

A gyermekkori bélrendszeri gyulladásos
megbetegedések metagenomikai etiológiája és
kezelése

Doktori tézisek

Dr. Nagy-Szakál Dorottya

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Konzulens: Dr. Vannay Ádám MD, PhD

Hivatalos bírálók:

Dr. Bene László MD, PhD osztályvezető főorvos

Dr. Müllner Katalin MD, PhD egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Szabó András MD, PhD egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Hegyi Péter MD, PhD egyetemi tanár

Dr. Miheller Pál MD, PhD egyetemi adjunktus

Budapest
2017

BEVEZETÉS

A különböző táplálkozási hatásoknak fontos szerepe van a mikrobiom összetételében és a bélben lejátszódó immunfolyamatok kialakításában. Ezek a hatások a mikrobiomon keresztül a gyulladásos bélbetegségekre (IBD, CD: Crohn-betegség és UC: colitis ulcerosa) való fogékonyságot befolyásolhatják. A mikrobiom megváltozása az IBD kialakulásához vezethet, vagy éppen ellenkezőleg, a betegséggel szemben védelmet nyújthat.

Az IBD incidenciája fiatal felnőttkorban a legmagasabb, ami összefüggésbe hozható a gyermekkorban a szervezetet érő különböző környezeti hatásokkal (így például táplálkozással), melyek az éppen fejlődésben lévő szervezetet érik.

Táplálkozási hatásokat vizsgáló tanulmányok arról számolnak be, hogy csökkent rosttartalmú étkezés (alacsony cellulóz bevitel) a gyulladásos bélbetegségek incidenciájának

növekedéséhez vezethet. Magas ω -6 zsírtartalmú táplálkozás pedig UC kialakulását eredményezheti.

A bélben előforduló baktériumok egyre nagyobb jelentőséggel bírnak és számos megbetegedés, így például a gyulladásos bélbetegségek kialakulásában is feltételezhető a szerepük. A táplálkozási és mikrobiális hatások és ezek kölcsönös szerepe a host szervezetre és gyulladásos megbetegedések kialakulására azonban nem ismert.

Komplex mikrobiális terápia, avagy a székletátültetés (FMT) hatásos terápiás módszer visszatérő *Clostridium difficile* fertőzésben (CDIF, antibiotikum-kezelés kapcsán kialakuló bélfertőzés), mely fertőzés patomechanizmusában a bélbaktériumok komplex összetételének megváltozása (diszbiózis) feltételezhető. Az FMT hatásmechanizmusa azonban nem teljesen ismert.

CÉLKITŰZÉS

1. A táplálkozási hatások és a mikrobiom komplex szervezetre gyakorolt hatásának vizsgálata.
2. Egérkísérletekben vizsgálni a különböző táplálkozási hatások (magas cellulóztartalmú és magas ω -6 zsírtartalmú tápanyagok) tranziens és perzisztens változásait a szervezetre, a mikrobiomra, és bélrendszeri gyulladásra.

Egérkísérleteink során a születést követően adott tranziens magas cellulóztartalmú táplálék hatását vizsgáltuk dextran sulfate sodium (DSS)-indukálta kémiai bélgyulladásban. Továbbá születést követően adott tranziens magas ω -6 zsírtartalmú tápanyagok hatását DSS-indukálta akut bélgyulladásban.

3. Humán klinikai kutatásokban vizsgálni a székletátültetés hatékonyságát. Komplex mikrobiom változások vizsgálata FMT hatására gyermekkorban fellépő *Clostridium difficile* fertőzésben és gyulladásos bélbetegségekben.

Humán fázis I. vizsgálatunkban az FMT hatására végbemenő mikrobiális változásokat vizsgáltuk gyermekkori CDIF és UC betegekben.

