

**A GENETIKAI (ATGL16L1, IL23R ÉS NFKB) ÉS KLINIKAI
FAKTOROK SZEREPE A GYULLADÁSOS
BÉLBETEGSÉGEK PATOGENEZISÉBEN ÉS
LEFOLYÁSÁBAN**

PhD értekezés

Dr. Szamosi Tamás

Molekuláris Orvostudományi Doktori Iskola
Semmelweis Egyetem



Témavezető: Dr. Lakatos Péter László egyetemi adjunktus, PhD

Hivatalos bírálók:

Dr. Garami Miklós egyetemi docens, PhD

Dr. Rosztóczy András egyetemi adjunktus, PhD

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Bánhegyi Gábor egyetemi tanár, DSc

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Kiss András egyetemi docens, PhD

Dr. Rakonczay Zoltán tudományos főmunkatárs, PhD.

Budapest, 2012.

Bevezetés

A krónikus gyulladós bélbetegségek ismeretlen etiológiájú csoportját az angol nyelvű szakirodalom „inflammatory bowel disease” (IBD) néven említi. Az értekezésben a gyulladós bélbetegség kifejezést ilyen értelemben használom. Két jól körülhatárolható betegség sorolható ide a colitis ulcerosa (CU) és a Crohn betegség (CB).

Mindkét kórkép multifaktoriális, melyek hátterében mai tudásunk szerint genetikai szempontból fogékony egyénben, valamilyen enterális antigénre a bélrendszer nyálkahártyájában létrejövő, a normálistól eltérő immunválasz áll, mely során az immunrendszer szabályozási zavara önfenntartó gyulladáshoz és szöveti károsodáshoz vezet. A betegség etiológiájában az immuntolerancia kialakulásának zavara is feltételezhető. Jelenleg nem ismerünk egyetlen, a betegség kialakulását magyarázó, önálló etiológiai tényezőt.

Az IBD etiopatogenezisének megértésében jelentős szerepet tölt be a hajlamosító genetikai variációk azonosítása és azok a betegség kialakulásában és lefolyásában betöltött szerepének megismerése. A genetikai háttér feltérképezése egyben javíthatja terápiás lehetőségeinket is.

Az IBD incidenciája azonban gyorsan változik, ami felhívja a figyelmet a környezeti hatásokra, melyek jelentős módosító szerepet játszhatnak a betegség kialakulásában és lefolyásában, emellett terápiás konzekvenciákkal is járhatnak.

A környezeti tényezők közül a bélflóra és a dohányzás szerepe tűnik leginkább igazoltnak, de még ezek hatásának pontos mechanizmusai, illetve az egyes tényezők és a klinikai fenotípus, valamint a betegek kezelésre adott válaszával (sebészi beavatkozás szükségessége, gyógyszer hatékonyság) való esetleges összefüggései sem tisztázottak.

A betegség egyik formájának kiváltó oka sem ismert, így oki terápia jelenleg nem lehetséges. A kezelés jelentős mértékben empirikus alapokon nyugszik. A klinikai kutatás eredményeinek köszönhetően azonban az évtizedek óta eredményesen alkalmazott gyógyszerek hatásmechanizmusát egyre mélyebben ismerjük, emellett az utóbbi években kifejlesztett ún. „biológiai” szerek tudatosan, a patogenezis egyes, már megismert elemeit célozzák. Az IBD mindkét formája általában élethossziglan tartó részben gyógyszeres, részben tüneti, gyakran sebészi kezelést igényel. CU-ban a betegek 80-85%-ában lehet javulást elérni, CB-ben a betegek 60-70%-ában. A klinikai kép változásai, a kezelésekre adott reakciók és a molekuláris genetikai vizsgálatok eredményei közötti kapcsolat analízise nyomán több beteg eredményes kezelése várható.

Célkitűzés

Vizsgálataink célja

- 1) a krónikus gyulladós bélbetegségek kórlefolyását befolyásoló genetikai, környezeti és klinikai faktorok tanulmányozása magyar betegekben, különös tekintettel egyes molekuláris genetikai tényezők és a dohányzás hatásainak megítélésére.
- 2) Kapcsolat keresése egyfelől a genotípus, másfelől a dohányzás és a klinikai fenotípus között, illetve azok az alkalmazott kezeléssel (sebészi beavatkozás szükségessége, gyógyszer hatékonyság) való összefüggéseinek tanulmányozása.

Fentiek alapján dolgozatom egyes genetikai mutációk esetleges összefüggéseit vizsgálja a gyulladós bélbetegség rizikójával, a klinikai

fenotípussal, a gyógyszeres terápia kimenetelével és a reszekciós műtéti beavatkozások szükségességével, így

- az NFKB1 -94ins/delATTG és az NFKBIA 3'UTR mutációk jelentőségét,
- valamint az ATG16L1 és IL23R mutációk jelentőségét a fenti összefüggésekben.

A környezeti tényezők közül a dolgozatban a dohányzás, valamint a betegség fenotípusa, a gyógyszeres kezelés és a sebészeti rizikó közötti komplex összefüggéseket tanulmányozzuk, különös tekintettel a dohányzás és az agresszív gyógyszeres kezelés szerepének vizsgálatára a szövődményes betegségforma megjelenése és a sebészeti igény előrejelzése szempontjából.

