

Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

**Plazminogén aktivátor inhibitor-1, mint egy újszerű széklet biomarker a
gyulladásos bélbetegségekben**

Ph.D. Tézis

Jójárt Boldizsár Csaba

Témavezető:

Dr. habil Farkas Klaudia Ph.D.



Szeged
2024

Publikációk listája

A tézishez kapcsolódó publikációk:

1. Jójárt Boldizsár; Resál Tamás; Kata Diána; Molnár Tünde; Bacsur Péter; Szabó Viktória; Varga Árpád; Szántó Kata Judit; Pallagi Petra; Földesi Imre; Tamás Molnár; József Maléth; Klaudia Farkas
Plasminogen activator inhibitor 1 is a novel faecal biomarker for monitoring disease activity and therapeutic response in inflammatory bowel diseases
JOURNAL OF CROHNS & COLITIS (2023) D1/Q1 IF: 8 *

A tézishez nem kapcsolódó publikációk:

1. Péter Bacsur; Mariann Rutka*; András Asbóth; Tamás Resál; Kata Szántó; Boldizsár Jójárt; Anita Bálint; Eszter Ari; Walliyulahi Ajibola; Bálint Kintses et al.
Effects of bowel cleansing on the composition of the gut microbiota in inflammatory bowel disease patients and healthy controls
THERAPEUTIC ADVANCES IN GASTROENTEROLOGY (2023) Q1 IF: 4.2 *
2. Árpád Varga; Tamara Madácsy; Marietta Görög; Aletta Kiss; Petra Susánszki; Viktória Szabó; Boldizsár Jójárt; Krisztina Dudás; Gyula Jr. Farkas; Edit Szederkényi et al.
Human pancreatic ductal organoids with controlled polarity provide a novel ex vivo tool to study epithelial cell physiology
CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES (2023) D1/Q1 IF: 8 *
3. Szabó Viktória; Csákány-Papp Noémi; Görög Marietta; Madacsy Tamara; Varga Árpád; Kiss Aletta; Tél Balint; Jójárt Boldizsár; Crul Tim; Dudás Krisztina et al.
Oral calcium channel inhibition prevents progression of chronic pancreatitis
JCI INSIGHT (2023) D1/Q1 IF: 8 *
4. Kata Judit Szántó; Tamara Madácsy*; Diána Kata; Tamás Ferenci; Mariann Rutka; Anita Bálint; Renáta Bor; Anna Fábián; Ágnes Milassin; Boldizsár Jójárt et al.
Advances in the optimization of therapeutic drug monitoring using serum, tissue and faecal anti-tumour necrosis factor concentration in patients with inflammatory bowel disease treated with TNF- α antagonists
EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY (2021) Q1 IF: 5.589

A publikációk száma összesen: 5 (1 első szerzős)

Kumulatív IF: 33,789

Bevezetés

A Crohn-betegség (CD) és a Colitis ulcerosa (CU) a gyulladós bélbetegség (Inflammatory Bowel Disease-IBD) két leggyakoribb formája, krónikus, szövetet romboló állapotok, amelyek a bélnyálkahártya effektor immunsejtjeinek ellenőrizetlen aktiválásának következtében alakulnak ki. Az IBD incidenciája világszerte folyamatosan növekszik, ehhez hozzájárul a globálisan emelkedett CD és CU betegek száma. A tünetek és a szövődmények nagymértékben csökkentik a betegek életminőségét, valamint szociális és foglalkozási nehézségekhez vezethetnek. Az elmúlt évtizedek jelentős előrelépést hoztak az IBD farmakológiai kezelésében az immunszuppresszív szerek, a biológiai szerek és újabban a kismolekulák bevezetésével. Mindazonáltal, a jelenleg rendelkezésre álló gyulladáscsökkentő terápiák tartós hatékonysága még mindig messze van az optimálistól. A hatékony kezeléssel el lehet érni klinikai remissziót, de a szubklinikai gyulladás fennmaradhat a bélnyálkahártyán belül, ami hozzájárul a "tüneti" visszaesés kockázatához. Az objektív gyulladásmarkereken alapuló betegség monitorozási stratégia és az időben történő terápia eskaláció jobb klinikai és endoszkópos kimenetelhez vezet, mint a pusztán tünetorientált kezelés. Hosszú távon ez a megközelítés csökkentené a páciensek betegséggel kapcsolatos terheit és az egészségügyi rendszer költségeit. Ezért fontos kutatási terület olyan biomarkerek felfedezése és fejlesztése, amelyek hasznos diagnosztikai eszközök lehetnek az orvosok számára, csökkentve a betegség szövődményeinek kialakulását.

A C-reaktív protein (CRP) és a széklet kalprotektin (faecal calprotectin-FC) a betegség nyomon követésére szolgáló, legszélesebb körben vizsgált gyulladós biomarker. Bár a CRP-t gyakran használják, a bélgyulladásra vonatkozóan nem megfelelő az érzékenysége és a specifitása. Az utóbbi időben a székletből származó biomarkerek nem invazív, gyors, egyszerű és olcsó diagnosztikai eszközként jelentek meg a bélgyulladás kimutatására. A legtöbb vizsgálatot az FC-vel végezték, amely ma a székletmarkerek között az arany standardnak számít, azonban jelentős korlátok akadályozzák a mindennapi gyakorlatban való alkalmazását.

Ezeket figyelembe véve kiemelten fontosnak véljük új, alternatív biomarkerek fejlesztését a limitációk kiküszöbölésére, a betegség lefolyásának pontos nyomon követésére és a terápiás válasz előrejelzésére. Kaiko és munkatársai egy nemrégiben megjelent közleményükben egy új fehérjét - a plazminogén-aktivátor inhibitor 1 (PAI-1) - azonosítottak, amely fontos szerepet játszik a kulcsfontosságú gyulladós modulátorok szabályozásában a nyálkahártya károsodása során IBD-ben. Kiemelték azt is, hogy a nyálkahártya Serpin E1 génjének (a PAI-1-et kódoló gén) expressziója emelkedett az aktív, súlyosabb IBD-s betegeknél, akik nem reagálnak az anti-TNF terápiára.. Ezen a tanulmány kiemelte a PAI-1

lehetséges szerepét az IBD patogenezisében, azonban a PAI-1 fehérjeszintje a különböző biológiai mintákban és a betegség aktivitásával vagy a terápiás válasszal való korrelációja ismeretlen maradt.

