

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

TEZĂ DE DOCTORAT

Noi biomarkeri în diagnosticul sindromului de intestin iritabil

Doctorand **Alexandra Rusu (Chira)**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Dan Lucian Dumitrașcu**



CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	17
1. Sindromul de intestin iritabil (SII) – cadru nosologic	19
1.1. Definiția	19
1.2. Epidemiologia	19
1.3. Diagnosticul SII	20
1.3.1. Criteriile Roma III de diagnostic	21
1.3.1.1. Clasificarea pe subtipuri a SII	21
1.3.1.2. Alte subtipuri ale sindromului de intestin iritabil	22
1.3.1.2.1. Fenotipul alternator	22
1.3.1.2.2. Intestinul iritabil postinfecțios	22
1.3.2. Evaluarea pacienților	23
1.3.2.1. Anamneza și evaluarea clinică	23
1.3.2.2. Scala Bristol a Formei Scaunului (SBFS)	23
1.3.2.3. Explorări uzuale	24
2. Etiopatogeneza sindromului de intestin iritabil	25
2.1. Inflamația	25
2.1.1. Stresul oxidativ	26
2.2. Hipersensibilitatea viscerală	27
2.3. Axa creier – intestin	27
2.4. Factorii psihosociali	28
2.4.1. Stresul	29
2.5. Factori genetici	29
2.6. Alți factori	30
3. Biomarkeri studiați în sindromul de intestin iritabil	31
3.1. Markerii sanguini	32
3.2. Biomarkerii fecali și metaboliți organici volatili	34
3.3. Markerii fenotipici	35
3.4. Polimorfisme genetice	36
3.5. MicroARN (miARN)	37
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	41
1. Ipoteza de lucru	43
2. Metodologie generală	45
3. Studiul 1 – Scala Bristol a formei scaunului – validarea în limba română	47
3.1. Introducere	47
3.2. Ipoteza de lucru	47
3.3. Material și metodă	47
3.4. Rezultate	49
3.5. Discuții	52
3.6. Concluzii	54
4. Studiul 2 – Fenotipul alternator	55
4.1. Introducere	55
4.2. Ipoteza de lucru	55
4.3. Material și metodă	55
4.4. Rezultate	56
4.5. Discuții	57
4.6. Concluzii	58

5. Studiul 3 - Evaluarea MCP-1, anticorpilor anti-vinculină și a nitrotirozinei din ser în sindromul de intestin iritabil	59
5.1. Introducere	59
5.2. Ipoteza de lucru	61
5.3. Material și metodă	61
5.4. Rezultate	62
5.5. Discuții	73
5.6. Concluzii	76
6. Studiul 4 - Evaluarea miARN în sindromul de intestin iritabil	77
6.1. Introducere	77
6.2. Metodă	78
6.3. Evaluarea miR-23a și miR-181b în sindromul de intestin iritabil	85
6.3.1. Introducere	85
6.3.2. Ipoteza de lucru	85
6.3.3. Material și metodă	85
6.3.4. Rezultate	86
6.3.5. Discuții	96
6.3.6. Concluzii	97
6.4. Evaluarea miR-16 în sindromul de intestin iritabil	98
6.4.1. Introducere	98
6.4.2. Ipoteza de lucru	98
6.4.3. Material și metodă	98
6.4.4. Rezultate	99
6.4.5. Discuții	102
6.4.6. Concluzii	103
7. Concluzii generale	105
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	107
REFERINȚE	109
ANEXE	125

Cuvinte cheie: biomarkeri, inflamație, sindrom de intestin iritabil, diagnostic non-invaziv, miARN

Introducere

Lucrarea de față se adresează unei patologii din ce în ce mai frecvent întâlnite în practica clinică – sindromul de intestin iritabil (SII). Interesul față de grupul tulburărilor funcționale digestive, din care face parte și SII se concretizează într-un mare număr de publicații care sunt adresate acestora.

La fel ca și în cazul altor afecțiuni funcționale, patogeneza SII nu este deplin cunoscută. Au fost propuse multiple mecanisme care să explice patogeneza acestui sindrom, însă până la acest moment nu există un singur mecanism care conduce la SII, etiopatogeneza acestuia fiind acceptată în acest moment ca fiind multifactorială.

Scopul principal al acestei lucrări a fost acela de a cerceta potențiali biomarkeri specifici SII, determinați prin tehnici diferite, inclusiv tehnici de ultimă generație, de a stabili corelații între markerii propuși și de a caracteriza mai bine un lot de pacienți diagnosticați cu SII.

Un obiectiv principal a fost și acela de a traduce și valida Scala Bristol a formei scaunului (SBFS) în limba română, pentru ca specialiștii din domeniul medical și cel de cercetare să aibă un instrument facil de utilizat, care este folosit în întreaga lume, atât în practica clinică cât și în studii, pentru diagnosticul SII și aprecierea timpului de tranzit.

