

# Az atherosclerosis ultrahangos markerei és a bél mikrobiom közötti összefüggés ikrekben

Doktori értekezés

**Dr. Szabó Helga**

Semmelweis Egyetem  
Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori  
Iskola



Témavezető: Dr. Tárnoki Dávid László, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók:

Dr. Domokos Judit, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Lohinai Zoltán, Ph.D., szakorvos

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Karádi István, D.Sc., az MTA lev. tagja, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Farkas Henriette, D.Sc., egyetemi tanár

Dr. Andréka Péter, Ph.D., mb. főigazgató főorvos

Budapest  
2023

## 1. Bevezetés

A szív- és érrendszeri betegségeket (CVD) a vezető halálozási okok között tartják számon világszerte, amelyek évente nagyjából 18 millió halálesetért felelősek. Az akut szívinfarktus és a stroke együttesen az összes CVD-halálozás több mint 80%-ához járul hozzá, és ezeknek a haláleseteknek körülbelül egyharmada 70 évesnél fiatalabb egyéneknél fordul elő. A carotis artéria atherosclerosis (CAS) ismerten összefügg a szív- és érrendszeri betegségek fokozott kockázatával. A carotis intima-media vastagsága (IMT) jelentős kardiovaszkuláris markerként szolgál, és kiterjedt kutatások tárgya. A marker háttérében álló genetikai és környezeti tényezők összehasonlítása jelentős figyelmet kapott a szakirodalomban. A szív- és érrendszeri betegségek számos megállapított kockázati tényezője, mint például az előrehaladott életkor, az alkoholfogyasztás, a diabetes mellitus, a magas vérnyomás, a diszlipidémia, a dohányzás és a magas érzékenységgű C-reaktív protein (hs-CRP) összefüggésbe hozható a carotis IMT-vel. Míg a genetikai variáció és a környezeti kockázati tényezők a CAS elismert meghatározói, a legújabb kutatások kimutatták, hogy a

gasztrointesztinális mikrobiom összetétele és sokfélesége is jelentősen befolyásolhatja a szív- és érrendszeri betegségek kialakulását.

Az obstruktív alvási apnoe (OSA) olyan egészségügyi állapot, amelyet a felső légutak visszatérő összeomlása jellemez az alvás időszakában. Egyrészt korábbi tanulmányok pozitív összefüggést találtak az OSA és az atherosclerosis fokozott kockázata között. Másrészt azt is kimutatták, hogy a hipoxia hatással van a különböző bélbaktériumok szaporodására. Ugyanakkor az érlemeszesedés és a bél mikrobiom közötti kölcsönhatást vizsgáló kutatások alkalmazhatósága nem extrapolálható könnyen az OSA-ban szenvedő egyénekre.

## **2. Célkitűzés**

Fő célunk az atherosclerosis ultrahangos markerei és a bél mikrobiom közötti összefüggés vizsgálata volt magyar ikerpopulációban. Vizsgálatunk egyrészt a bélmikrobiom diverzitás és a szubklinikai atherosclerosis egyik leggyakrabban vizsgált radiológiai markere, a carotis IMT közötti kapcsolat feltárását tűzte ki célul. Egypetéjű (MZ) ikrekben megvizsgáltuk a magasabb és normál IMT mellett jelen lévő különböző

baktériumtörzsek számát. Továbbá diszkordáns MZ párokban vizsgáltuk az alfa diverzitást törzs szinten, valamint a Firmicutes/Bacteroidetes arányt. Másrészt célunk volt az atherosclerosisban szenvedő és nem szenvedő csoport bél mikrobiom közötti különbség vizsgálata egy speciális alcsoportban, az OSA-s felnőttek körében. Meg akartuk határozni azokat a jellemzőket, amelyek nagy valószínűséggel magyarázzák a két csoport közötti különbségeket, hogy potenciális biomarkerek lehessenek megkülönböztetésükre. Összehasonlítottuk az alfa és béta diverzitás közötti különbséget, valamint a baktériumok relatív abundanciáját a két csoport között.

### **3. Módszerek**

#### ***3.1. A carotis IMT diszkordáns ikertanulmány mintája***

A Magyar Ikerregiszterből 14 tünetmentes, carotis ultrahangvizsgálaton átesett, maximális IMT-re diszkordáns MZ ikerpárt (n = 28, 52-73 év, átlagéletkor  $65 \pm 6,4$  év, 71% nő) vizsgáltunk. Az MZ-diszkordanciát úgy határoztuk meg, hogy egy ikerpár egyik tagjának max. carotis IMT-je nagyobb, míg a másik tagjának kisebb, mint 0,9 mm a bal, a jobb, vagy mindkét oldalon. Terhesség, korábbi carotis műtét, akut fertőzés a kutatást

megelőző három hétben, valamint korábbi onkológiai betegség kizáró tényezők voltak.

