

**A MIKROBIÓTA KVALITATÍV ÖSSZETÉTELE ALAPJÁN VÉGZETT CÉLZOTT ÉS
STANDARD SZÉKLET MIKROBIÓTA TRANSZPLANTÁCIÓ TERÁPIÁS
JELENTŐSÉGE GYULLADÁSOS BÉLBETEGSÉGBEN**

FK 129266

Bevezetés és célkitűzések. A gyulladós bélbetegségek (CB: Crohn-betegség, CU: colitis ulcerosa) pontos etiológiája még mindig ismeretlen. A jelenlegi szakmai konszenzus szerint a betegség a lumenális antigén expozíció által kiváltott kóros immunválasz következményének tűnik. Az emberi gyomor-bél traktust kolonizáló ezernyi baktériumfajról kimutatták, hogy döntő szerepet játszanak a gasztrointesztinális traktus fiziológiás működésében, legfőképpen az epitél barrierek fenntartásában, valamint a patogén baktériumtörzsek túlszaporodásának gátlásában. Ezen túlmenően kísérletes modellek alapján a bélrendszerben található baktériumok részt vesznek az IBD kialakulásában, amivel összefüggésben az IBD-ben szenvedő és az egészséges kontrollcsoportokban eltérő mikrobióta-összetételről számoltak be. Jelenleg azonban sem a széklet mikrobióta összetételének változása, sem a változás IBD patogenezisében betöltött szerepe nem ismert. Ezért a projektünk egyik fő célkitűzése, hogy meghatározza a különböző kiterjedésű és aktivitású gyulladós bélbetegségben szenvedő betegek széklet mikrobiális összetételét és diverzitását, összehasonlítva egészséges egyének bélflórájával. Jelenleg az IBD-ben alkalmazott terápiák szinte mindegyike a betegség gyulladós és immunológiai komponensét célozza. Az utóbbi években nagy érdeklődés övezi azokat az alternatív kezeléseket, amelyek a bélmikrobióta összetételének módosítását célozzák. Ennek kapcsán felmerült a széklet-mikrobióta transzplantáció (FMT) esetleges alkalmazása az IBD kezelésében, amelynek célja a normális bélmikrobióta helyreállítása egészséges személyek szűrt és hígított székletének bélbe juttatásával. Az utóbbi időben az FMT-t szűrt székletminták felhasználásával végzik, azonban a donor és a recipiens mikrobióta összetételét nem határozzák meg. Jelenleg azonban nagyon kevés tapasztalat áll rendelkezésre az FMT alkalmazásával kapcsolatban IBD-ben, hazánkban pedig az FMT alkalmazása is igen korai stádiumban jár. Ezért projektünk másik célkitűzése az FMT metodikájának kidolgozása és alkalmazása IBD-s betegek körében, ezen belül széklet minták gyűjtése és elemzése egészséges és IBD-s betegektől, az FMT metodika beállítása, valamint FMT alkalmazása esetén a hatékonyságot, biztonságosságot és sikerességet előrejelző tényezők vizsgálata.

A jelentéstételi időszakban elvégzett munkát a COVID-19 járvány és az ennek kapcsán átszervezett gastroenterológiai betegellátás jelentősen befolyásolta. További hátráltató tényező volt, hogy a gyulladós bélbetegek széklettranszplantációja etikai, technikai és járványügyi szempontokat figyelembe véve sem volt megvalósítható tekintettel a SARS-CoV-2 fertőzés széklettel történő átvitelére. Ezek tükrében erőforrásainkat az FMT metodológiájának kidolgozása és a hazai szakmai irányelvek kialakítása mellett az IBD-s betegek mikrobióta összetételének változásra összpontosítottuk. A projekt során összesen 17 publikációnk jelent meg, melyek közül 15 angol nyelvű, 2 pedig magyar nyelvű közlemény. Emellett számos konferencia előadás és egyéb közlemény (pl. szakmai irányelv) született a projekt eredményeiből.

A projekt fő szakmai eredményei:

1. Ahogy bevezetőben említésre került, a mikrobióta IBD-ben betöltött szerepével kapcsolatban számos nyitott kérdés van. Ezért szerettük volna megvizsgálni, hogy a *bélflóra összetételét milyen módon befolyásolja egy bélbetegség típusa és kiterjedése, mely az IBD-ben gyakori rezekciós műtétek miatt kiemelt jelentőséggel bír*. Hypotézisünk az volt, hogy az anatómiai variációk, így például a vastagbél hiánya és ún. IPAA (ileal pouch-anal anastomosis) jelentős hatással van a bakteriális összetételre. A betegek közül 22 korábban colectomián átesett colitis ulcerosa(CU)-s páciens volt, 15 különböző kiterjedést mutató CU-s alany, 6 FAP (familiáris adenomatosis polyposis szindróma)- beteg és ezek mellett 13 egészséges önkéntes mintáját használtuk kontroll csoportként. Szignifikáns különbséget az alfa-diverzitás tekintetében mind az IPAA műtéten átesett CU-s és az egészséges ($p < 0,001$), mind a műtét nélküli CU-s betegek és az egészséges résztvevők ($p = 0,002$) között ki tudtunk mutatni. Csökkent alfa-diverzitást találtunk IPAA műtéten átesett CU-ban a szemben a műtét nélküli CU betegekkel összehasonlítva ($p < 0,001$). A CU-s minták mikrobiótája a dysbiosisra jellemző baktérium családokat tartalmazta, ideértve a butiráttermelő Acidaminococcaceae, továbbá Bacterioidaceae, Porphyromonadaceae, Prevotellaceae, Rikenellaceae, Ruminococcaceae és a Clostridiaceae, valamint a Clostriciaceae nagyszámú előfordulását. A jelentősen csökkent a Bacteroidetes abundanciája a CU-s mintákban. Ezzel szemben a Proteobaktériumok előfordulási gyakorisága mindkét CU-s csoportban magasabb volt, mint az egészséges résztvevőkben. Tehát bakteriális összetételbeli különbségek voltak a mind az intakt vastagbéllal rendelkező, mind pedig a colectomián átesett CU-s betegek esetében az egészségesekhez képest. Azonban nem találtunk szignifikáns különbséget az IPAA műtéten átesett CU-s és a FAP-os betegek mintái közt. Ezek alapján arra következtetünk, hogy a tápcsatornai mikrobiom és az anatómiai státusz együttesen határoz meg egy funkcionális egységet, amely hatással van a diverzításra. Eredményeinket a Q1-es besorolású Pharmaceuticals folyóiratban publikáltuk (IF: 5.215).

2. Egy másik igen kurrens probléma, hogy a gyulladós bélbetegségben szenvedő betegeknél számos esetben megfigyelhető volt a panaszok súlyosbodása kolonoszkópia után. Jelenleg nem áll rendelkezésre információ arra vonatkozóan, hogy a rutin eljárásnak számító béltükrözés előtti bélelkészítés befolyásolhatja-e a széklet mikrobiom összetételét. Ezért megvizsgáltuk a széklet mikrobióta összetételének rövid- és hosszú távú változásait IBD-s betegek és egészséges kontrollok körében, amelyet a nátrium-pikoszulfáttal és magnézium-oxidral történő bélkészítmény befolyásol. A vizsgálatba olyan IBD-s betegeket vontunk be, akiket kolonoszkópiára készítettünk elő. A kontrollcsoport (HC) nem IBD-s betegekből állt, akik kolonoszkópián estek át. Klinikai adatokat, vér- és székletmintákat gyűjtöttek a kolonoszkópia előtt (A időpont), 3 nappal (B időpont) és 4 héttel a kolonoszkópia után (C időpont) a betegség aktivitásának és a bélmikrobióta változásainak felmérésére. A széklet mikrobióta szerkezetét - család szinten - a 16S rRNS gén V4 régiójának szekvenálásával határoztuk meg. A statisztikai elemzés magában foglalta a differenciált abundanciaelemzést és a Mann-Whitney-tesztet. 41 beteget (9 CD, 13 UC, 19 HC) vontunk be vizsgálatunkba. A bélelkészítést követően a CD csoportban az alfa-diverzitás alacsonyabb volt az UC ($p=0,01$) és a kontrollcsoportéhoz ($p=0,02$) képest a B időpontban. Az UC betegek alfa-diverzitása szignifikánsan magasabb volt, mint a CD ($p<0,01$) és a kontroll ($p=0,03$) csoportban a C időpontban. Az UC betegek alfa-diverzitása nőtt az A és C időpont között ($p=0,04$). A béta-diverzitás különbséget mutatott az IBD-csoportok és a kontrollcsoport között ($p=0,001$). A CD betegek béta-diverzitása azonnal (az A időponttól a B időpontig) megváltozott ($p=0,03$), míg

az UC betegek béta-diverzitása folyamatosan változni látszik az A időponttól a C időpontig ($p=0,03$). A differenciált abundanciaelemzés alapján a Clostridiales és a Pseudomonadaceae családokba tartozó baktériumok mennyisége nőtt, míg a Bifidobacteriaceae, a Carnobacteriaceae, a Veillonellaceae és a Pasteurellaceae családokba tartozó mikrobák mennyisége csökkent a CD betegeknél a HC-hoz képest a B időpontban. A HC csoportban a Brucellaceae, a Moraxellaceae és az Alcaligenaceae családok abundanciája növekedett a legnagyobb mértékben az A időponttól a B időpontig. Eredményeink arra utalnak, hogy a bélkészítmény jelentős változást eredményezhet a széklet mikrobiális összetételében az IBD-ben: a mikrobiális változások az UC betegeknél korábban helyreállnak, míg a csökkent alfa-diverzitás és a megváltozott abundancia a CD-ben potenciális szerepet játszhat a betegség súlyosbodásában a béltisztítás után. Kutatási eredményeink publikálása folyamatban van.