MÓDSZEREK

Táplálkozási hatások vizsgálata egérmodellben

C57BL/6J egereket használtunk a különböző táplálkozási hatások vizsgálatára. Magas rosttartalmú (12.5% vs. 2.5% cellulóz) és magas ω -6 zsírtartalmú (40% vs. 12% corn oil/linoleic acid, ω -6 zsírsav) tápanyagot adtunk az egereknek a születést követő (P) 30. naptól. Az egerek eltérő tápanyagot kaptak P30 és P90/P120 közötti intervallumban. A tanziensen alkalmazott tápanyagok bélgyulladásra kiváltott hatását vizsgáltuk, melyet dextrane sulfat sodium (DSS)-tal idéztünk elő az egerekben. SWGF egereket széklettranszplantációnak vetettünk alá, hogy a mikrobiális változásokat tovább vizsgáljuk mikrobiom-mentes egerekben.

Áramlási citometria és *in vivo* chemokine blokkolás

A Cxcr5(+) CD4(+) T-sejtek kvantitatív meghatározására áramlási citométert alkalmaztunk. C57BL/6J egérmodell intarperitoneális kezelése (0.2 mg CXCL13 vagy isotípikus kontroll antitest) beadásával történt három alkalommal a DSS kezdetével megegyezően.

ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

A vérben keringő CXCL13 mennyiségének meghatározására 12 UC, 11 CD és 10 egészséges kontroll szérumát vizsgáltuk Quantikine ELISA kit felhasználásával (#DCX130; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Széklettranszplantáció

Humán klinikai tanulmányunkhoz létrehoztunk egy nemzetközileg elfogadott FMT protokollt. A biztonságos széklet donor bevonást, szűrést és széklet preparációt sztandardizáltuk. A donor székletét megszűrtük és fagyasztottuk, majd

kezelés előtt rövid időn belül felolvasztottuk és a betegek számára elérhetővé tettük.

Gyermekkori CDIF betegek egyszeri kezelésben részesültek kolonoszkópia útján, illetve egy második FMT-t kaptak (via enema vagy nasogasztrikus szonda), amennyiben az klinikailag indokolt volt (nem volt detektálható klinikai javulás).

Gyermekkori UC betegek többszöri FMT kezelésben részesültek. A kezelés első napján kolonoszkópia segítségével makroszkópos szöveti vizsgálat történt (Mayo klasszifikációs vizsgálat). Sorozatos biopsziás mintavétel történt a rectosigmoid területtől kiindulva a cecumig felszálló irányban rutin szövettani és kísérletes vizsgálatokhoz. A mintavételt követően 250 ml székletpreparációt adtunk a betegeknek via kolonoszkópia (1/3 a terminális ileumba, 2/3 pedig a colon jobb oldali szakaszába).

A kolonoszkópiát követően a UC betegek sorozatos intenzív FMT kezelésben részesültek (eredetileg 12 héten keresztül). A donor minta rektális enema formájában (60-250 ml minimum 30 percig benntartva) került beadásra az első két hétben minden nap, majd ezt követően 2 hétig hetente háromszor. Ezt követően a betegek heti FMT kezelésben részesültek további 2 hónapon keresztül. Az időközben kiadott regulációs szabályok következményeként a tanulmányt idő előtt megszakítottuk.

A kiterjesztett második tanulmány során a korábban leírt protokollt kiterjesztettük egy teljes évre (további havi emlékeztető FMT) a betegek nyomonkövetésével.

A betegek a kezelés előtt 15-30 perccel 4 mg loperamide tablettát vehettek be a székletpreparátum benntartásának érdekében, melynek sikeressége kulcsfontosságúnak bizonyult a tanulmány során.

A betegség aktivitását és az FMT hatására bekövetkező klinikai javulást PUCAI (pediatric ulcerative colitis activity index) pontrendszer segítségével monitoroztuk. A klinikai tünetek és a betegség progressziója minden enema kezelés előtt rögzítésre került. Továbbá az esetlegesen fellépő, a kezeléssel kapcsolatban álló vagy nem álló mellékhatásokat rögzítettük.