Célkitűzés

Kutatásunk során célul tűztük ki, a PAI-1 expressziós profiljának átfogó elemzését az IBD-s betegek szérum-, szövet- és széklet mintáiban. Ezáltal megvizsgáljuk szelektivitását, a betegség aktivitásával való összefüggését és a terápiás válasz előrejelzésének lehetőségét az IBD-ben.

Anyagok és módszerek

Beteg populáció és a betegség aktivitásának meghatározása

A vizsgálatba olyan CD-vel és CU-val diagnosztizált betegeket vontunk be, akik 2019 és 2023 között a SZTE-SZAOK Belgyógyászati Klinikáján kolonoszkópos vizsgálaton estek át. A vizsgálatban minden IBD-s beteg részt vehetett, kivéve a 18 év alattiakat, a terhes nőket és azokat, akik nem járultak hozzá a vizsgálatban való részvételhez. Az inaktív IBD csoportot azok a betegek alkották, akiknél a vizsgálat során nem volt aktivitásnak jele. Az aktív IBD csoportba tartozó betegek esetében új terápiás szereket vezettek be vagy a jelenlegi terápiát módosították. A 12 hónapos követési időszak alatt a betegeket szigorúan ellenőriztük a kéthavonta végzett rendszeres viziteken. A demográfiai adatokat, a betegség aktivitására vonatkozó információkat és a terápiás választ minden látogatás alkalmával dokumentáltuk. A CD-s betegeknél a klinikai betegségaktivitást a Crohn-betegség aktivitási indexet (CAI), amíg az CU-s betegeknél a részleges Mayo-pontszám (pMayo) segítségével határoztuk meg. A kolonoszkópiát a bevonáskor és az 52. héten végezték el, kivéve a betegség súlyosbodott, amely a tünetek tisztázása érdekében nem tervezett endoszkópiát igényelt. A kontroll csoportot az IBD-ben nem szenvedő alanyok alkották, akiknél kolonoszkópiát végeztek.

A különböző betegminták gyűjtése

A biopsziákat IBD-s betegek vastagbélnek gyulladt és nem gyulladt területeiről, valamint kontrollok egészséges szigmabeléből vették. A szövetmintákat azonnal jéghideg Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) oldatba helyeztük és a laboratóriumba szállítottuk. A szérum- és székletmintákat az endoszkópia előtt 1-3 nappal gyűjtöttük. A szérum paraméterek (CRP, teljes vérkép) meghatározása minden egyes vizsgálat során megtörtént. A CRP-t 5 mg/l felett emelkedettnek tekintettük. A vérmintákból szérumot izoláltunk és felhasználásig -80°C-on tároltuk. A székletmintákat szintén lefagyasztottuk a további vizsgálatokig.

Humán vastagbél organoid sejt kultúra létrehozása

A humán vastagbél organoid kultúrákat (OC-k) 3-4 biopsziás minták felhasználásával hoztuk létre. Először a vastagbél kriptákat izoláltuk a korábban leírt módon, némi módosítással (Farkas és mtsai. 2011). Az izolált kriptákat Matrigelben reszuszpendáltuk, majd kicseppentettük a 24 lyukú sejtenyésző edénybe. A Matrigel polimerizációja után lyukanként 1 ml tápoldatot adtunk, 10 μ M Rho kináz inhibitorral kiegészítve. A táp médiumot minden második napon cseréltük. Az OC-k passzálásához TrypLE Express mediumot alkalmaztunk.

Teljes fehérje izolálás szövet és széklet mintákból

A teljes fehérjeizoláláshoz a szövetmintákat borotvapengével apró darabokra vágtuk és proteáz inhibitorral kiegészített RIPA lízis pufferbe helyeztük. A biopsziás mintákat szonikátorral homogenizáltuk. Ezt követően a mintákat centrifugáltuk, majd a felülúszót új csőbe helyeztük, gyorsfagyasztottuk és felhasználásig -80°C -on tároltuk. A székletmintákból történő teljes fehérjeizoláláshoz 100 mg székletet 300 μ l proteáz inhibitorral ellátott RIPA lízis pufferben vortexeltük. Ezt követően a mintákat centrifugáltuk, majd a felülúszót egy új csőbe töltöttük, és a centrifugálási lépést megismételtük. A mintákat felhasználásig -80°C -on tároltuk.

Szérum- és szövetminták citokin mintázatának vizsgálata

A szérum és a vastagbélnyálkahártya citokin expressziós mintázatának meghatározásához a gyártó protokollja szerint a Proteome Profiler Human Cytokine Array Kit-et használtuk. 200 μ l szérumot használtunk hígítás nélkül minden szérum citokin meghatározási méréshez. A szöveti citokin mintázat vizsgálatához 500 μ g fehérjét alkalmaztunk. A szövetminták teljes fehérje-koncentrációját Bradford-metodikával határoztuk meg. A membránokon a jeleket ChemiDoc MP készülékkel detektáltuk.

A PAI-1 fehérje szint meghatározása szérum, szövet és széklet mintákban

A PAI-1 koncentrációjának meghatározásához a szérumban, szövetben és székletmintákban a gyártó protokolljának megfelelően egy kereskedelmi forgalomban kapható ELISA metodikát alkalmaztunk. Az ELISA és a Protein Bradford mérésekhez Multiskan FC készüléket használtunk. A szérummintákat a fent leírtak szerint gyűjtöttük és tároltuk. A szérum mérésekhez a mintákat 20-100-szorosára hígítottuk az ELISA-hoz mellékelt pufferrel. A szövet- és organoidminták esetében az összfehérje-koncentrációkat a Bradford-módszerrel határoztuk meg és a fehérjeszinteket az teljes fehérje-koncentrációra normalizáltuk. A PAI-1 szövet- és székletmintákban történő méréséhez az ab269373 ELISA-t validáltuk.