Ne-am propus evaluarea fenotipului alternator într-un lot de pacienți cu SII, precum și evaluarea modificărilor induse de schimbarea subtipului de SII în relație cu tratamentul farmacologic.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Studiul 1. Scala Bristol a formei scaunului – validarea în limba română

Până la acest moment SBFS nu a fost validată în limba română. Scopul acestui studiu este reprezentat de traducerea, adaptarea și validarea SBFS în limba română, pentru ca specialiștii din domeniul medical sau al cercetării să aibă la îndemână un instrument facil de analiză a formei scaunului și a timpului de tranzit intestinal.

În studiu au fost incluși 120 de subiecți care-și desfășoară activitatea în domeniul medical (inclusiv studenți ai Facultății de Medicină Generală) și 60 de pacienți cu vârsta peste 18 ani.

Valoarea globală pentru coeficientul Cronbach alpha a fost 0,892 pentru prima pereche întrebare – răspuns, și respectiv pentru 0,953 pentru cea de-a doua pereche (0,844 - 1).

Cele două seturi de întrebare - răspuns au fost analizate pentru toate subgrupurile de subiecți incluși utilizând coeficientul de corelație dintre clase (CCI), un coeficient utilizat pentru a calcula reproductibilitatea unei scale sau chestionar. Valorile acestuia în studiul nostru sunt 0,805 și respectiv 0,911, pentru al doilea set întrebare - răspuns.

Acest studiu a arătat că varianta în limba română a BSFS este un instrument fiabil pentru a fi utilizat pentru evaluarea formei scaunului, precum cel în limba engleză, care a fost conceput tocmai cu acest scop. Acest instrument poate fi folosit, indiferent de nivelul de educație, având în vedere că și pacienții cu nivel de educație scăzut au putut corela textul cu imaginea.

4. Studiu 2. Fenotipul alternator

Scopurile prezentului studiu au fost evaluarea caracteristicilor fenotipice la pacienții definiți ca alternatori, precum și evaluarea modificărilor repercutate asupra medicației utilizate de acești pacienți.

Studiul a fost unul analitic, retrospectiv, transversal, observațional, de tip cohortă.

Pacienții incluși au fost selecționați din Secțiile de Medicină Internă a Clinicii Medicală II și Gastroenterologie a Clinicii Medicală I, pacienții semnând formularul de consimțământ informat în acord cu principiile Declarației de la Helsinki, pentru includerea în studiu. Un număr total de 60 pacienți consecutivi (43 femei, 17 bărbați; vârsta medie: $52,2 \pm 14$ ani) au fost incluși.

Pacienții incluși au fost diagnosticați conform criteriilor Roma III (vezi Capitolul 2). Pacienții au fost chestionați în legătură cu schimbarea tipului de tranzit, similar cu metodologia descrisă în alte studii. Dacă aceștia au răspuns afirmativ, au fost întrebați în legătură cu subtipul SII pe care îl prezentau în urmă cu șase luni, și cel pe care îl prezintă la acel moment, au fost clasificați ca alternatori. 18 pacienți au fost încadrați ca SII-A (13 femei, 5 bărbați, vârsta medie: $49 \pm 15,6$ ani).

Frecvent pacienții cu SII trec de la un tip al SII la un altul. Frecvența alternatorilor în studiul nostru a fost 30%. Fenotipul cel mai puțin stabil pare a fi SII-M. Schimbarea cea mai rar întâlnită este între fenotipurile SII-C și SII-D.

În studiul nostru pilot alternatorii au recurs mai frecvent la asocieri de preparate farmacologice față de cei care nu trec de la un subtip la altul, și un număr crescut dintre aceștia au schimbat preparatele farmacologice, ceea ce conduce la solicitarea mai frecventă a sistemului medical, generând costuri mai mari/ pacient/ an, atât directe cât și indirecte.

Studiul 3. Evaluarea MCP-1, anticorpilor anti-vinculină și a nitrotirozinei din ser în sindromul de intestin iritabil

Având în vedere ipoteza conform căreia MCP-1 și anticorpii anti-vinculină (Ac VCL) ar fi specifici SII, și că SRO respectiv SRN ar contribui la patogeneza SII ne-am propus să determinăm:

- MCP-1 în raport cu fenotipurile SII
- Ac VCL în raport cu fenotipurile SII
- nitrotirozina (NT) la pacienții cu SII incluși în studiu; evaluarea acestora în raport cu fenotipurile SII.

Pe lângă analiza biomarkerilor în raport cu fenotipurile SII ne-am propus să analizăm și comorbiditățile în lotul de pacienți cu SII.

Un număr total de 42 pacienți consecutivi (30 femei, 12 bărbați; vârsta medie: $55,39 \pm 14,15$ ani) au fost incluși. Lotul de control este alcătuit din 35 de subiecți (18 femei, 17 bărbați; vârsta medie: $49 \pm 16,31$ ani) care au fost recrutați prin mijloace similare, inclusiv publicitate locală.