Metagenomika

Az egérkísérletek (egér colon mucosa és széklet), továbbá a humán klinikai vizsgálatok (humán CDIF és UC betegek széklete) során összegyűjtött mintákon mikrobiom vizsgálatot hajtottunk végre. A mikrobiom meghatározás 454 piro szekvenálás segítségével történt a baktériumokra specifikus 16S rRNS gén amplifikációjával. A bakteriális DNS kivonás a PowerSoil izolációs kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA, USA) segítségével történt. Bárkóddal ellátott univerzális primereket (357F: 5'-

CCTACGGGAGGCAGCAG-3' és 926R: 5'-CCGTCAA TTCMTTTRAGT-3') használtunk a bakteriális V3V5 régió amplifikációjához. A szekvenálás Roche GS FLX 454 sequencer (454 Life Sciences, Branford, CT, USA) felhasználásával történt. A szekvenálási adatok bárkód azonosítás, adatszűrés és minőségellenőrzést követően a QIIME (version 1.8.0) szoftver segítségével került feldolgozásra. A bakteriális szekvenciák azonosítása specifikus OTU (operational taxonomic units) rendszerbe minimum 97%-os egyezést követően történt szabad referencia választással (QIIME: open-reference OTU picking, UCLUST algoritmus és GreenGenes13.8 referencia adatbázis). ChimeraSlayer alkalmazást használtunk a lehetséges kimérák eltávolítására.

A szekvenálási adatok alapján a mikrobiom összetételét, az előforduló baktérium fajták számát és azok relatív mennyiségét kalkuláltuk. Alpha diverzitás meghatározása a reprezentáló baktérium

fajták számával és Shannon diverzitás index segítségével történt. A csoportok összehasonlítását béta diverzitás kalkulálásával végeztük (unweighted UniFrac distance). Az egérkísérletek során a kezelési csoportokat összehasonlítottuk az eltérő táplálkozási hatásoknak megfelelően a kontroll egerek mintáival. A humán klinikai kísérlet során a betegekben végbemenő mikrobiom változásokat különböző időpontokban (FMT előtt és után) vizsgáltuk, illetve a donor és egészséges kontroll mintákkal összehasonlítva.

Statisztikai számítások

Nem-parametrikus kétmintás Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk a mikrobiom adatok összehasonlítása során. Parametrikus kétmintás Student's T-próbát és Spearman korrelációs számításokat alkalmaztunk az OTU változások és csoportanalízisek során, továbbá a Mayo pontrendszer és klinikai remisszió korrelációjára. A statisztikai szignifikancia szintje $p < 0.05$. A

hibavonalak a szórást jelölik. A mikrobiális analízis során Bonferroni korrekciót végeztünk. A statisztikai számítások Prism4.03 szoftver segítségével történtek.

EREDMÉNYEK

Egérkísérleteink során a tranziens cellulóz szupplementáció az intesztinális mikrobiom megváltozását eredményezte. A baktérium családok szintjén végbemenő kiemelkedő változások a következők: csökkent Coriobacteriaceae ($p=0.001$), növekedett Peptostreptococcaceae ($p=0.008$) és Clostridiaceae ($p=0.048$). A cellulóz-diétához kapcsolódó változások 10 nappal a szupplementáció visszavonása után is megfigyelhetőek voltak. A mikrobiális változások mellett a bélhám tranziens növekedése volt megfigyelhető, mely változás a DSS által indukált bélgyulladás ellen védelmet nyújtott. A megfigyelt mikrobiális, trófikus és protektív hatások a cellulóz

szupplementáció megszűnését követően 40 nappal már nem voltak megfigyelhetőek.

A tranziens magas ω -6 zsírtartalmú tápanyag szupplementáció az egerek obezitását idézte elő. A szupplementáció megszűnését követően az egerek testsúlya normalizálódott és a kontroll egerekkel megegyező volt. Az ω -6 diéta – ellentétben a várt eredménnyel – azonban védeltséget biztosított DSS-indukálta colitis ellen 10 és 40 nappal a szupplementáció megszűnését követően is. A megfigyelt védelem függött a zsírsav típusától (ω -6-dependens), továbbá fontosnak bizonyult a revertáció ténye (egerek ω -6 diétán revertáció nélkül súlyos colitis-t mutattak DSS hatására). A védelem székletátültetés (intesztinális mikrobiom transzplantáció) segítségével átvihető volt csíramentes egerekbe.

