

Levélcím: I. sz. Belgyógyászati Klinika, 6701 Szeged, Korányi fasor 8-10.

A kutatási terv közérdekű adatainak kivonata beavatkozással járó vizsgálatok¹ számára²

A kitöltött nyomtatvány adatait az etikai véleményt adó Regionális Kutatásetikai Bizottságnak korlátozás nélkül hozzáférhetővé kell tennie bárki számára.

A kutatás-fejlesztési tevékenység során létrejövő szellemi javakat Magyarországon több törvény is védi.³ Ugyanakkor a Helsinki Nyilatkozat 16. pontja, az Ovideoi Egyezményt hatályba léptető 2002. évi VI. törvény, és az orvosi kutatások végzéséről szóló miniszteri rendelet az emberen végzett orvosi kutatások etikus folytatása érdekében megkövetelik az etikai bizottságoktól, hogy a közvéleményt tájékoztassák az általuk véleményezett kutatások fontosabb adatairól. A közvélemény tájékoztatásának célja: az etikai bizottság munkájának nyilvánossága, a kutatások alanyai alapvető emberi jogainak biztosítása.

A 2007. III. 10-től hatályos 1/2007. (I. 24.) EüM rendelettel módosított 23/2002. (V. 9.) EüM rendelet szerint az alább felsorolt, a kutatási tervben megtalálható adatok közérdekű adatok, amelyeket bárki korlátozás nélkül megismerhet. Kérjük, hogy a szellemi alkotások oltalmának védelmét is szem előtt tartva, a nem nyilvános kutatási terv alapján töltsék ki ezt a táblázatot. A közvélemény és az alanyok tisztességes, lényegre törő tájékoztatását tartsa elsődleges szempontnak. A kutatási terv szakmai-etikai jóváhagyása után, az etikai bizottság a saját honlapján minden érdeklődő számára közzé teheti az itt megadott közérdekű adatokat. Szakmai vagy szolgálati titoknak minősülő, illetve a kutatás érdekeit veszélyeztető adatot ne közöljön!

A téma megnevezése (nem kell, hogy megegyezzen a kutatási protokoll címével)

Antimikrobiális peptidek, mikrobiota és mucus szerepe az IBS pathogenezisében

A kérelem iktatási száma: 59/2018-SZTE

A kérelmező neve, munkaköre és beosztása: Dr. Róka Richárd, egyetemi docens

1. A kutatás célja, indokoltsága és várható eredményének összefoglalása

Világszerte a lakosság több mint 10 %-a szenved Irritábilis Bél Szindrómában (IBS). Az IBS funkcionális bélbetegség, folyamatos, vagy időszakosan visszatérő hasi fájdalommal, puffadással, székletrendváltozással jellemezhető, mely mögött organikus etiológiai faktor nem mutatható ki a standard vizsgálatokkal. Eme krónikus betegségnek jelentősen nagy orvosi és indirekt költségigénye van és az orvosi ellátórendszerre jelentős terhet ró. Annak ellenére, hogy a betegség ilyen epidemiológiai jelentőséggel bír, a betegség patofiziológiája nem teljesen ismert. A komplex patofiziológia jobb megismerése a

¹ A 23/2002. (V. 9.) számú EüM rendelet 20/B. § g) és h) pontjai szerint:

g.) *beavatkozással járó vizsgálat (interventional trial)*: fizikai beavatkozással járó orvostudományi kutatás és minden olyan beavatkozással járó kutatás, amely a vizsgálati alany lelki egészségére nézve kockázattal jár

² Ez a nyomtatvány a 23/2002. (V. 9.) számú EüM rendelet 8. § (3) és (4) bekezdéseinek 2008. szeptember 1-jén hatályos szövege alapján készült.

³ A találmányok szabadalmi oltalmáról szóló 1995. évi XXXIII. törvény, a szerzői jogról szóló 1999. évi LXXVI. törvény.

betegség kezelése érdekében elsőrendű fontosságú. A SZTE I. sz. Belgyógyászati Klinika és az INRA Toulouse-ban működő kutatólaboratóriuma közötti kooperáció jelentős új eredményekkel szolgált az utóbbi évtizedekben az IBS megismerésében. Kimutattuk, hogy a széklet szerin proteáz aktivitás emelkedett a hasmenés predomináns IBS betegekben. A bél lumenében észlelhető emelkedett szerin proteáz aktivitás a hasmenés predomináns IBS-es betegekben (IBS-D) PAR-2 receptor mediálta colon epithel barrier diszfunkciót és allodiniát vált ki egérben. Ez a megfigyelés az organikus háttér új aspektusára világít rá az IBS patogenezisében.