Analiza a arătat pentru MCP-1 valori din semnificativ mai crescute la pacienții cu SII-D ($p=0,032$) și SII-M ($p=0,040$) în comparație cu SII-C. Valorile au fost semnificativ statistic crescute la pacienții cu SII comparativ cu lotul martor (media $2,6 \pm 1,3$; $p=0,020$). Valorile NT au fost semnificativ mai scăzute ($p=0,050$) în lotul pacienților cu SII (media: $30,3 \pm 11,6$ nmol/L) față de martori (media: $34,93 \pm 14,39$ nmol/L).

MCP-1 și Ac VCL au avut valori semnificativ mai crescute în PI-SII ($p=0,004$ și respectiv $p=0,002$) versus non PI-SII.

La pacienții cu SII am analizat cele mai frecvente comorbidități. Am găsit fibromialgia cea mai

frecvență comorbiditate la pacientele de sex feminin. Dintre afecțiunile psihiatrice în rândul sexului feminin a fost mai frecventă tulburarea de anxietate, iar în rândul sexului masculin tulburarea depresivă.

Studiul 4. Evaluarea miARN în sindromul de intestin iritabil

Studiul 4 este format din două studii care au evaluat în total trei miARN-uri. Cele două studii sunt descrise individual.

Evaluarea miR-23a și miR-181b în sindromul de intestin iritabil

Având în vedere ipoteza conform căreia miR ar putea fi biomarkeri specifici SII ne-am propus să determinăm două miR candidat:

- miR-23a în raport cu fenotipurile SII
- miR-181b în raport cu fenotipurile SII
- dacă există corelații între valorile miARN între diferitele subtipuri de SII.

Un număr total de 40 pacienți consecutivi (29 femei, 11 bărbați; vârsta medie: $55,35 \pm 14,80$ ani) care îndeplineau criteriile Roma III au fost incluși prospectiv. Lotul de control constând în 33 de subiecți (17 femei, 16 bărbați; vârsta medie: $49,78 + 16,65$ ani) au fost recrutați.

Utilizând qRT-PCR valorile determinate pentru miR-23a și miR-181b la pacienții cu SII față de lotul control, identifică o supraexpresie a miR-23a și miR-181b la pacienții cu SII, semnificativ statistic ($p=0,0009$, respectiv $p=0,004$) față de lotul control.

Analizând cele două miR studiate în raport cu fenotipurile clinice am găsit doar pentru SII-D în comparație cu SII-C o diferență semnificativă pentru expresia miR-181b ($p=0,0335$), pentru celelalte subgrupuri (SII-M vs. SII-D, SII-M vs. SII-C, non PI-SII vs. PI-SII), analiza statistică nu a găsit diferențe semnificative.

Rezultatele arată că cele două miARN propuse (miR-23a, -181b) au avut o expresie în ser semnificativ statistic mai mare în lotul pacienților cu SII comparativ cu lotul martor, oferind suportul pentru viitoare cercetări ale miARN în SII.

Evaluarea miR-16 în sindromul de intestin iritabil

Pornind de la ipoteza conform căreia unul dintre miR-uri ar putea fi biomarkeri specifici SII ne-am propus să determinăm un miR candidat:

- miR - 16 în raport cu fenotipurile SII.

Un număr total de 20 pacienți (15 femei, 5 bărbați; vârsta medie: $52,75 \pm 14,69$ ani) care îndeplineau criteriile Roma III au fost incluși prospectiv. Patru pacienți (20 %) au fost incluși ca SII postinfecțios (PI-SII), din care 3 femei.

Lotul de control a cuprins în 10 subiecți (6 femei, 4 bărbați; vârsta medie: $37 \pm 16,03$ ani).

Expresia din ser a miR-16 a fost mai mare la pacienții cu SII față de lotul martor, neatingând însă semnificație statistică ($p=0,074$). Analizând nivelul expresiei între subtipurile SII pentru miR-16, nu am găsit diferențe semnificative ale expresiei ($p=0,991$). Nici în cazul analizei PI-SII față de non PI-SII nu am găsit diferențe semnificative ($p=0,257$).

Rezultatele acestui studiu pilot arată că valorile expresiei din ser pentru miR-16 sunt marginal mai mari în lotul pacienților cu SII față de lotul martor.

Concluzii finale

Acest studiu a arătat că varianta în limba română a BSFS este un instrument fiabil pentru a fi utilizat pentru evaluarea formei scaunului, conform scopului inițial al acestei scale din varianta sa originală în limba engleză. Acest instrument poate fi folosit, indiferent de nivelul de educație, având în vedere că și pacienții cu nivel de educație scăzut au putut corela textul cu imaginea.

Datele noastre indică interesul pacienților față de forma scaunului și tipul de tranzit intestinal.