Betegek és módszerek

• Vizsgált személyek és definíciók

Genetikai vizsgálatainkban 415 egymással nem rokon IBD-ben szenvedő beteg (CB/CU: 266/149, CB esetén az átlagos életkor $35,2 \pm 12,1$ év, a nemek aránya: 130 férfi, 136 nő, a diagnózistól eltelt idő, mint a betegség fennállásának időtartama $8,7 \pm 7,6$ év. CU esetén az az átlagos életkor $44,5 \pm 15,4$ év, a nemek aránya: 73 férfi, 76 nő, a betegség fennállásának időtartama $10,7 \pm 8,9$ év) mintáit vizsgáltuk. Kontroll csoportként 149 hasonló korú (72 férfi, 77 nő, átlagos életkor $37,9 \pm 10,9$ év) egészséges, emésztőszervi- vagy májbetegségben nem szenvedő budapesti, illetve szegedi véradó mintái szolgáltak. Bevonási kritérium volt a legalább egy éve felállított diagnózis. A diagnózist a Lennard-Jones kritériumok alapján állítottuk fel. Mind a betegek, mind az egészséges véradók kérdőívet töltöttek ki. A kérdőíveken rákérdeztünk az észlelt extraintesztinális

manifesztációkra, mint a szemészeti szövődmények (uveitis, iridocyclitis), bőrgyógyászati betegségeket (erythema nodosum, pyoderma gangrenosum), perifériás vagy axiális ízületi manifesztációk vagy a primer sclerotizáló cholangitis. A betegség fenotípusát a bécsi klasszifikáció alapján határoztuk meg. A beteg életkorát a diagnózis felállításakor, valamint CB-ben a felső gastrointesztinális, illetve a perianalis érintettséget a montreali klasszifikáció alapján értékeltük. Vizsgáltuk az esetleges családi halmozódást és a dohányzási szokásokat. Az IBD-ben alkalmazott kezelések vizsgálata során a dokumentáció áttekintése és a kérdőív adatai alapján vizsgáltuk az egyes gyógyszercsoportok alkalmazását és az azokra adott terápiás választ. A szteroidra adott válasz, illetve rezisztencia meghatározását, valamint az AZA intoleranciát az Európai Crohn és Colitis Társaság által elfogadott és nemrég közölt kritériumok alapján állapítottuk meg. Azathioprin (AZA) kezeltnek tekintettük a beteget, ha több mint 1,5 mg/testsúlykg dózisban legalább 6 hónapig kapott az AZA tartalmú készítményt. Biológiai terápia használatáról beszéltünk, ha a beteg legalább egy teljes anti-TNF α indukciós kezelést (5 mg/testsúlykg, 0., 2. és 6. héten) kapott, megfelelő adagban. Az infliximab indukciós kezelésre adott választ a kezelést követő 8. héten vizsgáltuk. Részleges hatékonyságnak neveztük, ha a CDAI pont több mint 70 ponttal csökkent és/vagy a drenált fisztulák száma 50%-kal csökkent. Teljes remisszióról akkor beszéltünk, ha a CDAI pont 150-nél kisebb, vagy az összes fisztula bezárult.

A dohányzás, mint környezeti faktor, valamint a betegség fenotípusa, a gyógyszeres kezelés és a sebészeti rizikó között esetleg fennálló komplex összefüggés vizsgálata során 681 gyulladós bélbeteg adatait elemeztük (CD: 340, férfi/nő: 155/185, betegség fennállása: 9,4 \pm 7,5 év; UC: 341, férfi/nő:174/164, betegség fennállása: 11,5 \pm 9,7 év.)

A klinikai paraméterek feldolgozása során használt definíciók megegyeztek a genetikai vizsgálatoknál leírtakkal. A vizsgálatokba az intézményekben folyamatosan követett gyulladásoos bélbetegeket vontunk be. Korai AZA használatról beszéltünk, ha az immunmodulátor kezelés legalább 6 hónappal megelőzte a sebészeti beavatkozást. A vizsgálatokban résztvevő központok mindennapi gyakorlatának megfelelően az AZA kezelés felfüggesztését akkor sem kezdeményeztük, ha a beteg hosszú ideig tartós remisszióba került. Dohányzónak tekintettük a beteget, ha legalább átlagosan heti 7 cigarettát elszívott, minimum 6 hónapon át a diagnózis felállításakor és/vagy a követés során a sebészeti beavatkozás előtt 1 éven belül. A betegek dohányzási szokásának és a dohányzási szokás megváltozásának a felmérése, a klinikai aktivitás, a betegség fenotípus, a gyógyszeres kezelés és ezek változásának, illetve a sebészeti beavatkozás időpontjának és típusának rögzítése a betegek kontrollja során, folyamatosan történt. A dohányzás abbahagyásáról akkor beszéltünk, ha legalább egy éve tartott a teljes absztinencia. A vizsgálat alatt viszonylag kisszámú (16 CB-ben és 3 CU-ban szenvedő) beteg hagyta abba a dohányzást, és 2 Crohn-beteg kezdett dohányozni. Tekintettel arra, hogy irodalmi adatok alapján a reoperációs arány az ex-dohányosokban és nem dohányzóknban nem különbözik, így ezeket a betegeket a reoperáció szempontjából a nem dohányzó betegekkel együtt értékeltük. A diagnóziskor az ex-dohányosokat hasonló okból szintén a nem dohányzó betegekkel együtt elemeztük. .

- **Genetikai vizsgálati módszerek**
- **DNS izolálás**

A betegek véréből genomikus DNS-t izoláltunk nagy tisztaságú PCR templát preparációs kittel.