Kimutattuk, hogy az emelkedett intestinalis permeabilitás szerepet játszik a gyulladásoos bélbetegségek (IBD) és az IBS tüneteinek kialakulásában. A székrekedésoos IBS (IBS-C) betegek székletében emelkedett cysteine proteáz aktivitás mérhető összevetve az IBS-D vagy egészséges egyének székletével. A cysteine proteáz aktivitás korrelál a betegség súlyosságával és a hasi fájdalommal. Kimutattuk állatkísérletek segítségével, hogy az emelkedett cysteine proteáz aktivitás triggereli a colon permeabilitás emelkedését mely az okkludin enzimátikus degradációjának a következménye és zsigeri hyperszenzitivitással társul Legutóbbi munkáinkat CA-MLCK génmódosítást hordozó egerekben végeztük. Ezek az állatok veleszületett bélpermeabilitás-fokozódással rendelkeznek a konstitutívan aktív myozin könnyűlánc-kináz enzim aktivitásának köszönhetően, mely génmódosítás csak a bélben fejt ki a hatását. Kísérleteink rávilágítottak, hogy az emelkedett bélpermeabilitás önmagában nem vezet zsigeri hyperszenzitivitáshoz, sőt, hyposzenzitivitás mutatható ki. Krónikus stressz hatására kifejezettebb szenzitivitás-emelkedés van jelen a vad típusú egerekkel összevetve. Génmódosított egereink anxiózus-depresszív viselkedésmódúak. Mindezek korreláltathatóak a humán IBS-sel és a pszichiátriai komorbiditásokkal

A proteázok a mucus barrieren is többféle módon fejtenek ki hatást. Bizonyos adatok szerint a proteázok és kifejezetten a cysteine proteázok képesek a mucin (kifejezetten a muc2) bontására, és szerepet játszanak a belső és a külső réteg közötti tranzícióban.

Ismert, hogy a légutakban a PAR-2 szerin-proteázok általi aktivációja erős induktora a mucus szekréciónak. Mivel az IBS-ben a béllumen proteolitikus aktivitása magas, valamint a hízósejtek proteázai is jelen vannak a lamina propriában ez a mechanizmus a béllumen barrier regulációjában is releváns lehet.

A bél mucosát egy, önmaga által termelt viszkoleasztikus réteg, a mucus borítja. A mucus réteg dinamikus, lehetővé téve a tápanyagok epitheliumhoz jutását, táptalajt nyújt a kommenzális bélflórának, de megakadályozza a patogének átjutását. A mucus aktív résztvevője az intesztinális barriernek. Struktúráját tekintve a mucus fő összetevője a mucin, melyet a kehelysejtek termelnek illetve apikális felszínükhöz rögzül. A mucus réteg eltérő a tápcsatorna különböző szakaszaiban. Legvastagabb a colonban, ahol 800 μ m-t is elérő vastagságú, ez a szakasz a tápcsatorna baktériumokban leggazdagabb része. A bélnek ebben a szegmensében 2 mucus réteg különböztethető meg: a belső réteg, mely szorosan rögzül az epithelsejtek felszínéhez és sterilnek tartható, valamint a külső, laza, baktériumok által átjárható réteg. A mucin multimerek formájában szekretálódik. Az ezt alkotó monomereket post-transductios módosításon átesett apomucin protein alkotja, ahol a glikoziláció felel a glikoprotein gél-formáló képességéért. A glikozilációs lépésben számos különböző enzim vesz részt. Az első mucin O-glikozilációt például a GalNAc (N-acetil galactózamin) szerinhez vagy treoninhoz kapcsolása indítja meg. Ezt a GalNAc transzferáz katalizálja. Ezidáig 20 különböző GalNAc transzferázt sikerült azonosítani emberben. Tömegspektrometriás vizsgálatok igazolták, hogy a Muc2, a legfőbb humán intesztinális mucin 100 különböző oligoszacharidot is köthet. A glikánlánc végső szerkezete szintén jelentős szerepű. A szulfatáció véd a proteolitikus enzimektől és