Am observat creșterea numărului de profesioniști de sex feminin în sistemul medical în rândul medicilor, în relație cu creșterea numărului de studenți de sex feminin în cadrul învățământului medical – al studenților de sex feminin la Medicină.

Prevalența pacienților alternatori în studiul nostru a fost 30%.

Fenotipul cel mai puțin stabil pare a fi SII-M. Schimbarea cea mai rar întâlnită este între subtipurile SII-C și SII-D.

În studiul nostru pilot alternatorii au recurs mai frecvent la asocieri de preparate farmacologice față de cei care nu au trecut de la un subtip la altul, și un număr crescut dintre aceștia au schimbat preparatele farmacologice, ceea ce conduce la solicitarea mai frecventă a sistemului medical, generând costuri mai mari/ pacient/ an, atât directe cât și indirecte.

SII a înregistrat o prevalență mai crescută la sexul feminin în toate studiile efectuate de noi (femei: bărbați 2,5 - 3 : 1). Pacienții sunt mai frecvent din mediul urban.

Studiul confirmă că nivelul Ac VCL este semnificativ statistic mai mare în grupul pacienților cu SII comparativ cu lotul martor. Studiul confirmă ipoteza că Ac VCL ar putea fi utilizați ca biomarkeri pentru diagnosticul SII.

Valorile NT în grupul pacienților cu SII mai mici în comparație cu cele din lotul martor, sugerează faptul că pot fi implicați numeroși factori, având în vedere heterogenitatea fenotipurilor SII, în particular alimentari și/ sau de mediu.

MCP-1 poate fi un indicator a aterosclerozei, dar este necesar a cuantifica mai precis această relație.

O corelație pozitivă a fost stabilită între MCP-1 și Ac VCL pentru pacienții cu SII. Aceasta susține ideea că mai degrabă un grup sau o asocieră de biomarkeri, mai degrabă decât doar un singur biomarker, ar putea discrimina mai precis între pacienții cu SII și pacienții fără SII, sau chiar subiecți sănătoși.

Pacienții cu SII au frecvent multiple comorbidități, dintre acestea cele mai frecvente fiind afecțiunile psihiatrice (sau din spectrul afectivității) și fibromialgia. Incidența comorbidităților este mai mare în rândul pacienților care prezintă atât SII cât și fibromialgie. FM a fost cea mai frecventă comorbiditate la pacientele de sex feminin. Dintre afecțiunile psihiatrice în rândul sexului feminin a fost mai frecventă tulburarea de anxietate, iar în rândul sexului masculin tulburarea depresivă.

Rezultatele noastre arată că cele două miARN propuse (miR-23a, -181b) au avut o expresie în ser semnificativ statistic mai mare în lotul pacienților cu SII comparativ cu lotul martor, oferind suportul pentru viitoare cercetări ale miARN în SII.

Rezultatele confirmă datele din literatură privind stabilitatea probelor, fiabilitatea tehnicilor utilizate precum și potențialul imens al acestor fragmente de ARN circulant. Analiza Ingenuity subliniază mecanismele sublinice complexe și interacțiunile în care sunt implicate miARN-urile studiate în patologia intestinală.

Rezultatele acestui studiu pilot arată că valorile expresiei din ser pentru miR-16 sunt marginal mai mari în lotul pacienților cu SII față de lotul martor. O potențială direcție de cercetare o reprezintă

investigarea acestui miR comparativ la pacienții cu SII față de cei cu BII.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Deși există numeroase studii adresate SII, există încă numeroase aspecte nu doar legate de etiopatogeneză, ci și de fenotipurile SII, care sunt încă incomplet descifrate. Având în vedere heterogenitatea fenotipurilor clinice, este extrem de dificil a stabili corelații clinico-biologice. Această necesitate se reflectă în numărul mare de publicații, prin care se încearcă a se găsi răspunsuri la multe din întrebările adresate SII, și tulburărilor funcționale gastrointestinale.

Caracterul inovator constă în abordarea în această teză, respectiv în Capitolul Stadiul actual al cunoașterii a noțiunilor legate de miARN, care reprezintă practic cea mai nouă direcție de cercetare la nivel mondial, precum și revizuirea datelor din literatură în relație cu polimorfismele genetice și relația lor cu fenotipul.

Meritul principal al acestei lucrări, pe lângă revizuirea unor elemente de ultimă noutate - subiect al cercetării de vârf, este investigarea în cadrul Capitolului Contribuții personale a mai multor biomarkeri, determinați prin tehnici diferite, pentru SII și validarea în limba română a Scalei Bristol a formei scaunului. Prin validarea acestei scale, specialiștii din domeniile medical și de cercetare, au la dispoziție un instrument ușor de utilizat pentru elementele de diagnostic necesare stabilirii subtipurii de SII, dar și de apreciere a timpului de tranzit intestinal, acestei scale (în limba engleză) fiindu-i deja recunoscută și validată utilitatea în studii și în practica clinică.