További megfigyeléseink alapján a Cxcr5(+) CD4(+) T-sejtek száma csökkent a tranziens ω -6 egerek mesenterialis

nyirokcsomójában. Anti-chemokine ligand (Cxc1) 13 (Cxcr5 ligand) antitest kezelés a DSS-indukált colitis ellen védelmet nyújtott alátámasztva a Cxcr5-Cxc13 mechanizmus jelentőségét.

Humán szérum mintákban a CXCL13 koncentrációja növekedett gyermekgyógyászati gyulladásoos bélbetegségekben (CD: 1.8-fold, $p=0.0077$; UC: 1.9-fold, $p=0.056$), ami a Cxcr5-Cxc13 transzlációs jelentőségét támasztja alá.

A humán klinikai tanulmányunk során mind a 4 tisztán CDIF beteg (jelentős co-morbiditás nélkül) klinikai remisszióba került egyszeri FMT-t követően 2 hónapos nyomonkövetéssel. Azonban az FMT nem javította a klinikai állapotát azon betegeknek, akik jelentős co-morbiditással rendelkeztek a CDIF mellett.

Előzetes kísérletünk alapján a sorozatos FMT három UC beteg állapotának javulásához és remisszióban tartásához vezetett az immunterápia elhagyása ellenére is. A kiterjesztett tanulmány

azonban vitatható eredménnyel zárult az FMT hatékonyságának megítélésében. Egyedül egy beteg maradt remisszióban az immunterápia elhagyását követően minimum 6 hónapig. Az eredmény az FMT protokoll és az immunterápia elhagyásának kezdetekor meghatározott UC betegség súlyosságával magyarázható. A klinikai remisszió hossza és a betegség mukózális aktivitása egymással fordított arányosságot mutatott ($r=-0.845$, Spearman: $p=0.033$).

A kiterjesztett vizsgálat során (101 FMT) a fellépő mellékhatásokat szigorúan monitoroztuk és rögzítettük. Összesen 17 ilyen mellékhatást rögzítettük, melyek jelentős része vagy a kolonoszkópia után jelentkező ismert mellékhatásoknak tudható be, vagy felsőlégtüti megfázás tünetei. Egy esetben fordult elő a kezeléshez valószínűleg szorosan kapcsolódó lázas állapot, mely az FMT eredménytelenégét és az UC betegség fellángolását jelezte.

A kapcsolódó metagenomikai vizsgálatok a CDIF és UC betegek mikrobiomjának megváltozását találta FMT-t követően. A változás mind az egészséges, mind a donor mikrobiom irányába bekövetkezett. A CDIF mikrobiom jelentősen nagyobb változáson ment keresztül (egyszeri FMT-t követően) összehasonlítva a UC mikrobiomhoz többszöri kezelést követően. Az FMT kezelés elhagyását követően a UC betegek mikrobiomja idővel visszatért az eredeti állapothoz (tranziens hatás). Ugyanilyen változás volt megfigyelhető azoknál a CDIF betegeknél, akik csak rövid ideig vagy egyáltalán nem reagáltak a kezelésre.

KÖVETKEZTETÉSEK

1. Cellulóz szupplementáció védelmet biztosít DSS-indukálta egér colitis-ben. Ez a komplex mikrobiális, trófikus és protektív hatás azonban tranziens.

2. Tranziens magas ω -6 zsírtartalmú diéta az obezitás elvesztését követően hosszantartó védelmet biztosít DSS-indukálta egér colitisben. A védelem kapcsolatba hozható a diéta hatására bekövetkező és megfigyelt mikrobiális változásokkal, továbbá a nyirokcsomó összetételének megváltozásával (Cxcr5-Cxcl13 folyamatok).
3. Transzlációs kutatásunk eredményei alapján elmondható, hogy az FMT biztonságosan alkalmazható gyermekkori CDIF és UC betegek körében.
4. A jelentős co-morbiditással nem rendelkező CDIF betegek klinikai remisszióba kerültek egyszeri FMT-t követően 2 hónapos nyomonkövetéssel. Azonban az FMT nem javította a klinikai állapotát azon betegeknek, akik valamilyen co-morbiditással rendelkeztek a CDIF mellett.
5. Az előzetes tanulmányunk alapján a sorozatos