szubsztrátot kínál a szulfát-redukáló baktériumok számára, a fukozilációt pedig a mikrobiota befolyásolásában tartják jelentősnek. Ismert, hogy az intesztinális barrier károsodása számos tápcsatornai betegség kulcstényezője, így IBD-ben és IBS-ben is. Míg számos irodalmi adat írja le az epithelréteg és a helyi immunrendszer zavarait, keveset tudunk a mucust szabályozó tényezőkről. A mucus vastagsága jelentősen csökken colitis ulcerosában, mely a kehelysejtszám csökkenésével, csökkent muc2 expresszióval, valamint a baktériumok belső mucusrétegbe való fokozott penetrációjával társul. Másrészt a muc2 deficiens egerek súlyos bélgyulladásban szenvednek. Emellett az utóbbi időkben mutatták ki, hogy a muc2 N-terminusának S-palmitoilációja a szabályozó, amely lehetővé teszi a szekréciót. Ezt a zsírsav szintáz (FAS) szabályozza. Ennek kiemelt jelentőséget ad, hogy megfigyelték, hogy a FAS csökkent szintje detektálható humán IBD-ben. Minezeket a megfigyeléseket IBD-vel kapcsolatosan publikálták, az mucus szerepét IBS-ben nem vizsgálták.

Egy, az utóbbi időkben megjelent tanulmány szerint a szulfát-redukáló baktériumok arányának emelkedése figyelhető meg IBS esetén egészséges populációhoz viszonyítva, mely kialakulhat a glikán lánc terminális módosulásának hatására. Emellett az áteresztőbb mucus réteg könnyebb hozzáférést biztosít a baktériumok számára az epitheliumhoz. Ennek kiemelkedő jelentősége lehet, mivel az emelkedett bélpermeabilitás és az IBS súlyossága között összefüggés mutatható ki. Ezt az összefüggést állatkísérletek is igazolták. Egy közelmúltban közzétett tanulmány kimutatta, hogy azokban a patkányokban, amelyek krónikus víz elkerülési stressznek (WAS) voltak kitéve, mely az IBS széles körben elfogadott állatkísérletes modellje, a mucus összetétele és struktúrája jelentősen módosult. A krónikus stressznek kitétt állatokban hosszabb polilaktózamin láncokat tartalmazó O-glikán struktúrák észlelhetők a mucus réteg elvékonyodása mellett. Ez a folyamat feltételezetten fokozza a mucus pórusméretét mely lehetővé teszi a lumen tartalomnak a bél epithelium közelébe jutását. Ez a mucus barrier és epithelialis barrier közti párbeszéd egy új elmélet, mely további tanulmányozást igényel. Kollaborációs partnerünk a közelmúltban demonstrálta cryo-scanning elektromikroszkópos módszerrel, hogy patkányban a stressz növeli a mucus pórusméretét, befolyásolja a mucus összetételét és struktúráját.

Az utóbbi időben az intesztinális mikrobiota szerepét is leírták az IBS-ben szenvedő páciensek mintáiban. A különbségek az IBS altípusai és az egészséges egyének között voltak megfigyelhetőek. Az eltérések között megfigyelhető volt a Bifidobacteria törzsek csökkent mennyisége és a szulfát-redukáló baktériumok emelkedett aránya az IBS betegekben összevetve az egészségesekkel Egérben, hasonlóan az emberhez a Paneth sejtek az intesztinális kripták mélyén ülnek, és számos antimikrobiális peptidet termelnek, úgy mint az α -defenzint vagy lizozimot. Ezek az antimikrobiális peptidok a veleszületett immunrendszer immun-modulátorai, melyek a patogen-invázió ellen nyújtanak védelmet és a bél homeostasisát szabályozzák a bél mikrobiota profiljának befolyásolásával. Ismereteink szerint az antimikrobiális peptidok szerepét nem tanulmányozták IBS-es embereknél. A krónikus stressz állatmodelljében (vízelkerülési (adatok publikáció előtt) és anyai szeparációs stresszmodellben egérben az IBS-hez hasonló patofiziológiai folyamatok játszódhatnak le, itt a Paneth sejtek lizozim-expressziójának csökkenése figyelhető meg. Emellett a hasmenéssel járó IBS esetén a széklet szerin-proteáz aktivitása a colon permeabilitásának emelkedésével és szenzitivitásváltozással párosul. A szerin-proteázok eredete kérdéses, de a mikrobiota általi termelődés az irodalmi adatok alapján feltételezhető.

Jelen kutatásunk fő céljai:

1. Meghatározni az intesztinális mucus permeabilitást IBS-ben szenvedő betegekben

egészséges kontroll személyekkel összehasonlítva.