Szövet és organoid minták génexpressziós vizsgálata

A génexpressziós analízist a korábban leírtak szerint végeztük (Molnár et al. 2020). A teljes RNS-t a biopsziákból NucleoSpin RNA Plus Kit segítségével izoláltuk, az organoidokhoz NucleoZOL-t használtunk a gyártó utasításai szerint. iScript cDNS Synthesis Kit-et használtunk

a reverz transzkripcióhoz. A primereket az NCBI Primer-BLAST programban terveztük. Az amplikonokat Lightcycler 96 készüléssel detektáltuk SYBR segítségével.

Immunfluoreszcens festés

Az immunfluoreszcens festéseket a korábban leírtak szerint végeztük (Szabó és mtsai. 2023). A vastagbél-biopsziákat 4%-os PFA-PBS-ben fixáltuk és 30%-os szacharózt használtunk a krioprotekcióhoz. A fixált biopsziás mintákat és organoidokat Cryomatrixba ágyasztuk, -20°C -on lefagyasztottuk, és $7\ \mu\text{m}$ vastagságú metszeteket vágunk. Az organoidokat a metszés után 4%-os PFA-PBS-ben fixáltuk. A biopsziákat Triton-X100-TBS-sel permeabilizáltuk. Organoidok esetében a permeabilizációt citrát-Tween 20 oldattal végeztük rizsfőzőben, indirekt módon forralva. A nem specifikus antitestek kötődését 10% BSA-TBS és 1% kecskeszérumot tartalmazó oldattal blokkoltuk. Az egér monoklonális anti-PAI-1 primer antitestet 1:200 arányban hígítottuk a blokkoló pufferben. A másodlagos ellenanyaghoz Alexa Fluor Plus 488 konjugált kecske antieger másodlagos ellenanyagot alkalmaztunk, a sejtmagokat pedig DAPI-val jelöltük. A fedést követően a képeket Zeiss LSM 880 konfokális mikroszkóppal készítettük 40x olajimmersziós objektívvel.

PAI-1 fehérje stabilitásának vizsgálata széklet mintákban

Megvizsgáltuk a székletmintákban a PAI-1 fehérje stabilitását. 100 mg székletet steril csövekbe szeparáltuk, majd szobahőmérsékleten és 4°C -on inkubáltuk 7 napig. A teljes fehérjeizolálást minden nap elvégeztük. Az izolálási protokoll és a PAI-1 szint meghatározása megegyezett a fent leírtakkal.

Adatok és statisztikai elemzés

A statisztikai elemzést a GraphPad Prism szoftverrel végeztük. Két csoport között párosítatlan Mann-Whitney- vagy párosított Wilcoxon-teszteket végeztünk. Három vagy több csoport esetén Kruskal-Wallis-tesztet alkalmaztunk Dunn többszörös összehasonlítási teszttel. A szignifikanciát $p < 0,05$ -nél fogadtuk el. A korrelációelemzéshez nem-parametrikus Spearman-féle korrelációt használtunk. A MedCalc statisztikai szoftvert használtunk a ROC-elemzéshez.

Etikai engedélyik

A vizsgálathoz a Szegedi Tudományegyetem Regionális és Intézeti Humán Orvosi Biológiai Kutatási Etikai Bizottságától kaptunk etikai engedélyt (247/2018-SZTE; 4412). A kutatást az Orvosi Világszövetség Etikai Kódexe (Helsinki Nyilatkozat) szerint végeztük, és a bevont betegektől írásbeli beleegyezést kaptunk.

Eredmények

Beteg populáció

A vizsgált populáció 132 IBD-s betegből (56 CD és 76 CU) és 40 nem IBD-s betegből állt (10 rendellenesség nélküli, 7 divertikulózisos, 14 vastagbélpolipos és 9 vastagbélrákos). Az átlagéletkor 39 év volt mind a CD (22-72), mind az CU (18-72) esetében. A klinikai remisszióban lévő betegek a 37,5%-át CD-s, a 28,9%-át CU-s betegek tették ki, míg az endoszkópos remissziót a CD betegek 30,4%-ánál és az CU betegek 25%-ánál figyelték meg. Új terápiát a CD betegek 21,4%-ánál és az CU betegek 21,1%-ánál indítottak. A biológiai terápia váltására és dóziszemelésre a CD-s betegek 16,1%-ánál és 14,3%-ánál, valamint az CU-s betegek 17,1%-ánál és 9,2%-ánál került sor.

A szérum és vastagbélnyálkahártya citokin mintázat megkülönbözteti az IBD-s pácienseket a kontrolltól

A citokin profil meghatározáshoz egy szemi-kvantitatív módszert alkalmaztunk, amely segítségével egy mintából 36 különböző citokin detektálható. A vizsgálathoz szérum- és biopsziás mintákat gyűjtöttünk kontroll és IBD-s betegektől, és összehasonlítottuk a citokinek expressziós mintázatát. A CCL-5, CD40 ligand, C5/C5a, CXCL-12, ICAM-1, MIF és PAI-1 minden szérummintában kimutatható volt. Ezt követően meghatároztuk a vastagbélnyálkahártya gyulladt és nem gyulladt részéből vett biopsziák citokin-expresszióját, és összehasonlítottuk őket a kontroll szövet mintákkal. A CXCL-12, ICAM-1, MIF, IL-1RA és IL-16 expresszióját mind az IBD-s, mind a kontroll mintákban kimutattuk. A PAI-1, IL-8, IL-1 β , CXCL-10, CXCL-1 és MIP-1 α/β nagyobb számban volt detektálható ugyanezen betegek gyulladt mintáiban, a nem gyulladthoz hasonlítva. Az IBD-s betegek PAI-1 mintázata a különböző biológiai mintákban nem ismert, ezért további kísérleteket végeztünk.