FMT klinikai remisszióban tartotta az UC betegeket, azonban a kiterjesztett klinikai tanulmányunk során az FMT hatékonysága vitathatóvá vált gyermekkori UC-ben. A csökkent hatékonyság a betegség súlyosságával magyarázható az FMT kezdetekor. A klinikai remisszió hossza és a betegség mukózális aktivitása egymással fordított arányosságot mutatott. Összeségében elmondható, hogy az FMT kezdetekor mukózális remisszióban lévő betegeknél (Mayo 0-1, pseudopolyp nélkül) várható hosszútávú klinikai remisszió. Ezen eredmények a mukózafelszínnel dinamikus kapcsolatban álló mikrobiommal magyarázható, melynek jelentősége megváltozik akut betegség során, és így terápiás célú befolyásolása is limitáltá válik.

Azokban hangsúlyozni kell, hogy tanulmányunk fontos jelentőséggel bír abból a szempontból, hogy ez az egyetlen FMT-IBD

tanulmány, ahol az immunterápia-dependens betegek gyógyszeres kezelését megszakítjuk, illetve folyamatosan leépítjük a kizárólagos FMT hatás vizsgálatának érdekében.

UC betegeink mind gyermekek/ fiatal felnőttek jelentősebb co-morbiditás nélkül, továbbá rövid betegség történettel rendelkeztek (3-43 hónapja fennálló UC). Ezen jellegzetességek a FMT hatékonyságával összefüggésben állhatnak.

6. Metagenomikai vizsgálatok a CDIF és UC mikrobiom robuszt változását írták le FMT hatására. Jelentősebb mikrobiom változást találtunk CDIF-ben, mint UC betegekben az FMT kezelés számának jelentős eltérése ellenére (CDIF: 1 FMT, UC: 2-32 FMT). Az UC betegek mikrobiomja azonban a kezelés megszakítását követően visszatért majdnem eredeti állapotába.

Az FMT tanulmányok túlnyomó többségéhez egyetlen donort használtunk, mely különleges

lehetőséget biztosított a metagenomikai vizsgálatok során.

Összefoglalva, tanulmányunk megerősíti, hogy gyermekkorban végbemenő külső behatások hosszantartó változásokat hoznak létre a szervezetben, melyek később betegségek kialakulásához vagy éppen ellenkezőleg, betegségekkel szemben védelmet jelenthetnek. Ez a kritikus időszak gyermekkorban különösen jelentős figyelmet érdemel. A különböző táplálkozási hatások megváltoztatva a mikrobiomot a gyulladós betegségek kialakulását/lefolyását befolyásolhatják. A táplálkozási szokások megváltoztatása, illetve a mikrobiom direkt változtatása (például FMT) a gyulladós bélbetegségek újszerű megelőzését és terápiáját teszi lehetővé.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Kellermayer R, Nagy-Szakal D, Harris RA, Luna RA, Pitashny M, Schady D, Mir SAV, Lopez, ME, Gilger MA, Belmont J, Hollister EB, Versalovic J. Serial Fecal Microbiota Transplantation Alters Mucosal Gene Expression in Pediatric Ulcerative Colitis. American Journal of Gastroenterology, 2015; 110(4):604-6. **IF:9.2**

Nagy-Szakal D, Mir SA, Harris RA, Dowd SE, Yamada T, Lacorazza HD, Tatevian N, Smith CW, Kellermayer R. Loss of omega-6 induced pediatric obesity protects against murine colitis. FASEB Journal, 2015; 29(8):3151-9. **IF:5.48**

Nagy-Szakal D, Hollister EB, Luna RA, Versalovic J, Smith CW, Kellermayer R. Cellulose Supplementation Early in Life Ameliorates Colitis in Adult Mice. Plos One, 2013;8(2):e56685. **IF:3.73**