Am evaluat pe un studiu pilot prevalența fenotipului alternator, unul din fenotipurile cu totul particulare, având în vedere marcata instabilitate temporală a acestui fenotip. Acest studiu pilot reprezintă o primă etapă, în demersul de a încercarea a caracteriza mai bine acest subgrup de pacienți și de înțelege mecanismele etiopatogenetice care conduc la unii pacienții la schimbări rapide ale tipului de tranzit intestinal.

Prin determinarea biomarkerilor propuși am contribuit pe plan internațional, la încercarea de găsi un biomarker care să poată fi utilizat pentru diagnosticul SII. Unul dintre markerii propuși a fost subiectul doar a unui studiu, iar unul dintre cei trei markeri nu a fost studiat până acum, referindu-mă la biomarkerii determinați prin metoda ELISA. Acest studiu confirmă rezultatele primului studiu din literatură, și în plus aduce unele completări având în vedere că analiza noastră s-a adresat biomarkerilor și în relație cu subtipurile SII. Pe lângă evaluarea pur a biomarkerilor de interes, am studiat incidența fibromialgiei în cadrul lotului de pacienți cu SII. Am analizat și frecvența fenotipurilor morbide psihiatrice în grupul de pacienți cu SII.

Deși există date în literatură care susțin utilitatea și fiabilitatea miARN propunându-i drept biomarkeri, cercetări în acest domeniu câștigă teren, fiind subiectul cercetării de vârf. Am realizat în premieră primul studiu din România care a investigat miARN-uri la un lot de pacienți cu SII. Am confirmat prin acest studiu pe lângă fiabilitatea și stabilitatea miARN-urilor și potențialul imens de studiu. În studiul pilot am determinat un miARN (miR-16) pentru a evalua inițial aplicabilitatea tehnicii, iar ulterior am investigat pe un lot mai mare de pacienți alte două miR. În studiul acesta am găsit miR-23a și miR-181b având valori mai mari, semnificativ statistic la pacienții cu SII față de lotul martor.

Datele din literatură susțin aspectul inovator al acestei lucrări. Prin analiza efectuată în prima parte a studiului am evidențiat paucitatea datelor disponibile la acest moment în literatura de specialitate cu privire la determinarea miR în SII.

Aceste studii, atât cel care a evaluat cei trei biomarkeri prin tehnica ELISA, și în special cele care au investigat miR în SII reprezintă studii de avangardă în premieră națională și mondială.

PhD Thesis Abstract

PHD THESIS

New biomarkers in the diagnosis of irritable bowel syndrome

PhD Student **Alexandra Rusu (Chira)**

PhD Advisor Prof. Dr. **Dan Lucian Dumitrașcu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Contents

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	17
1. Irritable bowel syndrome (IBS) – general aspects	19
1.1. Definition	19
1.2. Epidemiology	19
1.3. Diagnosis of IBS	20
1.3.1. Rome III criteria	21
1.3.1.1. Subtypes classification of IBS	21
1.3.1.2. Other IBS subtypes	22
1.3.1.2.1. Alternator phenotype	22
1.3.1.2.2. Post-infectious IBS	22
1.3.2. Evaluation of the patients	23
1.3.2.1. Anamnesis and clinical evaluation	23
1.3.2.2. Bristol Stool Form Scale (BSFS)	23
1.3.2.3. Current examination	24
2. Etiopathogenesis of irritable bowel syndrome	25
2.1. Inflammation	25
2.1.1. Oxidative stress	26
2.2. Visceral hypersensitivity	27
2.3. Brain-gut axis	27
2.4. Psychosocial factors	28
2.4.1. Stress	29
2.5. Genetic factors	29
2.6. Other factors	30
3. Biomarkers investigated in irritable bowel syndrome	31
3.1. Blood markers	32
3.2. Fecal biomarkers and volatile organic metabolites	34
3.3. Phenotypic markers	35
3.4. Genetic polymorphisms	36
3.5. MicroRNA (miRNA)	37
PERSONAL CONTRIBUTION	41
1. Work hypothesis	43
2. General methodology	45
3. 1st Study – Bristol Stool Form Scale – validation into Romanian	47
3.1. Introduction	47
3.2. Work hypothesis	47
3.3. Material and method	47
3.4. Results	49
3.5. Discussions	52
3.6. Conclusion	54
4. 2nd Study – Alternator phenotype	55
4.1. Introduction	55
4.2. Work hypothesis	55
4.3. Material and method	55
4.4. Results	56
4.5. Discussions	57
4.6. Conclusion	58