A szérum PAI-1 koncentrációja emelkedett IBD-s betegekben és lecsökkent a hatékony terápiát követően

Kaiko és mtsi. kutatásukban megfigyelték, hogy a PAI-1 fontos kapcsolódási pont az epitélium és a gyulladás között az IBD patogenezise során. Kimutattuk, hogy a PAI-1 szintje szignifikánsan emelkedett az IBD-s betegek szérummintáiban a kontrollszemélyekhez képest (24,62 ng/ml vs. 30,48 ng/ml, $p=0,0409$). A CU és a CD-s betegek között nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget (27,77 vs 27,44 ng/ml, $p=0,99$). Mindazonáltal, a PAI-1 szignifikánsan magasabbak voltak az endoszkópos vagy klinikai aktivitású IBD-s betegeknél az inaktív és a kontroll betegekhez képest (endoszkóposan aktív vs. inaktív: 27,77 vs. 21,67 ng/ml, $p=0,0018$, endoszkóposan aktív vs kontroll: 27,77 vs 24,62 ng/ml, $p=0,0239$; klinikailag aktív vs inaktív: 27,44 vs 21,7 ng/ml, $p=0,0069$, klinikailag aktív vs kontroll: 27,44 vs 24,62 ng/ml $p=0,0273$). Mindemellett, a CRP emelkedett volt az endoszkópos vagy klinikailag aktív betegeknél, de az CU-betegeknél szignifikánsan alacsonyabb volt a CD-hez képest.

A megnövekedett PAI-1 szérumszint korrelált az endoszkópos aktivitással ($r=0,3265$, $p=0,0008$). A ROC-analízis során azt az eredményt kaptuk, hogy a szérum PAI-1 mérsékelt képességet mutatott az aktív és az inaktív IBD-s betegek (görbe alatti terület (AUC) = 0,71; specificitás: 48%; érzékenység: 87%; határérték: 19,99 ng/ml), valamint a kontrollok és az aktív IBD-s betegek (AUC = 0,69; specificitás: 48%; érzékenység: 87%; határérték: 27,96 ng/ml) közötti különbségtételre.

A PAI-1 szintje a terápia elindítását követően a hatásosan kezelt betegeknél jelentősen csökkent, amíg a hatástalanul kezeltéknél nem volt szignifikáns különbség (hatásosan kezelték: 30,96 ng/ml vs. 21,14 ng/ml, $p<0,0147$; nem reagálók: 26,49 ng/ml vs. 26,87 ng/ml, $p=0,93$). Ezenkívül a kezelés után a szérum PAI-1 koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb volt a reagálóknál, mint a nem reagálóknál. A CRP azonban nem mutatott szignifikáns különbséget a reagáló és a nem reagáló betegek között. Továbbá a ROC-görbék azt mutatták, hogy a CRP mérsékelt képességet mutatott az aktív és inaktív IBD-s betegek (AUC = 0,74; specificitás: 96%; érzékenység: 50%; határérték: 9,3 mg/ml), valamint a CD-s és CU-s betegek (AUC = 0,82; specificitás: 78%; érzékenység: 74%; határérték: 15,3 mg/ml) megkülönböztetésére.

A szöveti Serpin E1 génexpressziós változása szignifikánsan magasabb az IBD-s betegekben és csökkent a hatásosan kezelt pácienseknél

Meghatároztuk a Serpin E1 (a PAI-1-et kódoló gén) relatív génexpressziós változását nem IBD-s kontrollszemélyek, terápia-naiv, aktív IBD-s betegek, valamint a terápiára reagáló és nem reagáló betegek vastagbél biopsziásmintáiban. A kontrollmintákhoz képest a nyálkahártya Serpin E1 expressziója szignifikánsan magasabb volt a terápia-naiv, aktív IBD-s betegeknél (2,585 vs. 18,17, $p=0,006$), de nem mutatott szignifikáns különbséget a CD és CU betegek között. Ezenkívül a Serpin E1 génexpressziója szignifikánsan alacsonyabb volt az endoszkóposan nem aktív betegeknél az aktívakhoz képest (0,96 vs 14,32; $p<0,0001$), valamint a terápiára reagáló betegeknél a kezeletlen betegekhez képest (0,9326 vs 18,17, $p<0,0001$), illetve a nem reagálókhoz képest (0,9326 vs 8,487; $p=0,002$).

Ugyanezen mintákból meghatároztuk a négy jól ismert gyulladásozó gén, a TNF- α , az IL-1 β , az IL-6 és a TGF- β relatív expresszióját is. Ezekben a kísérletekben az IL-1 β és a TGF- β emelkedett expressziót mutatott a kezeletlen IBD-biopsziákban, míg a TNF- α és az IL-6 nem volt szignifikánsan emelkedett. A négy másik gén közül csak a TGF- β és az IL-1 β mutatott emelkedett expressziót az endoszkóposan aktív IBD-s betegeknél, és csökkent a reagálóknál.

A mukózális PAI-1 szint magasabb az IBD-s betegeknél és szignifikánsan csökken a terápiára reagálóknál

Immunfluoreszcens festést végeztünk biopsziás mintákon a PAI-1 fehérjeexpressziójának és lokalizációjának meghatározására a vastagbél nyálkahártyájában. Az emelkedett génexpressziót követően a PAI-1 pozitív sejtek száma szignifikánsan magasabb volt a vastagbél gyulladt részéből nyert biopsziás mintákban (IBD vs kontroll: 18,52% vs 5,718%, $p=0,0014$; IBD vs inaktív IBD: 18,52% vs 6,651%, $p=0,0126$), míg a nem gyulladt részen nem mutatkozott különbség a kontrollmintákhoz képest (5,716% vs 6,641%, $p>0,9999$). Figyelemre méltó, hogy a PAI-1-pozitív sejtek többsége elsősorban az epitél sejteknél volt megfigyelhető.