### ***3.2. Az OSA és atherosclerosis tanulmány mintája***

A Magyar Ikerregiszter alvási kohorszában részt vett kaukázusi alanyok közül az OSA-val diagnosztizált, carotis ultrahang vizsgálaton átesett és székletmintát biztosító személyek kerültek kiválasztásra. Az ultrahangos vizsgálat alapján két csoportot határoztunk meg: atherosclerosisban szenvedő és nem szenvedő OSA-s alanyok csoportját. Az atherosclerost úgy határoztuk meg, hogy legalább egy plakk van a bal, a jobb vagy mindkét oldalon. A vizsgálat előtt egyik résztvevőnél sem diagnosztizáltak OSA-t, és nem részesültek OSA-kezelésben. A kizárási kritériumok közé tartozott a terhesség, a korábbi carotis műtét, a vizsgálatot megelőző három héten belüli akut fertőzés, az onkológiai alapbetegség, a gyulladáshoz vezető bélbetegség, valamint az akut légúti, szív- és veseelégtelenség.

Az OSA-ban szenvedő betegek közül 16 atherosclerosisos alanyt (46-74 év, átlagéletkor  $63 \pm 8,8$  év, 56% nő) és 6 nem atherosclerosisos alanyt (23-67 év, átlagéletkor  $47 \pm 18,6$  év, 50% nő) vizsgáltunk.

### ***3.3. Vizsgálati protokoll***

A carotis ultrahang vizsgálat, székletminta gyűjtés és feldolgozás, kérdőívek kitöltése, vérnyomás mérés, BMI kalkuláció, valamint az OSA vizsgálat esetében laboratóriumi vizsgálatok és további bioinformatikai elemzések után átfogó statisztikai elemzések készültek.

A carotis ultrahang vizsgálat Samsung RS85 készülékkel és 15 MHz-es lineáris transzducerrel történt. Az arteria carotis communis (CCA) és arteria carotis interna kezdeti szakaszán plakk detektálást, továbbá a CCA distalis szakaszán fél-automata IMT mérést végeztünk az Arterial Analysis szoftver segítségével.

A bél mikrobiom vizsgálatához speciális konzerváló folyadékot tartalmazó mintavételi tartályban gyűjtöttünk székletmintát. A minták feldolgozása a Semmelweis Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézettel együttműködésben valósult meg. A DNS kivonása után a mikrobiális 16S rDNS V3-V4 hipervariábilis régiójára specifikusan végeztünk könyvtárkészítést az Illumina által ajánlott protokoll alapján. Az egyedi indexpárokkal jelölt és Agilent 2100 Bioanalyzer készülékkel validált könyvtárakat poolozás után Illumina MiSeq platformon szekvenáltuk egy 600 ciklusos MiSeq Reagent Kit v3

lefuttatásával. A kapott adatokból a Kraken szoftver segítségével határoztuk meg a minták mikrobiom összetételét.

Az alvásvizsgálatot a Somnoscreen Plus Tele PSG és a Somnoscreen RC készülékek segítségével végeztük a Semmelweis Egyetem Pulmonológiai Klinikáján. Az American Academy of Sleep Medicine ajánlásait használtuk az alvási szakaszok, mozgások és kardiopulmonális események manuális értékelésére. OSA-t az  $AHI \geq 5/h$  esetekben diagnosztizáltunk.

A statisztikai elemzések az R program használatával történtek.

#### **4. Eredmények**

- Míg a carotis IMT diszkordáns ikervizsgálatunkban nem találtunk összefüggést az alacsonyabb alfa diverzitás és a magasabb IMT között, az OSA és atherosclerosis vizsgálatunkban sikerült összefüggést kimutatnunk a nagyobb max. CCA IMT és a csökkent törzs szintű diverzitás között.