3. Arra vonatkozóan, hogy befolyásolja-e a zsigeri zsírtömeg a bélflóra összetételét, szintén nem áll rendelkezésre információ. **Hypotézisünk** szerint a *viscerális zsírtömeg összefügg a proinflammatorikus citokinekkal és a tápcsatornai mikrobiótával*, így azok befolyásolni képesek a gyulladás mértékét, aminek klinikai relevanciája lehet a gyulladásos bélbetegségek menedzsmenete során. Széklet és szérum mintavétel mellett táplálkozási kérdőívet töltöttek ki a betegek. A bevonás idején colonoscopus vizsgálattal a nyálkahártya gyulladás mértékét határoztuk meg. Minden beteg InBody770® testösszetétel analízis mérése is megtörtént. A szimultán többfrekvenciás bioelektromos teljes test impedancia mérés során (InBody770®) meghatározható a teljes test vízmennyiség, egyes vízterek, testzsírtömeg, száraztömeg, izomtömeg. A készülék működése szimultán többfrekvenciás bioelektromos impedancia mérésen alapszik, a testet öt hengernek tekinti, így biztosítja a pontos méréseket. Méri a test összetételét (teljes víztömeg, testzsír, protein, ásványi anyagok), zsigeri zsírtérületet, emellett izom-zsír analízist, elhízás analízist (BMI, testzsír százalék), szegmentált lágyrész és szegmentált zsír analízist végez. Méri továbbá az extracelluláris és intracelluláris vízmennyiséget, alapanyagcsere mértékét, derék-csípő arányt. A mikrobióm-kutatások jelenleg forrongó témaköre az orvos-mikrobiológiai tudományos életnek, és pillanatnyilag az Illumina szekvenálás és shotgun könyvtárkészítés a legmodernebb és precízebb módja a metagenom analízisnek, így ezt a rész-projektet már ezzel az új forradalmi módszerrel készítettük el. Ez egy korszerű molekuláris biológiai módszer speciális és költséges műszer felszereltséggel, melyhez rendkívül szofisztikált informatikai háttér is szükséges. 35 Crohn-beteg került bevonásra, akik közül végül 27-en feleltek meg a bevonási kritériumoknak. A bevont betegek a BMI alapján nagyjából fele-fele arányban normál testtömegűek és elhízottak voltak. Legfontosabb eredményeink: CD aktivitásával butirát-termelő baktériumok-Blautia, Roseburia fajok- abundanciája csökkent, melyek a veszélyes immunítást modulálják és segítik a bélnyálkahártya normál működését. Klinikai, biokémiai és endoszkópos aktivitás esetén dysbiotikus elemek jelentek meg, bizonyos fajok abundanciája csökkent, pl. Blautia obeum, Roseburia hominis. Obesitásban szignifikánsan gyakoribb volt a B2-B3 betegség típus ($p=0,036$), tehát egy szövődményes betegségformára hívja fel a figyelmet. Koleszterin szint összefüggést mutat C.innocuum-al, mely korábbi irodalmi adatok alapján transzlokációval a mesenterális zsírszövetbe jut és kapcsolatot mutat a „creeping fat” jelenséggel. Triglicerid szint fordítottan arányos Bifidobacterium longum és Adlercreutzia equolifaciens-el. Viscerális zsír mennyisége és testzsír % fordítottan arányos az anti-inflammatorikus eqoult és butirátot termelő Adlercreutzia equolifaciens, Roseburia hominis baktériumokkal. A Blautia, Lactobacillus, Adlercreutzia, Clostridium innocuum, Roseburia hominis és Bifidobacterium abundanciájának változása CD-s és obes betegeknél rávilágít a lipidanyagcsere, a zsírszövet tömege és a krónikus gyulladás közötti

összefüggésekre. Ezek potenciális faktorok lehetnek új terápiás megközelítések kidolgozásában, mint például a személyre szabott pre- vagy probiotikumok vagy a széklet mikrobiota transzplantációja. Továbbá, szerepük lehet a betegség prognózisának korai felismerésében és terápia hatékonyságának előrejelzésében is. Kutatási eredményeink publikálása folyamatban van.

