

# Az intesztinális alkalikus foszfátáz vizsgálata gyermekkori gyulladásos bélbetegségben és cöliákiában

Doktori tézisek

**Dr. Molnár Kriszta**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Veres Gábor egyetemi docens, Ph.D.

Bírálok: Dr. Kriván Gergely osztályvezető főorvos, Ph.D.

Dr. Lendvai Gábor tudományos munkatárs, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Schaff Zsuzsa egyetemi tanár,  
az orvostudományok doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Juhász Márk egyetemi adjunktus, Ph.D.

Dr. Tóth Gergely egyetemi adjunktus, Ph.D.

Budapest  
2012

## BEVEZETÉS

A bélnyálkahártya nem csupán egy fizikai gátat képez a patogénekkal szemben, hanem egy érzékeny szerkezet, amely a környezeti változásokra fokozottan reagál. A helytelen immunválasz, valamint a mukózális barrier sérülése hozzájárulhat genetikailag fogékony egyéneknél a gyulladásos bélbetegség (IBD) és a cöliákia (CD) kialakulásához. Az IBD és CD genetikai háttere, patomechanizmusa, lokalizációja teljesen eltérő, de mindkettő kialakulásában alapvető fontosságú a mukózális homeosztázis felborulása és a következményes nyálkahártya-sérülés. Az alkalikus foszfatáz (ALP) a rutin laboratóriumi vizsgálatok egyik leggyakrabban vizsgált enzime, amely előfordul a bélben, májban, csontban, vesében, placentában, valamint herében. Az intesztinális alkalikus foszfatáz (iAP) szabályozza a zsírfelszívódást és az organikus foszfátok hidrolizálását, valamint a bél mukózális integritásának fenntartását.

A veleszületett immunrendszer aktiválása részben a mintázatfelismerő receptorok (PRR) tulajdonságaitól is függ. A PRR-k családjába tartoznak a Toll-like receptorok (TLR), amelyek ligandja a Gram negatív baktérium alkotórésze a lipopoliszacharid (LPS). Az iAP kiemelt jelentőségű az intesztinális barrierintegritás fenntartásában és az antiinflammatorikus válaszok kiváltásában, mert detoxifikálni képes az LPS-t, így a TLR-függő gyulladásos válaszok nem aktiválódnak.

Előzetesen munkacsoportunk kimutatta, hogy a TLR4 expressziója fokozódik újonnan diagnosztizált IBD-s gyermekek gyulladt kolon és újonnan diagnosztizált CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájában a kontrollhoz képest. Felnőtt IBD-s kolon nyálkahártyájában csökkent az LPS-defoszforiláló aktivitása, amely az iAP aktivitás csökkenésével is magyarázható, de az iAP fehérjemennyiségét nem vizsgálták. Az iAP bélgyulladásra gyakorolt pozitív hatását állatmodellben is kimutatták. Az iAP-KO egerekben a bélgyulladás szövettanilag súlyosabb volt a vad típusú egerekhez képest kémiai kólitisz hatására és iAP tabletta a kólitisz tüneteit mindkét vizsgált csoportban csökkentette. Újonnan diagnosztizált CD-s gyermekek bélnyálkahártyájában az iAP enzimaktivitása csökkent a közép- és súlyos mukózális lézióban, de gluténmentes diétát tartó gyermekekben az iAP enzimaktivitás fiziológiai szintre emelkedett.

Az iAP gyermekkori bélgyulladásban, valamint CD-ben betöltött szerepét irodalmi adatok alapján még nem vizsgálták.

## **CÉLKITŰZÉSEK**

Célkitűzésem volt az iAP expressziójának vizsgálata idült gyulladásos bélbetegségben szenvedő (IBD-s) gyermekek kolon nyálkahártyájában, valamint cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában. Eddig még nem vizsgálták fehérjeszinten az iAP megjelenését, pedig ez alapvető jelentőségű, ha egy enzim szerepét analizáljuk. A legfontosabb kérdéseim a következők voltak:

### **I. Az iAP expressziójának és iAP-TLR4 lokalizációjának vizsgálata IBD-s gyermekek kolon nyálkahártyájában**

1. Van-e változás az iAP mRNS expressziójában, valamint fehérjeszintjeiben Crohn-beteg (MC) és kolitisz ulcerózással (UC) gyermekek gyulladt vastagbél nyálkahártyájában nem IBD-s kontrollhoz képest?
2. Megfigyelhető-e különbség az iAP mRNS expressziójában és fehérjeszintjében MC-s beteg gyermekek gyulladt és nem-gyulladt kolon nyálkahártyája között?
3. Megfigyelhető-e különbség az iAP és a TLR4 lokalizációjában MC és UC-s gyermekek kolon nyálkahártyájában a kontrollcsoportéhoz képest?