- **NFKB mutációk vizsgálata**

Az NFKB1 promoter (rs28362491) és a NFKB1A 3' UTR polimorfizmusát restriktációs fragment hosszúság polimorfizmus (RFLP) módszerrel vizsgáltuk. Az NFKB1 gén promoter régiójában levő -94ins/delATTG polimorfizmus meghatározására egy 289 bp PCR fragmentumot amplifikáltunk és *Van9II*-el emésztettük, aminek eredményeként -94delATTG jelenlétében két fragment (254 és 35), míg -94insATTG jelenlétében 3 fragment (206, 48 és 35 bp) keletkezett. Az NFKB1A gén 3'UTR (G/A) esetében egy 426 bp fragmentum volt amplifikálva és *HaeIII*-mal emésztve, amely csak a G-t tartalmazó allélt bontotta két fragmentre (308, 118 bp). Mindkét szekvencia variánsra vonatkozóan a kapott fragmenteket 2,5%-os agaróz gélen szeparáltuk és megfestettük etidium bromid festékkel.

- **IL23R és ATG16L1 mutációk meghatározása**

Az IL23R (rs11209026, R381Q, c.1227G>A) és ATG16L1 (rs2241880, T300A, c.1338A>G) polimorfizmusok vizsgálatához a genotipizálást LightCycler (Roche diagnosztika) műszer segítségével végeztük saját magunk által beállított asszimmetrikus PCR alkalmazásával olvadáspont meghatározáson alapuló módszerrel. Az amplifikációs primerekhez és a hibridizációs próbák tervezéséhez LightCycler Probe Design softwaret (Roche Diagnosztika), illetve Primer 3 primer Design softwaret használtunk. Minden oligonukleotidot az Integrated DNA Technologies (Coralville USA) állított elő. A PCR-t rapid cycling módszerrel üveg kapillárisban végeztük. A reakció elegy 10 µl volumenben 50 ng genomikus DNS, 5 µl 2x PCR Master Mix (Promega) 0,7 egység Taq DNS polimeráz (Finnzyme, Espoo, Finnország), 1,5 mmol/l MgCl₂ és 2

pmol jelölt oligonukleotid (szenzor és anchor) jelenlétében volt. Az aszimmetrikus PCR-t jelöletlen amplifikációs oligonukleotidok kompozíciójában alkalmaztuk (1,5:5 pmol előre és vissza amplifikációs arány az ATG16L és 5:1,5 arány az IL23R esetében). A következő ciklikus állapotok voltak: 2 perc 94 C° kezdeti denaturáció, ezt követően 70 denaturációs ciklus 94 fokon majd 55 fok 10 másodpercig az ATG 16LI és 50 fok 10 másodpercig az IL23R változatok esetében és kiterjesztés 70 fokra 15 másodpercig egy 20 fokos emelkedő aránnyal. Amplifikáció után olvadási görbe analízist végeztünk, a minták 45 fokra hűtését követően, fokozatos melegítés során 85 fokig 0,1 fok/mp rátával. A fluoreszcencia csökkenését állandóan monitorizáltuk. Az olvadási görbéket olvadási csúcsokba transzformáltuk a vad típusok és a variáns allélek megkülönböztetése érdekében. Az eredményt két független megfigyelő olvasta le.

Statisztikai módszerek

A minták normál eloszlását Shapiro Wilk's W teszttel ellenőriztük. A genetikai tanulmányoknál χ^2 -teszt segítségével vizsgáltuk a genotípus frekvenciák eltérését a Hardy-Weinberg egyensúlytól (szabadság fok: 1). Az IBD-ben szenvedő betegek alcsoportjai, illetve az IBD-ben szenvedő betegek és a kontrollok adatai közötti különbségek vizsgálatokor kétmintás t-próbát, illetve χ^2 próbát, helyenként annak Yates korrekciójával használtuk, esélyhányadost (odds ratio = OR) és 95%-os megbízhatósági intervallumot (95%CI) számoltunk. A folyamatos tényezők varianciaanalízise során ANOVA-t használtunk post hoc Scheffe-teszt alkalmazásával, illetve skálatípusú változók esetén Pearson- vagy Spearman-féle rangkorrelációt számoltunk. A többszörös tesztelésből adódó esetleges hibák elkerülése érdekében Bonferroni korrekciót alkalmaztunk. A

bináris tényezők multivariancia analizisét logisztikus regresszióval végeztük el, a különbségeket p értékben és OR-ben fejeztük ki. Ilyenkor minden esetben korrigáltuk a kapott értéket a betegségfennállás idejéhez. Az egyes faktorok összefüggését a betegség időbeni lefolyásával a fentiekben túl Kaplan-Meier analizisben, a különböző alcsoportok szignifikanciáját LogRank illetve Breslow tesztek segítségével vizsgáltuk. A túlélés független befolyásoló tényezőinek megítélésére „forward stepwise” Cox regresszió analizist használtunk (pl. az egyes klinikai faktorok és a sebészeti beavatkozás szükségességének összefüggését vizsgálva). A multivariancia analizisekbe azok a tényezők kerültek beválasztásra, melyek az univariációs analizisben $p < 0,1$ értéket adtak, emellett egyes előzetesen kiválasztott tényezők is bevonásra kerültek. Amennyiben nincs külön más kritérium jelezve a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. A nyers adatokat átlag \pm szórás, medián (kvartilis) illetve n (%) formában adtuk meg.