4. A projekt kapcsán megkezdtük az FMT IBD-ben történő alkalmazásának előkészítését. *Autológ és heterológ széklettranszplantációhoz* remisszióban levő betegeknek és egészséges önkénteseknek felkínáltuk a lehetőséget, hogy részt vegyenek a kutatásban. Részletes szóbeli és írásbeli tájékoztatást követően, mintavétel és adatok rögzítése történt, azonban az eddigiek során még nem volt lehetőség a széklettranszplantáció kivitelezésére, de a tápcsatornai mikrobióm meghatározása folyamatban van. Amennyiben minden körülmény megengedi, akkor egy kiváló technológia segítségével tudjuk a széklettranszplantációhoz előkészíteni a mintavételi anyagot. A BagMixer 400 S® zacskós homogenizátor egy nagy hatékonyságú homogenizátor, mely szilárd halmazállapotú minták homogenizálásához használható. Az ezen készülékkel kompatibilis steril zacskó, a BagFilter S® révén a homogenizátor belseje nem érintkezik a mintával. A BagFilter S® belsejében egy 250 mikronnál kisebb oldott anyagok átengedésére alkalmas szűrő található. Az így elkészített homogenizátumhoz cryoproteció céljából gliceroltadtunk hozzá, majd fagyasztva tároltuk.

5. A széklet mikrobióta transzplantáció sikeres alkalmazása elsősorban Clostridioides difficile fertőzések kezeléséhez köthető, de számos tudományos adat szól amellett, hogy gyulladással járó bélbetegségekben is hatékony lehet, ezzel egy új költséghatékony és kedvező mellékhatás profilú terápiás eszközt adva a kezünkbe. Munkacsoportunk szakmai irányelv kidolgozását initiálta, mely hiánypótló a témában, és célja egy magyar nyelvű útmutató volt a széklettranszplantáció indikációról, kivitelezéséről, melyet nemcsak gasztroenterológusok, de infektológusok, sebészek és intenzív osztályos orvosok is tudnak használni a mindennapi betegellátás során. A szakmai irányelv 2020-ban jelent meg „Az Emberi Erőforrások Minisztériuma egészségügyi szakmai irányelve a hagyományos széklettranszplantációs eljárás kivitelezéséről” címmel, melynek megírásában aktív résztvevők voltunk.

6. *A mi klinikai gyakorlatunkban is többször bizonyította hatékonyságát a széklettranszplantáció. Heterológ széklettranszplantációt* végeztünk gyulladással járó bélbetegségben szenvedő betegeknél is, többnyire terápia refrakter vagy terápia rezisztens Clostridioides difficile colitis indikációjával. **Esetbemutató:** 44 éves, primer biliaris cirrhosis, illetve colitis ulcerosa miatt gondozott beteget terápia refrakter Clostridioides infectio miatt széklet mikrobiota transzplantáció céljából vettük fel Gasztroenterológiai Osztályunkra (Esetszám.: 54831729). Ezt megelőzően területileg illetékes Sürgősségi Osztályon észlelték 2022.01.06-07. között 1 hete tartó híg székletürítés és alhasi görcsös fájdalom miatt, majd első hospitalizációja kapcsán C. difficile infekció igazolódott, emiatt per os Vancomycin kezelést kezdtünk. Colonoscopia minimális aktivitást mutatott a teljes vastagbélben. Az antibiotikus kezelés ellenére állandósult görcsös alhasi fájdalom, napi 10-15, híg hasmenéses széklet és továbbra is fennálló C.difficile pozitivitás miatt ismét hospitalizáltuk. Nasoduodenalis szondán keresztül két alkalommal (60 ml-nyi, majd 30 ml-nyi fagyasztott homogenizátum felhasználásával) szövődménymentes széklettranszplantációban részesült. A beavatkozást

követően székletszáma jelentősen redukálódott, a beteg panaszai megszűntek, és jelenleg is remisszióban van colitis ulcerosa tekintetében is.

Összegzés. A projekt során jelentős eredményeket sikerült elérnünk, melyek segítik a széklet mikrobiom szerepének megértését IBD-ben. Több eredményünk, pl. a bélelőkészítés hatása a széklet mikrobiom összetételére, jelentős gyakorlati haszonnal is bír, hiszen a változások ismeretében lehetővé válik a komplikációk megelőzése a napi betegellátási gyakorlatban. Emellett jelentős előrelépéseket sikerült elérnünk az FMT hazai alkalmazásával kapcsolatban, továbbá a metodika beállításra került és a gyűjtött minták révén rendelkezésre álló pool további vizsgálatokhoz nyújt majd alapot.