Ezután teljes fehérjét izoláltuk a biopsziás mintákból, és meghatároztuk a PAI-1 koncentrációját a vastagbél szövetben, amely szignifikánsan magasabb volt az IBD mintákban (0,00 vs. 55,96 pg/mg, $p=0,001$). A CD és az CU betegek között azonban nem mutattunk ki szignifikáns különbséget (29,24 vs 40,55 pg/mg, $p=0,7903$). Ezenkívül a PAI-1 koncentrációja szignifikánsan magasabb volt az endoszkópos (aktív vs. inaktív: 40,83 vs. 0,23 pg/mg, $p<0,0001$; aktív vs. kontroll: 40,83 vs. 0,00, $p<0,0001$) vagy klinikai aktivitású betegeknél (aktív vs. inaktív: 40,55 vs. 2,770 pg/mg, $p=0,0015$; aktív vs. kontroll: 40,55 vs. 0,00 pg/mg, $p<0,0001$), mint a kontroll vagy inaktív pácienseknél. Mindemellett, a nyálkahártya PAI-1 koncentrációja nem különbözött szignifikánsan az inaktív betegek és a kontrollok között.

A megnövekedett nyálkahártya PAI-1 szint összefüggést mutatott az endoszkópos aktivitással ($r=0,578$, $p<0,0001$). A ROC-görbék azt mutatták, hogy a nyálkahártya PAI-1 koncentráció jól el tudta különíteni az aktív és az inaktív IBD-s betegeket (AUC=0,81; specificitás: 83%; érzékenység: 72%; határérték: 18,16 pg/mg), valamint a kontrollok és az aktív IBD-s betegek között (AUC=0,88; specificitás: 100%; érzékenység: 72%; határérték: 15,49 pg/mg). Mindemellett, a kezelt betegeknél a kezdeti PAI-1-szint szignifikánsan magasabb volt a regáló betegeknél, mint a hatástalanul kezeltéknél (62,77 vs. 34,15 pg/mg, $p=0,03$). Figyelemre méltó, hogy a nyálkahártya PAI-1 koncentrációja jelentősen csökkent a válaszadóknál, amíg ez nem volt megfigyelhető a hatástalanul kezeltéknél (válaszadók: 62,77 vs 0,23 pg/mg, $p=0,0001$, nem reagálók: 62,77 vs 0,23 pg/mg, $p=0,0001$; 34,15 vs 24,58 pg/mg, $p=0,58$). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a PAI-1 szöveti koncentrációja korrelál a betegség aktivitásával, és a terápiára adott válaszként csökken.

A PAI-1 expressziója magasabb IBD-s szövetből indított vastagbél organoid sejt kultúrában a kontrollhoz viszonyítva

Annak érdekében, hogy a vastagbél szövetben a PAI-1 elsődleges forrásai lehetnek-e az epitél sejtek, kontrollszemélyektől és aktív betegségben szenvedő IBD-s betegektől vett biopsziás mintákból vastagbél organoid sejt kultúrákat (OC) hoztunk létre. Kísérleteinkben az OC-eket az első és a második passzázs között használtuk a kísérletekhez, hogy elkerüljük a

gyulladásos fenotípus változásait. Az immunfestés kimutatta, hogy a PAI-1 expressziója magasabb volt az IBD organoidokban. Emellett a SERPINE1 relatív génexpressziós változása magasabb volt a gyulladt IBD-s organoidokban, azonban a különbség nem volt szignifikáns (2,034 vs 1,003 ng/g, $p=0,3095$). Továbbá a PAI-1 fehérje koncentrációja az organoidokban (35,29 vs 0,00 ng/g, $p=0,0286$) és a médiumban (31,28 vs 28,50 ng/g, $p=0,0423$) szignifikánsan magasabb volt az IBD organoidokban a kontrollhoz képest.

A PAI-1, mint potenciális biomarker az IBD-ben

Az IBD-ben széles körben elfogadott betegségmegfigyelési stratégia gyors, olcsó és könnyen hozzáférhető biomarkerek, amelyek lehetővé teszik a betegek önellenőrzését. A székletből származó markerek alkalmasak e célok elérésére, ezért a következő lépésben elemeztük a PAI-1 székletből származó koncentrációját IBD-s betegeknél. Először a PAI-1 stabilitását vizsgáltuk a székletben szobahőmérsékleten és 4°C-on, mivel ez egy széklet biomarker esetében kulcsfontosságú paraméter. Eredményeink azt mutatják, hogy a PAI-1 7 napig stabil marad 4 °C-on az IBD-s betegektől gyűjtött székletmintákban. Emellett kimutattuk, hogy a PAI-1 szintje szobahőmérsékleten az első 24 órában csökkent, de 7 napig stabil maradt. Figyelemre méltó, hogy ezekben a kísérletekben nem használtunk semmilyen stabilizáló vagy enzimgátló szert, ami feltehetően tovább javíthatja a PAI-1 stabilitását.

A következő lépésben összehasonlítottuk a PAI-1 koncentrációját kontrolloktól és IBD-s betegektől gyűjtött székletmintákban. Eredményeink azt mutatták, hogy a PAI-1 szintje szignifikánsan magasabb volt az IBD-s betegek székletmintáiban (0,00 vs. 0,84 ng/g, $p<0,0001$). A szérum- és szöveti PAI-1 szintjéhez hasonlóan nem találtunk szignifikáns különbséget az CU és CD betegek között (0,77 vs. 1,15 ng/g, $p=0,73$). Fontos, hogy a széklet PAI-1 koncentrációja korrelált az endoszkópos és klinikai betegségaktivitással, és szignifikánsan magasabb volt az endoszkóposan vagy klinikailag aktív betegségben szenvedő betegeknél az inaktív betegekhez és a kontrollokhoz képest (endoszkóposan aktív IBD vs. inaktív IBD: 1,535 vs 0,215 ng/g, $p<0,0001$, endoszkóposan aktív IBD vs kontroll: 1,535 vs 0,02 ng/g, $p<0,0001$; klinikailag aktív IBD vs inaktív IBD: 1,45 vs 0,01 ng/g, $p<0,0001$, klinikailag aktív IBD vs kontroll: 1,45 vs 0,02 ng/g, $p<0,0001$).