5. 3rd Study – Evaluation of MCP-1, anti-vinculin antibodies and nitrotyrosine serum levels for irritable bowel syndrome	59
5.1. Introduction	59
5.2. Work hypothesis	61
5.3. Material and method	61
5.4. Results	62
5.5. Discussions	73
5.6. Conclusion	76
6. 4th Study – Evaluation of miRNA in irritable bowel syndrome	77
6.1. Introduction	77
6.2. Method	78
6.3. Evaluation of miR-23a and miR-181b in irritable bowel syndrome	85
6.3.1. Introduction	85
6.3.2. Work hypothesis	85
6.3.3. Material and method	85
6.3.4. Results	86
6.3.5. Discussions	96
6.3.6. Conclusion	97
6.4. Evaluation of miR-16 in irritable bowel syndrome	98
6.4.1. Introduction	98
6.4.2. Work hypothesis	98
6.4.3. Material and method	98
6.4.4. Results	99
6.4.5. Discussions	102
6.4.6. Conclusion	103
7. General conclusions	105
8. Originality and innovative contribution of the thesis	107
REFERENCES	109
ADDENDA	125

Key-words: biomarkers, inflammation, irritable bowel syndrome, non-invasive diagnosis, miRNA

Introduction

This paper addresses to an increasingly more frequent pathology in the clinical practice – the irritable bowel syndrome (IBS). The interest for the group of functional digestive disorders, including IBS, is manifested throughout a large number of publications addressed to them.

Like for other functional disorders, the IBS pathogenesis is not yet fully known. Multiple mechanisms have been proposed for explaining the pathogenesis of this syndrome, but until now there is not a single mechanism leading to IBS, its etiopathogenesis being currently accepted as multifactorial.

The main purpose of this paper was to research potential IBS specific biomarkers, determined by various techniques, including through cutting-edge techniques, to establish correlations between the proposed markers and to better characterize a lot of patients diagnosed with IBS.

Other main objective has also been to translate and validate the Bristol stool form scale into Romanian, granting medical and research specialists a readily available tool, which is applied in the entire world, both in clinical practice and in studies, for the diagnosis of IBS and for gut transit time assessment.

We set out to evaluate the alternator phenotype in a group of patients diagnosed with IBS, as well as to assess the modifications induced by changing the IBS subtype in relation to the pharmacological treatment.

PERSONAL CONTRIBUTION

1st Study. Bristol stool form scale – validation into Romanian

Until now, the Bristol stool form scale (BSFS) has not been validated into Romanian. The purpose of this study was to translate, adapt and validate the BSFS into Romanian, granting medical and research specialists a readily available tool for the analysis of stool form and intestinal transit time.

This study included 120 subjects working in the medical field (including students of the Faculty of General Medicine) and 60 patients aged over 18 years.

The global value for the Cronbach alpha's coefficient was 0,892 for the first question – answer pair and 0,953 for the second pair (0,844 - 1).

The two sets of question – answer were analyzed for all subgroups of subjects included, using intraclass correlation coefficient, a coefficient used to calculate the reproducibility of a scale or of a survey or questionnaire. Its values in our study are 0,805 and 0,911 for the second set of question – answer.

This study has shown that the Romanian version of the BSFS is a reliable tool, which can be used to evaluate the stool form, just like the one in English, which has been conceived precisely for this purpose.

This tool can be used regardless of the level of education, given that even patients with a lower degree of education were able to correlate the text with the image.

2nd Study. Alternator phenotype

The purposes of this study were to assess the phenotypic characteristics in patients defined as alternators, as well as evaluating the modifications passed on the medication used by these patients.

The study was analytical, retrospective, transversal, observational, cohort-like.

Patients were selected from the Departments of Internal Medicine from 2nd Medical Clinic and Gastroenterology Department from 1st Medical Clinic, patients signing an informed consent form in compliance with the principles of the Declaration of Helsinki for inclusion in the study. A total number of 60 patients (43 females, 17 males; average age $42,2 \pm 14$ years old) were included.

The patients included in the study were diagnosed in accordance with Rome III criteria (see chapter 2). The patients were asked about changes in the type of transit, similarly to the methodology described in other studies. If their answers were positive, they were further questioned about the IBS subtype they had 6 months ago and the one they currently have and have been classified as alternators (IBS-A). Eighteen patients were classified as IBS-A (13 females, 5 males, average age: $49 \pm 15,6$ years old).

Frequently, patients with IBS pass from one subtype of IBS to another. The frequency of alternators in our study was 30%. The least stable phenotype seems to be mixed IBS (IBS-M). The rarest change is between IBS subtypes with constipation (IBS-C) and IBS with diarrhea (IBS-D).

In our pilot study, alternators have resorted more frequently to combination of pharmacological treatments, compared to the ones who don't pass from one subtype to another, and a great number of alternators have changed pharmacological treatments, leading to more frequent use of the medical system, generating higher costs/patient/year, both direct and indirect.

