelésével szerzett tapasztalataink Orvosi Hetilap 2007, 148, 1545-1550.
4. Horváth Gábor, Tolvaj Gyula, **Halász Tünde**, Stotz Gyula: The Role and the Possibilities of Natural Interferon Treatment for Chronic Hepatitis C: Our Experiences with Natural Interferon Treatment for Patients Debarred from Combined Antiviral Therapy due to the STOP Rule HMJ (Hungarian Medical Journal) 2007, 1, 331-339.
5. Horváth Gábor, Tolvaj Gyula, **Halász Tünde**, Stotz Gyula: Normális szérum-alanin-aminotranszferáz-szintű, chronicus C hepatitisben szenvedő betegek kombinált antivirális kezelésével szerzett tapasztalataink. LAM 2007, 17, 777-781.

6. Schaff Zsuzsa, Gógl Alíz, Dóra Réka, **Halász Tünde**: A hepatitis C patológiája Orvosi Hetilap 2015, 156, 836-839.
7. Horváth Gábor, **Halász Tünde**, Makara Mihály, Hunyady Béla: Korszakváltás a chronicus C-vírus hepatitis terápiájában – új direkt ható antivirális szerek Orvosi Hetilap 2015, 156, 841-8.