A megnövekedett széklet PAI-1 szint korrelált az endoszkópos aktivitással ($r=0,5501$, $p<0,0001$), míg a ROC-görbék azt mutatták, hogy a széklet PAI-1 viszonylag nagy különbséget tudott tenni az aktív és inaktív IBD-s betegek között (AUC = 0,82; specificitás: 80%; érzékenység: 74%; cut-off: 0,6 ng/g), valamint a kontrollok és az aktív IBD-s betegek között (AUC = 0,83; specificitás: 62%; érzékenység: 88%; cut-off: 0,2 ng/g).

Ugyanebben a betegcsoportban a CRP-szint szignifikánsan emelkedett a klinikailag vagy endoszkóposan aktív betegeknél is, azonban nem találtunk összefüggést a CRP és a széklet PAI-1 szintje között. Végül a széklet PAI-1 koncentrációja a kezelés után szignifikánsan alacsonyabb volt a reagálóknál a nem reagálókhoz képest (0,33 vs. 1,1 pg/g, $p=0,047$). Fontos, hogy a CRP nem mutatott szignifikáns különbséget a reagáló és a nem reagáló betegek között. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a székletből származó PAI-1 új biomarkerként használható az IBD-s betegek klinikai nyomonkövetésében.

A PAI-1 potenciális széklet marker különböző kolorektális betegségek megkülönböztetésére

Az ellentmondásos szelektivitás a jelenlegi arany standard FC egyik legjelentősebb korlátja, amely más organikus gyomor-bélrendszeri (gastro-intestinal-GI) betegségek esetén is emelkedett lehet. A széklet PAI-1 szelektivitásának felmérése érdekében mintákat gyűjtöttünk negatív kontrolloktól, IBD-s betegetől és olyan betegetől, akiknek a kolonoszkópián kimutatható szerves elváltozásai voltak, kivéve az IBD-t. A mintákat 6 csoportba soroltuk: negatív, aktív IBD, inaktív IBD, adenóma, vastagbélrák és divertikulózis (gyulladás nélkül). Azt tapasztaltuk, hogy a széklet PAI-1 értéke csak az aktív IBD-ben volt emelkedett. Ezzel szemben más GI-betegségekben nem mutatott szignifikáns emelkedést.

Hogy információt nyerjünk a betegség lokalizációjától való függésről, összehasonlítottuk a PAI-1 székletkoncentrációját ileális, kolonális vagy ileokolonális lokalizációjú betegeknél. Ebben a kohorszban a széklet PAI-1 koncentrációja szignifikánsan magasabb volt a vastagbél- és ileokolonális lokalizációjú betegeknél. Bár az ileális lokalizációjú betegeknél emelkedett volt a széklet PAI-1 koncentrációja, a különbség nem volt szignifikáns a kontrollokhoz képest. Figyelemre méltó, hogy a széklet PAI-1-koncentrációja között nem volt szignifikáns különbség az ileális, a kolonális vagy a kombinált lokalizációban. Az alacsony elemszámok miatt ezek a megfigyelések további vizsgálatot igényel.

Diszkusszió

Korábban megfigyelték, hogy a PAI-1 egy fontos kapcsolati pont lehet az epitél sejtek és a gyulladás között, amely emelkedett mukózális génexpressziót mutatott olyan IBD-s betegeknél, akik nem reagáltak a TNF-ellenes biológiai terápiára. Kutatásunk során kimutattuk, hogy a szérumban, a nyálkahártyában és a széklet PAI-1 koncentrációja szelektíven emelkedett a klinikai és endoszkópos aktivitást mutató IBD-s betegeknél, de más organikus GI betegségekben nem, és a sikeres terápiára reagálóknál szignifikánsan csökkent.

Az IBD-ben alapvető fontosságú az időben történő kezelés és a kezelési stratégiák optimalizálása a relapszusokban. Az IBD optimális kezelése a korai diagnózisra és

beavatkozásra, a célzott kezelési stratégiákra és a betegség szoros ellenőrzésére épül. A rendelkezésre álló gyógyszerek száma ellenére jelentős arányban fordulnak elő primer nem-reakciók, a válasz elmaradása vagy mellékhatások, ami további kezelési lehetőségeket tesz szükségessé. Az IBD egyik döntő jellemzője a kiegyensúlyozatlan gyulladási válasz, ahol a különböző keringő immunológiai sejtek transzcelluláris jeleket kapnak és választanak ki, amelyek jelentős hatással lehetnek a betegség lefolyására. Ezért a pro- és anti-inflammatorikus citokin és kemokin összetétel átfogó elemzése segíthet új biomarkerek azonosításában. Vizsgálatunkban egy szemi-kvantitatív módszert alkalmaztunk a citokinek expressziós profiljának összehasonlítására a szérumban és szövetben egyaránt. Ennek következtében azonosítottuk a PAI-1-et, amely az IBD-s betegek gyulladt nyálkahártya-mintáiban emelkedett volt, a kontrolloknál azonban nem mutatták ki az expressziót. Ezenkívül úgy tűnt, hogy a PAI-1 képes megkülönböztetni a gyulladt és a nem gyulladt területeket, ezért ezt a fehérjét előtérbe helyezve további kísérletek végeztünk.