A statisztikai analizisek végzésére SPSS 13.0, illetve 15.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA) softwaret használtunk, statisztikus segítségével (Dr. Vargha Péter).

Eredmények

- **Az IBD és a vizsgált génpolimorfizmusok kapcsolata**
- **Az NFKB1-94ins/delATTG és az NFKBIA 3'UTR polimorfizmus**

A vizsgált polimorfizmusok Hardy-Weinberg egyenlőségben voltak (HWE $P=0,63-0,96$). Az NFKB1 -94ins/delATTG, illetve az NFKBIA 3'UTR variánsok sem a genotípus, sem az allélfrekvencia tekintetében nem különböztek CB-ben és CU-ban a kontrollokhoz, vagy egymáshoz hasonlítva, továbbá nem volt interakció az NFKB1-94ins/delATTG és a NFKBIA 3'UTR polimorfizmus között a magyar betegekben. A *CU-ban*

szenvedő betegekben az NFKBIA 3'UTR GG hordozása gyakoribb volt extenzív colitisben ($P= 0,003$, $OR_{GG \text{ vs } AA/AG} 2,97$, $CI95\% 1,45- 6,08$). A kapcsolat Bonferroni korrekció után is szignifikáns maradt. CB-s betegekben az NFKBI -94ATTGdel allél hordozása gyakori relapszusokkal (54,3 a 31,3%-kal szemben $P<0,0001$, $OR 2,61$, $CI95\% 1,57- 4,33$), és fokozott arthritis rizikóval járt együtt, utóbbi kapcsolat azonban multivariancia analízis során nem igazolódott.

Fentiekén kívül megvizsgáltuk CB-ben szenvedő betegekben az esetleges kapcsolatot az NFKB1 -94ins/delATTG, illetve az NFKBIA 3'UTR variánsok hordozása és a szteroid, illetve infliximab kezelésre adott válasz, valamint a sebészeti beavatkozás szükségessége között. 47 egymással rokoni kapcsolatban nem álló CB-s, infliximab kezelésben részesült beteget (24 férfi, 23 nő, életkor $33,2\pm 11,6$ év, a betegség fennállásának tartama $7,6\pm 4,7$ év) vizsgáltunk. A betegség 2 esetben ilealis, 19 esetben colicus és 25 esetben ileocecalis, 3 esetben felső gasztrointestinális lokalizációjú volt. A fenotípus 17 esetben gyulladásozó, 30 esetben penetráló volt. Perianális érintettséget 27 betegnél találtunk. Csaknem minden beteg kombinált immunszuppresszív kezelést (szteroid és AZA) kapott (szteroid 93, 6%, AZA 93.6%). A polimorfizmusok és a 8 hetes infliximab kezelésre adott válasz, illetve a szteroid rezisztencia, valamint a műtétek szükségessége között összefüggés nem volt észlelhető. A reoperációs arány sem különbözött a polimorfizmusok tükrében.

- **Az ATG16L1 és IL23 receptor (IL23R) gének szerepe**

A vizsgált polimorfizmusok Hardy-Weinberg equilibriumban voltak ($HWE p = 0,38-0,95$). A genotípus frekvencia mind az *IL23R Arg381Gln* ($p = 0,018$), mind az *ATG16L1 Thr300Ala* ($p = 0,027$) esetén szignifikánsan különbözött a CB-ben szenvedő betegek és a kontrollok között. Az *ATG16L1*

300Ala/Ala ($p = 0,037$) genotípus és a variáns Ala allél hordozása (58,1% vs. kontroll: 50,0%, OR: 1,39, 95% CI: 1,05-1,85) esetén fokozott volt a CB kockázata. A variáns IL23R allél ($p = 0,018$) evvel szemben protektívnek bizonyult a CB kockázata szempontjából. Homozigóta IL23R variáns allélt hordozó egyén nem fordult elő a vizsgált populációban.

CU-ban az adatok hasonló tendenciát mutattak, de szignifikáns kapcsolat nem volt igazolható ($p = \text{NS}$). Nem volt kimutatható kapcsolat az ATG16L1 Thr300Ala és a IL23R Arg381Gln polimorfizmusok között sem a magyar betegekben.

Statisztikailag szignifikáns kapcsolatot tudtunk kimutatni CB-ben az IL23R 381Gln allél hordozása és a gyulladásos betegségforma között ($p = 0,037$). Az ATG16L1 300Ala allélre homozigóta betegekben a csak vastagbélre lokalizálódó Crohn-betegség gyakorisága ($p = 0,036$, OR_{Ala/AlaAvastagbél}: 1,83, 95% CI: 1,04-3,25,) mutatott szignifikáns eltérést. Egyéb statisztikailag szignifikáns fenotípus-genotípus kapcsolatot nem tudtunk kimutatni az IBD egyik formájában sem.

Vizsgáltuk az esetleges kapcsolatot az IL23R Arg381Gln és ATG16L1 Thr300Ala variáns allél jelenléte és az infliximab indukciós kezelésre adott klinikai válasz között. Az infliximab kezelték adatait az NFKB1 -94ins/delATTG, illetve az NFKBIA 3'UTR polimorfizmusok vizsgálatánál részleteztük. A klinikai választ a 8. héten mérve az ATG16L1 300 Thr variáns hordozása és az infliximab indukcióval szembeni terápia rezisztencia között tendenciaszerű kapcsolat volt kimutatható. Nem tudtunk azonban kapcsolatot kimutatni a vizsgált mutációk és a szteroid rezisztencia, reszekciós műtéti igény, illetve a reoperációk gyakorisága között.