2. Megvizsgálni, hogy a mucus karakterisztika változása specifikus-e IBS-re, illetve kapcsolható-e a klinikai tünetekhez. Kiértékelni, hogy ez az eltérés a betegség biomarkere-e.
3. Megvizsgálni, hogy a mucus defektusa korrigálható-e, ezáltal a mucus potenciális terápiás célpont-e.
4. Meghatározni colon mintákból a muc-2 és muc-4 gének és proteinek expresszióját
5. Leírni, hogy a mikrobiota milyen típusú eltolódása mutatható ki a vizsgált betegpopulációkban.
6. Meghatározni az ilealis mintákban az antimikrobiális peptidek mennyiségét a Paneth-sejtekben.
7. A betegek székletmintájában meghatározni a proteáz aktivitást.

Várt tudományos eredmények:

1. Az IBS-ben szenvedő betegek mucus karakterisztikájának, defenzin szintjének, mikrobiota eloszlásának megismerése. Ezáltal az IBS patofiziológia új aspektusát tárhatjuk fel, mely alapvető újdonság lehet az IBS patogenezisét tekintve. Ez nagy nemzetközi érdeklődést válthat ki, és értékes tudományos publikáció születhet.
2. A betegség új terápiás célpontját tárhatják fel kutatásaink, illetve kimutathatják, hogy az ismert kezelési módok mely csoportok esetében lesznek a leghatékonyabbak. Eredményeink új gyógyszeres fejlesztéseknek nyithatunk utat.

2. A kutatás tudományos megalapozottságát, indokoltságát megalapozó irodalmi hivatkozások megjelölése (elegendő a kutatás irányát jelző néhány irodalmi hivatkozás)

1. Roka, R., et al., A pilot study of fecal serine-protease activity: a pathophysiologic factor in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2007. 5(5): p. 550-5.
2. Gecse, K., et al., Increased faecal serine protease activity in diarrhoeic IBS patients: a colonic luminal factor impairing colonic permeability and sensitivity. *Gut*, 2008. 57(5): p. 591-9.
3. Gecse, K., et al., Leaky gut in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome and inactive ulcerative colitis. *Digestion*, 2012. 85(1): p. 40-6.
4. Annahazi, A., et al., 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. doi: 10.1038/ajg.2013.152. Epub 2013 May 28., 2013.

5. Lidell, M.E., et al., Entamoeba histolytica cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its Cterminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(24): p. 9298-303.
6. van der Post, S., et al., Site-specific O-glycosylation on the MUC2 mucin protein inhibits cleavage by the Porphyromonas gingivalis secreted cysteine protease (RgpB). J Biol Chem. 288(20): p. 14636-46.
7. Corfield, A.P., et al., Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease. Gut, 2000. 47(4): p. 589-94.
8. Kashyap, P.C., et al., Genetically dictated change in host mucus carbohydrate landscape exerts a diet-dependent effect on the gut microbiota. Proc Natl Acad Sci U S A. 110(42): p. 17059-64.
9. Da Silva, S., et al., Stress disrupts intestinal mucus barrier in rats via mucin O-glycosylation shift: prevention by a probiotic treatment. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 307(4): p. G420-9.
10. Dlugosz, A., Winckler, B., Lundin, E., Zakikhany, K., et al., No difference in small bowel microbiota between patients with irritable bowel syndrome and healthy controls. Sci. Rep. 2015, 5, 8508.
11. Balsari, A., Ceccarelli, A., Dubini, F., Fesce, E., et al., The fecal microbial population in the irritable bowel syndrome. Microbiologica 1982, 5, 185–194.
12. Riba, A., Olier, M., Lacroix-Lamande, S., Lencina, C., et al., Microbiota Dysbiosis Induced by Defect of Paneth Cells Triggers Visceral Hypersensitivity in Mice. Gastroenterology 2017, 152, S40.

3. A résztvevők toborzásának, beválasztásának, kizárásának rendszere

A vizsgálatba a Szegedi Tudományegyetem I. sz. Belgyógyászati Klinikán járó vagy fekvőbetegként kivizsgált, irritábilis bélszindrómában (IBS) szenvedő betegeket, illetve azonos életkorú és nemű colorectalis szűrésre jelentkező kontrol lbeteget vonunk be, akiknél alsó tápcsatornai endoszkópia és a vizsgálat közben szövettani mintavétel történik, valamint székletminta gyűjtése zajlik. A vizsgálatból a hasi tünetekre kihatással levő társbetegség illetve elhanyagolt neurológiai vagy cardiovascularis társbetegség kizárást jelent.