A PAI-1, amelyet a Serpin E1 gén kódol, a szerin proteáz inhibitor (szerpin) család tagja és elsődleges funkciója a tPA és az uPA gátlása, amelyeknek fontos szerepük van a fibrinolízisben és az extracelluláris mátrix homeosztázisában. A PAI-1 expresszióját számos növekedési faktor, hormon és gyulladási citokin (pl. TNF- α , IL-1 β , IL-6 és TGF- β) szabályozza, miközben különböző sejtípusok (pl. endothel-, epithel- és immunsejtek) szekretálhatják, és pleiotróp citokinként hat. Kaiko és munkatársai több független kohorszban azonosítottak egy immun-koagulációs géntengelyt az IBD-ben, ahol az emelkedett PAI-1 központi szerepet játszott a kulcsfontosságú gyulladási modulátorok és a nyálkahártya károsodásának szabályozásában IBD-ben. Eredményeink szintén megerősítették az emelkedett nyálkahártya Serpin E1 génexpressziót aktív IBD-s betegeknél. Ezen túlmenően szignifikánsan megnövekedett PAI-1 koncentrációt mutattunk ki aktív IBD-s betegek szérum- és nyálkahártya-mintáiban. Fontos, hogy a szérum és a nyálkahártya PAI-1 koncentrációja, valamint a Serpin E1 gén expressziója a vastagbél szövetben jelentősen csökkent azoknál a betegeknél, akik reagáltak a terápiára. Figyelemre méltó, hogy a PAI-1 pozitív sejteket a vastagbél kriptáinak epithéliumában volt kimutatható. A PAI-1 pozitív sejtek hasonló expressziós mintázatát írta le Kaiko és munkatársai. A PAI-1 expressziójára és szekréciójára képes epithel sejtek képességének bizonyítására vastagbél organoidokat használtunk. Ezen sejt kultúrák primer epithel sejtekből állnak, amelyek átfogóan képesek utánozni az eredeti sejtípusok biológiai jellemzőit. Vizsgálatunkban az organoidokban a PAI-1 koncentrációja és a médiumba szekretált PAI-1 koncentrációja magasabb volt az IBD organoidokban a kontrollhoz képest, ami megerősíti, hogy az epithel sejtek lehetnek a PAI-1 egyik fő forrása.

Az IBD-vel kapcsolatos általános ellátási költségek szintén növekedtek az elmúlt 5 évben, és az éves átlagos egészségügyi költségek több, mint háromszor magasabbak, mint az IBD nélküli betegek esetében. A biológiai terápián alapuló, egyénre szabott kezelés, amely inkább a betegség progressziójának megelőzésére összpontosít, kezdetben költséges, de végül a műtétek és kórházi kezelések arányának csökkenéséhez vezethet, ami potenciálisan alacsonyabb hosszú távú kezelési költségeket eredményezhet. E célok eléréséhez elengedhetetlen a megbízható, könnyen és viszonylag olcsón mérhető biomarker. A szerológiai laboratóriumi paraméterek, a teljes leukocitaszám, a CRP és az ESR az IBD közvetett, objektív, de nem specifikus markerei. Ebben a vizsgálatban mind a szérums PAI-1, mind a CRP emelkedett volt az aktív IBD-s betegeknél. Emellett a szérums PAI-1 koncentrációja jelentősen csökkent a terápiára reagáló betegeknél, míg a CRP emelkedett maradt. Figyelemre méltó, hogy számos tanulmány kimutatta a szérums biomarkerek viszonylag gyenge érzékenységét és specificitását az IBD diagnózisában és a betegek monitorozásában.

A közelmúltban végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a székletből származó biomarkerek erősen korrelálnak az IBD-ben jelentkező nyálkahártya-gyulladással. A számos lehetséges székletbiomarker közül a legtöbb vizsgálatot az FC-vel végezték, amely ma a székletmarkerek arany standardja. Számos tanulmány számolt be arról, hogy az FC AUC értéke 0,8-0,9 között van a különböző betegpopulációkban. Ennél magasabb értéket akkor mértek, ha az FC-t más markerekkel, például az Oncostatin M-mel kombinálták. Kísérleteinkben a széklet PAI-1 koncentrációja szignifikánsan magasabb volt az aktív IBD-s betegeknél a kontrollokhoz képest (AUC = 0,83), valamint az aktív vs inaktív IBD-s és kontroll mintákban (AUC=0,82). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a széklet PAI-1 hasonló az FC-hez. Az FC-nek azonban jelentős korlátai vannak klinikai körülmények között. Először is, több tanulmány is bizonyította, hogy az FC nem specifikus az IBD-re, és megemelkedik vastagbélrák, gastroenteritisz, irritábilis bél szindróma, divertikulitisz, ételintolerancia és nem szteroid enteropátia esetén is. Betegcsoportunkban a székletből származó PAI-1 magas szelektivitást mutatott, mivel csak az aktív IBD-s betegeknél volt emelkedett. Ezzel szemben más GI-betegségekben nem volt szignifikánsan magasabb. Ezenkívül az FC-koncentrációt befolyásolják a betegségtől független tényezők, mint például az életkor és a társbetegségek, és jelentős napi szintű változékonyságot mutat. Nincsenek optimális határértékek az aktív és inaktív betegség meghatározására, illetve a klinikai és endoszkópos remisszió vagy a kezelésre adott válasz előrejelzésére. Az FC-szint lokalizációfüggő, mivel a vékonybélben elhelyezkedő CD-ben gyakran normális értéket mutat, és nem képes különbséget tenni a CD és az CU között. Előzetes eredményeink azt mutatták, hogy a székletből származó PAI-1 magasabb volt a

vastagbél- és ileokolonbetegség lokalizációjú betegeknél. Emellett az ileális lokalizációjú betegeknél is magasabb volt, de a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns. Ezért ez a paraméter további vizsgálatot igényel. Egy nemrégiben végzett vizsgálat kiemelte, hogy az FC szobahőmérsékleten instabil, ami rossz diagnózishoz vezethet IBD-s gyermekeknél. Ezzel szemben a székletből származó PAI-1 akár egy hétig is nagyfokú stabilitást mutatott.