CU-ban sem volt összefüggés kimutatható az IL23R Arg381Gln és ATG16L1 Thr300Ala variáns allél jelenléte és a szteroid

kezelés/rezisztencia, az AZA kezelés gyakorisága, valamint a colectomia gyakorisága között.

A környezeti tényezők, valamint a betegség fenotípusa, a gyógyszeres kezelés és a sebészeti rizikó közötti komplex összefüggések vizsgálata

- **A dohányzás gyakorisága IBD-ben és kapcsolata a klinikai fenotípussal**

CB-ben a vizsgált betegek 45,5%-a, míg CU-ban 15,8%-a dohányzott a diagnózis felállításakor. CB-ben a dohányzás kapcsolatot mutatott a betegség viselkedésének megváltozásával (dohányzó betegekben B1-ről B2/B3-ra: 38,6% vs. nem dohányzó: 25,2%, OR: 1,86, 95% CI: 1,02-3,46) és a reszekciós műtéti igénnyel (dohányzóknál: 52,9% vs. nem dohányzó: 41,2%, OR: 1,61, 95% CI: 1,04-2,48), míg a reoperációk gyakorisága nem volt különböző. A betegség fennállásának ideje ugyanakkor nem különbözött dohányzóknál ($9,2 \pm SD 7,2$ év) és nem dohányzóknál ($9,5 \pm SD 7,7$ év). A diagnózis pillanatában a dohányzás nem állt kapcsolatban a nemmel, a lokalizációval és a betegség viselkedésével.

CU-ban ha a beteg dohányzott a diagnóziskor, akkor a későbbi colectomia esélye alacsonyabbnak bizonyult (0% vs. 6,6%, $p = 0,05$). A klinikai képpel való kapcsolatot CU-ban nem tudtuk kimutatni.

- **Az agresszív kezelés gyakorisága a gyulladásozó bélbetegekben, illetve kapcsolata a klinikai fenotípussal**

CB-ben a betegek 46,2%-a részesült azathioprin (AZA) kezelésben legalább 6 hónappal az első reszekciós sebészeti beavatkozást megelőzően, míg a teljes AZA expozíció 63,5% volt. Ezen túl a 36 beteg AZA intoleránsnak bizonyult (14,3%), őket az azathioprin kezelésben nem részesült betegekkel értékeltük együtt. Biológiai kezelésben (infliximab vagy adalimumab) az

első sebészeti beavatkozást megelőzően csupán a betegek 10,9%-a, míg a teljes követés során a betegek 20,9%-a részesült. Az első sebészeti beavatkozás előtt csupán 7 beteg részesült biológiai monoterápiában, míg a teljes követés során 13. CU-ban a betegek 21,2%-a részesült AZA kezelésben, biológiai kezelés alatt álló a vizsgálati populációban nem volt.

CB-ben a korai AZA illetve AZA/biológiai kezelés gyakoribb volt L3 lokalizációban (54,8% és 55,9% vs. 41% és 40,8%, $p = 0,001$ és $p < 0,001$). *A betegség súlyosbodását (B1- ről B2/3-ra változását) a korai AZA, illetve AZA/ biológiai kezelés alkalmazása után ritkábban észleltük* (23,3% és 23,1% vs. 38,9% és 40,0%, OR_{AZA} : 0,48, 95%CI: 0,29-0,88 és $OR_{AZA/biológiai}$: 0,45, 95%CI: 0,24-0,84).

A dohányzási szokásokat a korai AZA/biológiai kezeléssel együtt vizsgálva, a két tényező kombinációja kapcsolatot mutatott az ileocolicus lokalizációval (nem dohányzó, nincs AZA/biológiai kezelés: 43,6%, vs. nem dohányzó, de kap AZA/biológiai kezelést: 51,6% vs. dohányzó, nincs AZA/biológiai kezelés: 37% vs. dohányzó és AZA/biológiai kezelt: 58,3%, $p < 0,001$).

- **A korai azathioprin/biológiai kezelés kapcsolata a szövődményes betegségforma kialakulásával CB-ben**

Univariációs analízis során kapcsolatot tudtunk kimutatni a CB szövődményes betegségformába progrediálása (B1-ről B2/B3-ra) és a betegség fennállási ideje, a perianális érintettség, a diagnózis pillanatában fennálló dohányzási szokások, a relapszusok száma, a szteroid igény, az AZA és AZA/biológiai kezelés illetve a reszekciós műtéti kezelés között. Bár a szemészeti manifesztáció szintén kapcsolatot mutatott a lefolyás változásával (3,6% vs. 11,5% $p=0,033$) ez a megfigyelés Bonferroni korrekció elvégzése után már nem volt szignifikáns.

Lényegesen hosszabb volt a betegség időtartama azoknál a betegeknel, akiknél a lefolyás változott ($12,3 \pm 7,6$ év vs. $7,4 \pm 6,5$ év, $p < 0,001$).

Logisztikus regresszió analízisben, ha a betegség fennállási idejét is, mint lehetséges tényezőt vizsgáltuk, csak a betegség fennállása, a perianális érintettség, a dohányzás, a szteroid kezelés és a korai AZA kezelés bizonyult független tényezőnek a szövődményes betegségforma megjelenése szempontjából. Amennyiben a korai AZA kezelés helyett a modellben a korai AZA/biológiai kezelés (Coefficient: -1.221 , $p = 0.002$, OR: 0.29 , 95%CI: $1.34-0.64$) szerepét vizsgáltuk, az igazoltan független tényezők nem változtak.