4. A kutatásba bevonni kívánt résztvevők száma (összesen és kutatóhelyenként), neme, életkora

A kutatásban résztvevő személyek

10 egészséges, IBS-ben nem szenvedő személy

30 IBS-C beteg

30 IBS-D beteg

30 egészséges személy

A betegek beválogatása a Róma IV Kritériumrendszer alapján történik.

A betegség tüneteit tüneti kérdőívvel rögzítjük.

Szervi betegségeket laboratóriumi tesztekkel (vérkép, kémiai, biokémiai tesztek, TSH, coeliacia szűrés), széklet mikrobiológiai vizsgálatokkal, hasi ultrahang vizsgálattal és colonoscopiával zárjuk ki.

Az iniciális székletmintavétel és colonoscopia után a kezeletlen IBS-ben szenvedő résztvevők 3 csoportba kerülhetnek véletlenszerű módon:

1. dietetikus segítségével 8 hét speciális, úgynevezett „low FODMAP” diétát tartanak
2. 2 hétig rifaximin (3x600 mg napi dózisú) kezeléssel esnek át
3. probiotikum kezelést kapnak 8 héten át.

Ezt követően a 9. héten ismételt székletminta gyűjtést és colonoscopos mintavételt végzünk.

- **Minták:**

1. A beteg székletmintát ad a 0. héten és IBS betegcsoport esetén a 9. héten, melyet fagyasztva tárolunk klinikánkon. A minták egy részét kollaborációs partnerünkhöz küldjük, a minták másik felét klinikánkon elemezzük.
2. A 0. héten és IBS betegcsoport esetén a 9. héten colonoscopia során biopsziás mintát veszünk a terminalis ileumból, coecumból, haránt vastagbélből, szigmabélből és rectumból.
 - a. A biopsziás minták egy részét „Ussing chambers” rendszerben permeabilitási tanulmányokra használjuk fel a mintavétel után azonnal.
 - b. A minták másik részét részben klinikánkon, részben kollaborációs partnereinknél elemezzük, immunhisztokémiai, ELISA és mucus fizikai struktúra analízissel.

4. A kutatás módszerei

- a. A biopsziás minták egy részét „Ussing chambers” rendszerben permeabilitási tanulmányokra használjuk fel a mintavétel után azonnal.
- b. A minták másik részét részben klinikánkon, részben kollaborációs partnereinknél elemezzük, immunhisztokémiai, ELISA és mucus fizikai struktúra analízissel.

6. A kedvezőtlen események és a súlyos nemkívánatos események lehetősége, a bekövetkezésük esetén a követendő eljárások

Az endoszkópia során esetlegesen fellépő szövődmények elhárítására a Klinika endoszkópos laboratóriuma felkészült. Súlyos szövődmény felléptekor azonnal kapcsolat teremthető a klinika fekvőbeteg részlegével, illetve az Intenzív Osztállyal.

7. A résztvevők személyes és egészségügyi adatainak kezelésével kapcsolatos intézkedések (az 1992. évi LXIII. törvény alapján)

A résztvevők adatainak kezelésével kapcsolatban mindenben az 1992. évi LXIII. törvény alapján járunk el, az adatfeldolgozás során a betegek csak sorszámmal szerepelhetnek, adataikat titkosan kezeljük.

8. A kutatás során nyert adatok statisztikai feldolgozásának módszere

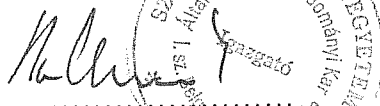

A qPCR eredményeket a $-\Delta\Delta C_t$ módszerrel kalkuláljuk, majd az ELISA és szövettani eredményekhez hasonlóan GraphPad Prism statisztikai program segítségével értékeljük.

Nyilatkozom, hogy a fenti adatok nem sértik a kutatásnak a szellemi alkotások védelmére vonatkozó érdekeit és nem tartalmazznak szakmai- vagy szolgálati titkot, illetve a kutatás érdekeit veszélyeztető adatot. A fenti adatokat bárki, korlátozás nélkül megismerheti. Tudomásul veszem, hogy jóváhagyás után az RKEB a közérdekű adatokat a honlapján közzé teheti.

Szeged, 2018. március 4.



Dr. Róka Richárd, kérelmező

Dr. Ábrahám György, intézetvezető