3rd Study. Evaluation of MCP-1, anti-vinculin antibodies and nitrotyrosine serum levels for the irritable bowel syndrome

Given the hypothesis according to which MCP-1 and anti-vinculin antibodies (VCL Ab) are specific to IBS, and that oxidative reactive species (SRO) and nitrosative reactive species (SRN) might contribute to IBS pathogenesis, we aimed to determine:

- MCP-1 in relation to IBS phenotypes
- VCL Ab in relation to IBS phenotypes
- nitrotyrosine (NT) in patients with IBS included in the study; their assessment in relation to IBS phenotypes.

In addition to the analysis of markers in relation to IBS phenotypes, we also set up to analyze comorbidities in the lot of patients with IBS.

A total number of 42 consecutive patients (30 females, 12 males; average age: $55,39 \pm 14,15$ years old) were included. The control lot was composed of 35 subjects (18 females, 17 males average age: $49 \pm 16,31$ years old) who were recruited through similar methods, including local advertisement.

The analysis has shown that for MCP-1 the serum level values were significantly more increased in patients with IBS-D ($p=0,032$) and IBS-M ($p=0,040$), compared with IBS-C. The values were significantly statistically increased in patients with IBS, compared to the control group (average of $2,6 \pm 1,3$; $p=0,020$). The NT values were significantly lower ($p=0,050$) in the lot of patients with IBS (average of: $30,3 \pm 11,6$ nmol/L), compared to the control group (average of: $34,93 \pm 14,39$ nmol/L).

MCP-1 and VCL Ab had significantly higher values in postinfectious IBS (PI-IBS) ($p=0,004$ and $p=0,002$) versus non PI-IBS.

In patients with IBS, we analyzed the most frequent comorbidities. We have found fibromyalgia to be the most frequent one in female patients. Of the psychiatric disorders in female patients, the most frequent

one was the anxiety disorder, and for male patients, the depressive disorder.

4th Study. Evaluation of miRNA in the irritable bowel syndrome

Study 4 is composed of two studies which evaluated a total of three miRNA. The two studies are described individually.

Evaluation of miR-23a and miR-181b in the irritable bowel syndrome

Given the hypothesis according to which miRNAs could be specific IBS biomarkers, we sought to determine two candidate miR:

- miR-23a in relation to IBS phenotypes
- miR-181b in relation to IBS phenotypes
- if there are correlations between miRNA values in different IBS subtypes.

A total number of 40 consecutive patients (29 females, 11 males; average age: $55,35 \pm 14,80$ years old) meeting the Rome III criteria were prospectively included. The control lot consisting of 30 subjects (17 females, 16 males; average age: $49,78 + 16,65$ years old) was recruited.

Using qRT-PCR, the values determined for miR-23a and miR-181b in patients with IBS compared to the control lot identifies an overexpression of miR-23a and miR-181b in patients with IBS, statistically significant ($p=0,0009$, and $p=0,004$) compared to the control lot.

Analyzing the two miR studied in relation with clinical phenotypes, we found only for IBS-D compared with IBS-C a significant difference for the miR-181b expression ($p=0,0335$); for the other subgroups (IBS-M vs. IBS-D, IBS-M vs. IBS-C, non PI-SII vs. PI-SII), the statistical analysis found no significant differences .

The results show that the two proposed miRNA (miR-23a, -181b) had serum level expression statistically significant higher in the group of patients with IBS, compared with control group, providing support for future research of miRNA in IBS.

Evaluation of miR-16 in irritable bowel syndrome

Assuming that one of the miRNAs could be specific IBS biomarker, we intended to determine a candidate miR:

- miR - 16 in relation to IBS phenotypes.

A total of 20 patients (15 female, 5 male; average age $52,75 \pm 14,69$ years) who fulfilled the Rome III criteria were included prospectively. Four patients (20%) were included as PI-IBS, of which 3 were women.

The control group is comprised of 10 subjects (6 women, 4 men; mean age $37 \pm 16,03$ years).

The expression of miR-16 serum was higher in patients with IBS than the ones in the control group, but without reaching a statistical significance ($p = 0,074$). Analyzing the expression level between IBS subtypes for miR-16 did not show significant differences in the expression ($p = 0,991$). Neither in case of the PI-IBS analysis compared to non PI-IBS have not found significant differences ($p = 0,257$).

The results of this pilot study indicate that the expression values from the serum for miR-16 are marginally higher in patients from the IBS group than the control group.

Final Conclusions

This study showed that the Romanian version of BSFS is a reliable tool to be used to assess stool form, according to the original purpose of this scale in its original English version. This tool can be used regardless of the level of education, given that patients with low levels of education could correlate the text with the image.

Our data show the interest of patients towards stool form and intestinal transit type.

We noticed the increasing number of female professionals in the medical system among doctors in relation to an increasing number of female students in the medical education - female Medicine students.

The prevalence of alternators in our study was 30%.

The least stable phenotype appears to be IBS-M. The rarest change is between phenotype IBS-C and IBS-D.