Kaplan-Meier analízisben a lokalizáció, a perianális érintettség, a korai AZA illetve AZA/biológiai kezelés és a szteroid kezelés (LogRank $p = 0.004$ Breslow $p = 0.005$) is kapcsolatot mutatott a szövődményes forma megjelenéséig eltelt idővel.

Cox-regressziós analízisben mindegyik vizsgált tényező függetlennek bizonyult. Amennyiben a korai AZA kezelést az AZA/biológiai kezeléssel helyettesítettük a fenti analízisben, az eredmények lényegében változatlanok voltak ($p = 0,002$, HR: $0,43$, 95%CI: $0,25-0,73$).

- **A korai AZA illetve AZA/biológiai kezelés kapcsolata a reszekciós műtéti kezeléssel IBD-ben**

A reszekciós műtéttel univariációs analízisben a lokalizáció, a betegség viselkedése, a dohányzási szokások és a korai AZA illetve AZA/biológiai kezelés mutatott kapcsolatot. *A korai AZA illetve AZA/biológiai kezelés protektívnek mutatkozott a reszekciós műtéti kezeléssel szemben.* A reoperációval, annak időpontjában vizsgálva a gyakori relapszusok (OR: $4,83$, 95%CI: $2,17-11,8$), a perianális érintettség (OR: $3,20$, 95%CI: $1,59-6,43$) és a betegség viselkedése (reoperáció nélkül vs. reoperáció esetén B1:

15,9% vs 7,7% és B3: 55,1% vs 76,9%, $p = 0,02$) mutatott kapcsolatot, míg az AZA, AZA/biológiai kezelés és az első sebészeti beavatkozást követően indított új AZA illetve AZA/biológiai kezelés nem.

Kaplan-Meier analízis során mind a dohányzás (LogRank $p = 0,025$ és Breslow $p = 0,047$) mind a korai AZA kezelés ($p < 0,001$ mindkét esetben) kapcsolatot mutatott a sebészetig eltelt idővel. Szintén kapcsolat igazolódott a reszekciós műtét szükségessége, a korai AZA, illetve AZA/biológiai kezelés és a dohányzás kombinációja között is, ahogy az első sebészetig eltelt idő és a betegség lokalizációja ($p < 0,001$ és $p = 0,002$), illetve viselkedése ($p < 0,001$ mindkét esetben) között is. Utóbbi esetén *a korai AZA illetve AZA/biológiai kezelés feljebb leírt, a reszekciós műtéti kezeléssel szemben mutatott protektív hatása*, mind a gyulladásos fenotípusban, mind a teljes vizsgált populációban érvényesült, azonban a fenotípus változáson (B1-ből B2/B3-ba) átesett betegekben a pozitív tendencia csak a követés későbbi időszakában volt látható. Cox-regresszió analízisben a korai AZA/biológiai kezelés, a betegség lokalizációja és viselkedése bizonyult független tényezőnek az első műtéti kezelés szempontjából. Az eredmények lényegében változatlanok voltak, amennyiben a korai AZA/biológiai kezelést az AZA kezeléssel helyettesítettük. ($p = 0,001$).

Az univariációs analízis eredményéhez hasonlóan a gyakori relapszusok ($p = 0,001$ mind LogRank mind Breslow tesztek esetén) és a perianális érintettség ($p = 0,007$ és $p = 0,048$) mutatott kapcsolatot a reoperációig eltelt idővel Kaplan-Meier analízisben, ugyanakkor a korai AZA illetve AZA/biológiai kezelés nem.

CU-ban a colectomia nagyobb arányban volt szükséges a nem dohányzó betegekben (6,6% vs. 0%, $p = 0,05$). A colectomia esélye és a többi, vizsgált klinikai tényező között nem találtunk kapcsolatot. A

dohányzás preventív szerepét Kaplan-Meier analízisben is sikerült igazolni, a dohányzás csökkentette a colectomia esélyét LogRank ($p = 0,042$) és tendenciaszerűen Breslow tesztek ($p = 0,08$) segítségével. Ugyanígy szignifikáns volt a kapcsolat a colectomia és a kiterjedt betegség lokalizáció között ($p < 0,001$ mindkét esetben). Cox-regresszió analízisben mindkét tényező függetlennek bizonyult ($p_{\text{dohányzás}} = 0,02$ illetve $p_{\text{lokalizáció}} = 0,008$).

Következtetések

Jelen értekezésben az alábbi új megállapításokat tettem:

1. Kapcsolatot mutattunk ki az *ATG16L1*, az *IL23R* variánsok és a Crohn-betegség között magyar betegekben.
2. Az *NFKB1 -94ins/delATTG*, az *NFKBIA 3'UTR*, az *ATG16L1* és az *IL23R* gének különböző variánsainak egyike sem mutatott összefüggést a gyógyszeres (szteroid-azathioprin-infliximab) kezelésre adott válasszal vagy a bélreszekcióval járó sebészi kezelés szükségességével magyar IBD-ben szenvedő betegekben.
3. Az *NFKBIA 3'UTR* GG genotípus jelenléte a pancolitis kialakulásának magasabb kockázatával társult a magyar IBD-ben szenvedő betegekben.
4. Az autofágia mechanizmusában fontos *ATG16L1* gén a magyar betegekben a vastagbél lokalizációval mutatott összefüggést.
5. Az *IL23R* 381Q allél hordozása a Crohn-betegség gyulladós formájával mutatott összefüggést vizsgálatainkban.
6. Hosszútávú klinikai követéses vizsgálatban beszámoltunk arról, hogy a betegség kezdeti klinikai jellemzői (kiterjedés-viselkedés), a gyógyszeres kezelési stratégia és egyes környezeti faktorok (pl. dohányzás) független módon befolyásolják a hosszútávú sebészeti rizikót Crohn-betegségben és colitis ulcerosában, illetve a betegség viselkedésének a megváltozását Crohn-betegségben.
7. Munkánkban elsőként igazoltuk, hogy az azathioprin alapú korán megkezdett, agresszív gyógyszeres kezelés független faktorként befolyásolja a reszekciós műtét kockázatát Crohn-betegségben, és legalábbis a sebészeti rizikó szempontjából képes volt kivédeni a dohányzás kedvezőtlen hatását.
8. Korábbi adatokkal összehangban, a magyar betegekben is az ileális és perianális érintettség esetén volt gyakoribb a szövődmenyes betegségforma kialakulása, és a fentiek mellett a stenotizáló/penetráló betegségforma járt együtt nagyobb reszekciós műtéti kockázattal.
9. Colitis ulcerosában multivariancia analízisben, a dohányzás és a betegség kiterjedése független prediktív tényezőnek bizonyult a colectomia rizikó szempontjából.

Saját publikációk jegyzéke

Lektorált cikk: 19

Kumulatív impact factor absztraktok nélkül: 38,509

Citáció SCI-Scopus alapján: 322

Ebből független citáció: 259

10.2.1 A tézisekhez közvetlenül kapcsolódó saját publikációk

Közlemények:

1. **Szamosi T**, Banai J, Lakatos L, Czegledi Z, David G, Schafer E, Pandur T, Erdelyi Z, Gemela O, Papp M, Papp J, Lakatos PL. Early azathioprine/biological therapy is associated with decreased risk for first surgery and delays time to surgery but not reoperation in both smokers and non-smokers with Crohn's disease, while smoking prevents colectomy in UC. **Eur J Gastroenterol Hepatol** 2010;22:872-9. IF:1,598 cit: 14/7
2. Lakatos PL, Czegledi Z, **Szamosi T**, Banai J, David G, Zsigmond F, Pandur T, Erdelyi Z, Gemela O, Papp J, Lakatos L. Perianal disease, small bowel disease, smoking, prior steroid or early azathioprine/biological therapy are predictors of disease behavior change in patients with Crohn's disease. **World J Gastroenterol** 2009;15:3504-10 IF:2,092 cit: 15/11

3. **Szamosi T**, Lakatos PL, Hungarian IBD Study Group, Szilvasi A, Lakatos L, Kovacs A, Molnar T, Altorjay I, Papp M, Szabo O, Satori A, Tulassay Z, Miheller P, Horvath HC, Papp J, Tordai A, Andrikovics H. NFKBIA 3'UTR and NFKB1 -94ins/delATTG variants in Hungarian IBD patients are not associated with disease susceptibility, response to medical therapy or need for surgery; the 3'UTR variant is associated with extensive colitis. **Dig Dis Sci** 2009;54:351-9.

IF:1,838 cit: 4/4

4. **Lakatos PL, Szamosi T (joint first authors)**, Szilvasi A, Molnar E, Lakatos L, Kovacs A, Molnar T, Altorjay I, Papp M, Tulassay Z, Miheller P, Papp J, Hungarian IBD Study Group, Tordai A, Andrikovics H. ATG16L1 and IL-23 receptor (IL-23R) genes are associated with disease susceptibility in Hungarian CD patients. **Dig Liver Dis** 2008;40:867-73

IF:2,577, cit 23/22

5. Lakatos PL, **Szamosi T**, Lakatos L. Smoking in inflammatory bowel diseases: Good, bad or ugly? **World J Gastroenterol** 2007;13:6134-9. (Editorial)

cit 40/36

10.2.2 A tézisekhez közvetlenül nem kapcsolódó saját publikációk

1. Horvath G., Farkas K., Hollósi R., Nagy F., Szepes Z., Papp M., Palatka K., Miheller P., Lakatos L., **Szamosi T.**, Nyari T., Wittmann T., Molnar T.: Is there any association between impaired health-related quality of life and non-adherence to medical therapy in inflammatory bowel disease? **Scand J Gastroent.** 2012

IF 2,019

2. Gyökeres T., Rusznyák K., Visnyei Zs., Schafer E., **Szamosi T.**, Banai J.: Minőségi indikátor bevezetése egy magyar gastroenterológiai endoszkópos laboratórium munkájába. **Orv. Hetil.** 153:(29)1142-1152, 2012.
3. Kiss LS, **Szamosi T**, Molnar T, Miheller P, Lakatos L, Vincze A, Palatka K, Barta Z, Gasztonyi B, Salamon A, Horvath G, Tóth GT, Farkas K, Banai J, Tulassay Z, Nagy F, Szenes M, Veres G, Lovasz BA, Vegh Z, Golovics PA, Szathmari M, Papp M, Lakatos PL. Early clinical remission and normalization of CRP are the strongest predictors of efficacy, mucosal healing, and dose escalation during the first year of adalimumab therapy in Crohn's disease. **Aliment Pharmacol Ther** 2011;34:911-922.