A vizsgálatnak azonban vannak bizonyos korlátai. Először is, az elemszám nem tette lehetővé a betegség típusa, helye és a kezelés típusa szerinti alcsoportok elemzését. A széklet PAI-1 prediktív értékének megerősítéséhez a visszaesések előrejelzésében longitudinális mintavételre lesz szükség, ami jelenleg folyamatban van. Az eredmények további validálásához nagy betegpopuláción végzett multicentrikus klinikai vizsgálatokra lesz szükség. Másrészt a jelenlegi munkának több erőssége is van. Először is, ez az első széleskörű meghatározása a PAI-1-nek különböző biológiai mintákban (szérum, vastagbélnyálkahártya és széklet) a gén- és fehérje expresszió szintjén. Ezzel szemben a korábbi jelentés kizárólag a vastagbélnyálkahártya génexpressziójára összpontosított. További erősségünk egy potenciális szelektív széklet biomarker azonosítása, amely felhasználható lenne az IBD-ben szenvedő betegek monitorozására.

Új megfigyelések

- **A PAI-1 fehérjeszintje az aktív IBD-ben szenvedő betegeknél megemelkedett:** Azt figyeltük meg, hogy a PAI-1 koncentrációja emelkedett az endoszkóposan és klinikailag aktív IBD-s betegek szérum-, nyálkahártya- és székletmintáiban az egészséges kontrollokhöz és az inaktív IBD páciensekhez képest.
- **A hatékony terápiák csökkentik a PAI-1 koncentrációját:** Eredményeink alapján a hatékony kezelést követően a szérum, a nyálkahártya és a széklet PAI-1 szintje jelentősen csökkent a reagálóknál.
- **A Serpin E1 (PAI-1-et kódoló gén) génexpressziója tükrözi a betegség aktivitását és a terápiás választ:** A Serpin E1 mukózális génexpressziós mintázata hasonló a fehérjeszinthez.
- **A mukózális PAI-1 forrása az epitél sejtek lehetnek:** a PAI-1 koncentrációja az organoidokban és a médiumban magasabb volt az IBD-s organoidokban.
- **A szérum, a nyálkahártya és a széklet PAI-1 szintje korrelál a betegség aktivitásával:** Meghatároztuk, hogy az IBD-s betegek szérum-, nyálkahártya- és székletmintáiban pozitív korreláció van a PAI-1 koncentrációja és az endoszkópos

aktivitás között. A ROC-görbék továbbá azt mutatták, hogy a PAI-1-szint viszonylag nagy erőt mutat az aktív és az inaktív IBD-s vagy kontrollbetegek megkülönböztetésére.

- **A PAI-1 fehérje a székletmintában szobahőmérsékleten és 4°C-on 7 napig meglehetősen stabil:** A PAI-1 fehérje kimutatható volt a székletből, ha azt szobahőmérsékleten és 4°C-on inkubáltuk.
- **A széklet PAI-1 koncentrációja szelektíven emelkedett aktív IBD-s betegeknél:** Kimutattuk, hogy a széklet PAI-1 szintje csak aktív IBD-ben emelkedett. Ezért meg tudta különböztetni az aktív IBD-s betegeket az egyéb GI betegségekben szenvedőktől.

Köszönetnyilvánítás

Nagyon hálás vagyok témavezetőmnek, Dr. habil Klaudia Farkasnak a kutatásomban nyújtott támogatásáért és segítségéért. Külön köszönetet szeretnék mondani Dr. Maléth Józsefnek a lehetőségért, hogy a laboratóriumában dolgozhattam és megvalósíthattam elképzelésemet. Segítségük hozzájárult a dolgozat elkészítéséhez. Hálás vagyok kollégáimnak és barátaimnak: Kúthy-Sutus Enikő, Susánszki Petra, Dudás Krisztina, Laub Hajnalka, Csákány-Papp Noémi, Pallagi Petra, Sáriné Konczos Zsuzsanna, Csicsely Stefánia, Görög Marietta, Madácsy Tamara, Kiss Aletta, Molnár Tünde, Varga Árpád, Tél Bálint és Tim Crul. Köszönettel tartozom a Colorectális Kutatócsoport vezetőjének, Prof. Dr. Molnár Tamásnak és a csoport tagjainak: Dr. Bacsur Péter, Dr. Resál Tamás, Dr. Szántó Kata, Dr. Farkas Bernadett, Dr. Bálint Anita, Dr. Rutka Mariann, Csorba Brigitta, Tóth-Káli Csilla, Konkolyiné Ördög Krisztina és Pócsik Gabriella. Köszönetet kell mondanom Dr. Kata Diánának és Dr. Földesi Imrének a kutatásban nyújtott munkájukért és segítségükért. Köszönöm a Ladon Therapeutics Kft-nek, hogy támogatta ezt a projektet és lehetővé tette a "know-how" kifejlesztését. Szeretném megköszönni szerelmemnek és kolléganőmnek, Dr. Szabó Viktóriának a segítségét, tippjeit és támogatását a laborban és otthon. Javaslati és példamutatása mindig segítettek és motiváltak a doktori úton. Szeretném megköszönni a családjának (Kata, Berci, Gabi és az egész család) is a segítségét. Végül, de nem utolsó sorban, hálával tartozom anyukámnak, apukámnak, testvéreimnek (Zsófi és Júlia), sógoromnak (Dávid) és keresztfiamnak (Fülöp), hogy támogatták célomat és álmomat az életemben. Hálás vagyok továbbá az egész Családomnak, a barátaimnak és mindenkinek, aki ebben segített. Szeretnék köszönetet mondani minden betegnek, aki részt vett ebben a vizsgálatban. Remélem, hogy eredményeink hozzájárulnak a jövőben a gyógyulásukhoz. Végül szeretnék megemlékezni azokról, akik nem ünnepelhetik velem ezt a disszertációt. Nekik ajánlom ezt a dolgozatot.