In our pilot study alternators resorted more frequently to association of pharmacological treatment compared to those who have not passed from one subtype to another, and an increasing number of them have changed drug, which leads to the more frequent request of the medical system, generating higher costs/patient/year, both direct and indirect.

IBS registered a higher prevalence in females in all studies carried out (female to male ratio 2,5 - 3:1). Patients are often from urban areas.

The study confirms that the VCL antibodies level is significantly higher in patients from the IBS group compared to the ones from the control group. The study confirms that VCL antibodies could be used as biomarkers for the diagnosis of IBS.

The lower nitrotyrosine values in the group of patients with IBS compared with the control group, suggests that many factors may be involved, given the heterogeneity of IBS phenotypes, particularly food and/or environmental factors.

MCP-1 may be an indicator of atherosclerosis, but it is necessary to quantify this relationship more precisely.

A positive correlation was established between MCP-1 and VCL antibodies for patients with IBS. This supports the idea that a group or a combination of biomarkers rather than just one biomarker could discriminate more precisely between patients with IBS and patients without IBS, or even healthy subjects.

Patients with IBS often have multiple comorbidities, among them being the most common the psychiatric disorders (or from the affectivity spectrum) and fibromyalgia. The incidence of comorbidities is higher among patients with both fibromyalgia and IBS. We have found fibromyalgia to be the most frequent one in female patients. Of the psychiatric disorders in female patients, the most frequent one was the anxiety disorder, and for male patients, the depressive disorder.

Our results show that the two proposed miRNAs (miR-23a, -181b) had serum expression significantly statistic higher in IBS patients compared to the control group, providing support for future miRNAs research in IBS.

The results confirm the data from the literature concerning the stability of samples, the reliability of techniques used and the huge potential of these circulating RNA fragments. The Ingenuity analysis highlights the complex subclinical mechanisms and interactions involving miRNA studied in intestinal pathology.

The result of this pilot study indicates that the expression of serum miR-16 is marginally higher in patients with IBS than the control group. A potential line of research is the investigation of this miR in patients with IBS compared to those with IBD.

The originality and innovative contributions of the thesis

Although there are numerous studies addressed to IBS, there are still many issues not only related to the etiopathogenesis but also to IBS phenotypes that are not yet fully deciphered. Given the heterogeneity of clinical phenotypes, it is extremely difficult to determine a clinical-biological correlation. This need is reflected in the large number of publications, which seek to find answers to many questions raised concerning IBS and the group of functional gastrointestinal disorders.

The innovative character lies in the approach of this thesis, namely in the chapter named Current state of knowledge of concepts related to miRNAs, which is basically the latest direction of global research and the review of the literature in relation to gene polymorphisms and their relationship with the phenotype.

The main merit of this thesis, besides reviewing some of its newest elements – the investigation in the chapter called Personal contributions of several biomarkers measured through different techniques for IBS and the validation in Romanian language of the Bristol Stool Scale Form. By validating this scale, medical and research professionals have been provided an easy-to-use instrument for diagnostic elements necessary to determine the subtype of IBS, and also to determine gut transit time, considering that this scale (English version) has been already recognized for its usefulness in studies and in clinical practice and also it has been validated.

We evaluated through a pilot study the prevalence of the alternator phenotype, which is one of the particular phenotypes, taken into account the temporal instability that marks this phenotype. This pilot study is a first step in trying to better characterize this subset of patients and to understand the etiopathogenetic mechanisms that lead in some patients to rapid changes of the intestinal transit type.

By determining the proposed biomarkers we contributed on an international level, to try to find a biomarker that can be used to diagnose IBS. One of the proposed markers has been the subject of only one study, and one of the three markers has not been studied until now, I am referring here to the biomarkers measured using the ELISA method. This study confirms the results of the first study that investigated VCL antibodies, plus it brings some additional information since our analysis also addressed biomarkers in relation to IBS subtypes. In addition to purely assessing biomarkers of interest, we studied the incidence of fibromyalgia in a group of patients with IBS. We also analyzed the frequency of morbid psychiatric phenotypes in patient the group with IBS.

Although there is data in the literature supporting the utility and reliability of miRNAs proposing them as biomarkers, research in this area is gaining ground, because it is one of the top research topics. We have performed the first study that investigated miRNAs in a group of patients with IBS in Romania, to our knowledge. Through this study we confirmed that in addition to reliability and stability the miRNAs have a huge study potential. In the pilot study we determined miR-16 to initially assess the applicability of the technique, and then we investigated on a larger group of patients another two miRNAs (miR-23a and miR-181b). In this study we found that miR-23a and miR-181b have higher values that are statistically significant in patients with IBS compared to the control group.

Literature data supports the innovative aspect of this thesis. Through the analysis made in the first section of the study we highlighted the paucity of currently available data in the literature concerning the determination miRNAs in IBS.

These studies, both the one which assessed the three biomarkers using the ELISA technique, and particularly those who have investigated miRNAs in IBS are national and world premiere vanguard studies.