IF: 3,769
4. Kiss LS, **Szamosi T**, Molnár T, Miheller P, Lakatos L, Vincze A, Palatka K, Bartha Z, Gasztonyi B, Salamon A, Horvath G, Toth TG, Farkas K, Czeglédi Z, Banai J, Tulassay Z, Nagy F, Lovasz BD, Vegh Z, Golovics PA, Papp M, Lakatos PL. A hatékonyság, a mucosalis gyógyulás és a dózisintenzifikálás prediktorai az adalimumabterápia első évében luminalis és fisztulázó Crohn-betegségben szenvedő betegekben. Magyarországi adatok. **Orv Hetil** 2011;152:1433-42
5. Lakatos PL, Czeglédi Z, David G, Kispal Z, Kiss LS, Palatka K, Kristof T, Nagy F, Salamon A, Demeter P, Miheller P, **Szamosi T**, Banai J, Papp M, Bene L, Kovacs A, Racz I, Lakatos L. Association of adherence to therapy and complementary and alternative medicine use with demographic factors and disease phenotype in patients with inflammatory bowel disease. **J Crohn Colitis** 2010;4:283-90.

IF: 2,628, cit:1/1

6. Lakatos L, Czeglédi Z, David G, Kispal Z, Kiss LS, Palatka K, Kristof T, Molnár T, Salamon A, Demeter P, Miheller P, **Szamosi T**, Banai J, Papp M, Bene L, Kovacs A, Racz I, Lakatos PL. A terápiás adherencia, valamint a komplementer és alternatív gyógymódok használata gyulladásoos bélbetegekben. **Orv Hetil** 2010;151:250-8.
7. Miheller P, Lakatos PL, Horváth G, Molnár T, **Szamosi T**, Ceglédi Z, Salamon A, Czimmer J, Rumi G, Palatka K, Papp M, Jakab Z, Szabó A, Gelley A, Lakatos L, Barta Z, Balázs C, Rácz I, Zeher M, Döbrönte Z, Altörjay I, Hunyady B, Simon L, Papp J, Banai J, Nagy F, Lonovits J, Újszászy L, Muzes G, Herszényi L, Tulassay Z. Efficacy and safety of infliximab induction therapy in Crohn's Disease in Central Europe - a Hungarian nationwide observational study. **BMC Gastroenterology** 2009;9:66 IF: 1,886 cit: 6/5
8. Lakatos PL, Altörjay I, **Szamosi T**, Palatka K, Vitalis Z, Tumpek J, Sipka S, Udvardy M, Dinya T, Lakatos L, Kovacs A, Molnar T, Tulassay Z, Miheller P, Barta Z, Stocker W, Papp J, Veres G, Papp M for the Hungarian IBD Study Group. Pancreatic autoantibodies are associated with reactivity to microbial antibodies, penetrating disease behavior, perianal disease and extraintestinal manifestations, but not with NOD2/CARD15 or TLR4 genotype in a Hungarian IBD cohort. **Inflamm Bowel Dis** 2009;15:365-74
IF: 4,643 cit: 9/6
9. Lakatos PL, Altörjay I, Mándi Y, Lakatos L, Tumpek J, Kovacs A, Molnar T, Tulassay Z, Miheller P, Palatka K, **Szamosi T**, Fischer S, Papp J, the Hungarian IBD Study Group, Papp M. Interaction between seroreactivity to microbial antigens and genetics in

- Crohn's disease: is there a role for defensins? **Tissue Antigens** 2008;71:552-9. IF:2,076, cit 12/11
10. Papp M, Altorjay I, Dotan N, Palatka K, Foldi I, Judit Tumpek J, Sipka S, Udvardy M, Dinya T, Lakatos L, Kovacs A, Molnar T, Tulassay Z, Miheller P, Norman GL, **Szamosi T**, Papp J, Hungarian IBD Study Group, Lakatos PL. New serological markers for inflammatory bowel disease are associated with earlier age at onset, complicated disease behavior, risk for surgery, and NOD2/CARD15 genotype in a Hungarian IBD cohort. **Am J Gastroenterol** 2008;103:665-81. IF:6,444, cit 37/22
 11. Kocsis AK, Lakatos PL, Somogyvari F, Fuszek P, Papp J, Fischer S, **Szamosi T**, Lakatos L, Kovacs A, Hofner P, Mandi Y. Association of β -defensin 1 Single Nucleotide Polymorphisms with Crohn's disease. **Scand J Gastroenterol** 2008;43:299-307 IF:1,980, cit: 23/21
 12. Szamosi T; Roth E; **Szamosi T Jr**; Tomsits E; Tordai A; Szabo T. Hyperhomocysteinemia; enzyme polymorphism and thiobarbituric Acid reactive system in children with high coronary risk family history. **J Am Coll Nutr**. 2004 Oct;23(5):386-90 IF:2;802
 13. Veres A; Szamosi T; Ablonczy M; **Szamosi T Jr**; Singh M; Karádi I; Romics L; Füst G; Prohászka Z. Complement activating antibodies against the human 60 kDa heat shock protein as a new independent family risk factor of coronary heart disease. **Eur J Clin Invest**. 2002 Jun;32(6):405-10 IF:2;193, cit: 24/21
 14. Szamosi T; Murber A; **Szamosi T Jr**; Tory V; Kosztolicz A; Sztankits K. Atherosclerosis risk factors in children of high risk families. **Acta Physiol Hung**. 1999;86(3-4):185-90.