- Megnövekedett Firmicutes/Bacteroidetes arányt találtunk a magas IMT-vel rendelkező csoportban.
- Míg a *Prevotellaceae* család szignifikánsan nagyobb arányát találtuk a normál IMT-értékkel rendelkező csoportban, mint a magas IMT-értékekkel rendelkező csoportban, az OSA és atherosclerosis vizsgálatunkban a *Prevotella* nemzetséget találtuk az atheroscleroticus OSA-s csoport egyik jelölt mikrobájaként.
- Az atheroscleroticus OSA-s betegekben a *Peptostreptococcaceae* számottevően csökkent szintjét találtuk.
- Kiemelkedő baktériumokat azonosítottunk nemzetség szinten a nem atheroscleroticus OSA-s csoportban: *Bilophila*, *Romboutsia*, *Slackia* és *Veillonella*; valamint az atheroscleroticus OSA-s csoportban: *Escherichia-Shigella*, *Prevotella* és *Ruminococcaceae*.



## 5. Következtetések

Legjobb tudomásunk szerint ez az első olyan ikervizsgálat, amely a bél mikrobiom carotis IMT-re gyakorolt hatását vizsgálta diszkordáns ikreknél; valamint az első pilot tanulmány, amely a bél mikrobiom és az atherosclerosis közötti összefüggést elemezte atherosclerosisban szenvedő és nem szenvedő, OSA-s felnőtt alanyoknál.

- Korábbi tanulmányokkal egybecsengően megnövekedett maximális CCA IMT-ről számoltunk be, amely a törzsek szintjén csökkent diverzitással társult, megerősítve az atherosclerosis és a dysbiosis közötti kapcsolatot.
- Más tanulmányok eredményeit megerősítettük, amelyekben megnövekedett Firmicutes/Bacteroidetes arányról számoltak be szubklinikai atherosclerosisban szenvedő alanyoknál, akiket megnövekedett carotis IMT jellemez, tovább erősítve az atheroscleroticus fenotípus lehetséges markereként betöltött szerepét.
- Míg a *Prevotellaceae* családnak lényegesen nagyobb hányadát találtuk a normál IMT-értékkel

rendelkező csoportban összehasonlítva a magas IMT-értékekkel rendelkező csoporttal, az OSA és atherosclerosis tanulmányunkban a *Prevotella* nemzetséget az atheroscleroticus OSA-s csoportban találtuk az egyik fő mikrobának. Mivel a jelenlegi szakirodalom is vitatja a *Prevotella* hatását, ennek tisztázása érdekében a jövőben további, nagyszámú mintával végzett elemzések javasoltak.

- A *Peptostreptococcaceae* szintjét szignifikánsan alacsonyabbnak találtuk az atheroscleroticus OSA-s csoportban, ami ellentmond a korábbi kutatásoknak, ezért ezt az eredményt fenntartásokkal kell kezelni, és további nagyobb vizsgálatokat kell végezni annak tisztázására, hogy pontosan mi a szerepe ennek a baktériumnak.
- Egyéb jelölt mikrobákat azonosítottunk, amelyek mindegyike fontos szerepet játszhat az érlelmeszesedés kezelésében, a dysbiosis helyreállításában és a jótékony bélflóra fenntartásában.

## 6. Saját publikációk jegyzéke

### 6.1. Az értekezéshez kapcsolódó közlemények

- **Szabo H**, Hernyes A, Piroska M, Ligeti B, Fussy P, Zoldi L, Galyasz S, Makra N, Szabo D, Tarnoki AD, Tarnoki DL. Association between Gut Microbial Diversity and Carotid Intima-Media Thickness. *Medicina (Kaunas)*. 2021;57(3). doi: 10.3390/medicina57030195. **(IF: 2.948)**
- **Szabo H**, Piroska M, Hernyes A, Zoldi L, Juhasz J, Ligeti B, Makra N, Szabo D, Bikov A, Kunos L, Tarnoki AD, Tarnoki DL. The Relationship between Atherosclerosis and Gut Microbiome in Patients with Obstructive Sleep Apnoea. *Applied Sciences*. 2022;12(22):11484. doi: 10.3390/app122211484. **(IF: 2.838)**

### 6.2. Az értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

- Forgo B, **Szabo H**, Persely A, Tarnoki DL, Tarnoki AD. Twin studies on the epigenetics of selected neurological disorders and carotid artery disease. In: Li S, Hopper J, editor. *Twin and Family Studies of Epigenetics*. Elsevier; 2021. pp.

193-211., 19 p. doi: 10.1016/B978-0-12-820951-6.00015-6.

- Bikov A, **Szabo H**, Piroska M, Kunos L, Szily M, Ligeti B, Makra N, Szabo D, Tarnoki DL, Tarnoki AD. Gut Microbiome in Patients with Obstructive Sleep Apnoea. *Applied Sciences*. 2022;12(4):2007. doi: 10.3390/app12042007. **(IF: 2.838)**
- Jokkel Z, Forgo B, Hani-Gaius Ghattas C, Piroska M, **Szabó H**, Tarnoki DL, Tarnoki AD, Lee SJ, Sung J. Heritability of Cardiothoracic Ratio and Aortic Arch Calcification in Twins. *Medicina (Kaunas)*. 2021 Apr 27;57(5):421. doi: 10.3390/medicina57050421. **(IF: 2.948)**
- Hernyes A, Piroska M, Fejer B, Szalontai L, **Szabo H**, Forgo B, Jermendy AL, Molnar AA, Maurovich-Horvat P, Jermendy G, Merkely B, Tarnoki DL, Tarnoki AD. Overlapping Genetic Background of Coronary Artery and Carotid/Femoral Atherosclerotic Calcification. *Medicina (Kaunas)*. 2021 Mar 9;57(3):252. doi: 10.3390/medicina57030252. **(IF: 2.948)**

- Tarnoki AD, Tarnoki DL, Forgo B, **Szabo H**, Melicher D, Metneki J, Littvay L. The Hungarian Twin Registry Update: Turning From a Voluntary to a Population-Based Registry. *Twin Research and Human Genetics*. Cambridge University Press; 2019;22(6):561–566. doi: 10.1017/thg.2019.100. **(IF: 1.319)**
- Piroska M, Tarnoki DL, **Szabo H**, Jokkel Z, Meszaros S, Horvath C, Tarnoki AD. Strong Genetic Effects on Bone Mineral Density in Multiple Locations with Two Different Techniques: Results from a Cross-Sectional Twin Study. *Medicina (Kaunas)*. 2021 Mar 8;57(3):248. doi: 10.3390/medicina57030248. **(IF: 2.948)**
- Molnár V, Molnár A, Lakner Z, Tárnoki DL, Tárnoki ÁD, Jokkel Z, **Szabó H**, Dienes A, Angyal E, Németh F, Kunos L, Tamás L. Examination of the diaphragm in obstructive sleep apnea using ultrasound imaging. *Sleep Breath*. 2022 Sep;26(3):1333-1339. doi: 10.1007/s11325-021-02472-3. **(IF: 2.655)**

- Fekete M, Piroska M, Szily M, Erdei M, Jokkel Z, **Szabo H**, Littvay L, Baffy G, Tarnoki AD, Tarnoki DL. Heritability analysis of liver stiffness detected by ultrasound shear wave elastography: a twin study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2021 Dec 1;33(1S Suppl 1):e766-e770. doi: 10.1097/MEG.0000000000002246. **(IF: 2.586)**
- Saeki S, Yamamoto K, Tomizawa R, Meszaros S, Horvath C, Zoldi L, **Szabo H**, Tarnoki AD, Tarnoki DL, Ishida T, Honda C. Utilizing Graphical Analysis of Chest Radiographs for Primary Screening of Osteoporosis. *Medicina*. 2022 Nov 30;58(12):1765. doi: 10.3390/medicina58121765. **(IF: 2.948)**
- Saeki S, **Szabo H**, Tomizawa R, Tarnoki AD, Tarnoki DL, Watanabe Y, Osaka Twin Research Group, Honda C. Lobular Difference in Heritability of Brain Atrophy among Elderly Japanese: A Twin Study. *Medicina (Kaunas)*. 2022 Sep 9;58(9):1250. doi: 10.3390/medicina58091250. **(IF: 2.948)**
- Lakatos B, **Szabó H**, Csordás K, Tatai G, Nikolova R, Csomor J, Reményi P, Masszi T,

Vályi-Nagy I, Sinkó J. Autológósejt-transzplantációt követő korai infekciók epidemiológiája. Egy hazai centrumban kezelt 699 beteg adatainak elemzése [Epidemiology of early infections after autologous hematopoietic stem cell transplantation. Analysis of data from 699 patients treated in a Hungarian centre]. Orv Hetil. 2020 Jan;161(3):103-109. Hungarian. Doi: 10.1556/650.2020.31638. (IF: 0.540)

- Hernyes A, Fejér B, Szabó H, Szalontai L, Persely A, Fekete M, Szily M, Jokkel Z, Debreceni R, Gyulai K, Szabó G, Zöldi L, Tárnoki ÁD, Tárnoki DL. (2019). Az arteria carotis communis intima-media komplex sajátosságainak vizsgálata ultrahanggal - Technikai megfontolások és korrelációk egyéb atherosclerosisra utaló változókkal. MAGYAR RADIOLÓGIA ONLINE, 10(3), 1–10. <http://doi.org/10.5374/mro.2019.3.2>.