### **II. Az iAP expressziójának és az iAP-TLR4 lokalizációjának vizsgálata CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájában**

1. Hogyan változik az iAP mRNS expressziója és fehérjeszintje CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájában nem cöliákiás kontrollokhoz viszonyítva?
2. Megfigyelhető-e különbség az újonnan diagnosztizált CD-s és GFD-t tartó CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájának iAP mRNS expressziójában és fehérje szintjében?
3. Megfigyelhető-e különbség az iAP és a TLR4 lokalizációjában újonnan diagnosztizált, CD-s és GFD-t tartó CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájában a kontrollcsoportéhoz képest?

## **BETEGANYAG és MÓDSZEREK**

### **I. Egészséges és beteg csoportok**

#### I.1. Gyulladásos bélbetegségben szenvedő (IBD-s) betegek és kontroll kolonoszkópiás csoport

Tíz gyermeket (7 fiú, 3 lány; medián kor: 10,5 év, életkor: 1,5-15 év) újonnan diagnosztizált MC-vel, 5 gyermeket (3 fiú, 2 lány; medián kor: 11 év, életkor: 6-17 év) újonnan diagnosztizált UC-vel és 10 kontroll gyermeket (5 fiú, 5 lány; medián kor: 9,5 év, életkor: 1,5-16 év) vontam be a vizsgálatokba. Az IBD diagnózisának felállítása a Porto kritériumok szerint történt. A kolonoszkópia során nyert biopsziás mintavétel a makroszkóposan gyulladt és nem-gyulladt vastagbél nyálkahártyából történt.

Tíz egészséges gyermekből történt kontroll biopsziás mintavétel, akik rektális vérzés, székrekedés vagy fogyás miatt kerültek gyermek-gasztroenterológiai osztályunkra. A kolonoszkópia a kivizsgálási folyamat része volt és a kolon mukóza mind makroszkóposan, mind mikroszkóposan épnek bizonyult, a gyermekeknél organikus okot nem találtunk.

#### I.2. Cöliákiás betegek és felső endoszkópián átesett kontrollcsoport

Tíz újonnan diagnosztizált CD-s gyermek (2 fiú, 8 lány; median kor: 4 év, életkor: 2-12 év), 5 GFD-n tartott CD-s gyermek (2 fiú, 3 lány; median kor: 12 év, életkor: 6-13 év) és 10 kontroll gyermek (5 fiú, 5 lány; median kor: 9,5 év, életkor: 2-16 év) bevonása történt a vizsgálatba. A CD kórismézése az Európai Gyermekgasztroenterológiai, Hepatológiai és Táplálási Társaság (ESPGHAN) kritériumrendszere alapján történt. A GFD-n tartott CD-s gyermekek teljes klinikai és szövettani remisszióba kerültek, melyet a szöveti transzglutamináz (TG) normál tartományba kerülése is jelzett. Az első és második biopsziás mintavétel között eltelt idő átlagosan 1,5 év volt (0,5-2,5 év között) a GFD-s gyermekeknél. A kontrollcsoportba tartozó gyermekek kivizsgálása idült hasi fájdalom vagy krónikus hasmenés miatt történt a Semmelweis Egyetem I. sz. Gyermekklinikájának gasztroenterológiai osztályán. Az endoszkópiás vizsgálatot az esetleges organikus ok kizárására végeztük. Valamennyi esetben a szöveti TG szintek a normál tartományban voltak és szövettanilag semmilyen kóros elváltozást nem mutatott a vékonybél nyálkahártya a vizsgált gyermekekben.

A szükséges etikai engedéllyel és írásos szülői beleegyező nyilatkozattal mindegyik vizsgálat kapcsán rendelkezünk.

## **II. Valós idejű (real-time) reverz transzkripció-polimeráz lánreakció (RT-PCR)**

A gyermekek vékony-, illetve vastagbél nyálkahártyájából származó biopsziás minták egy részét a feldolgozásig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltam, majd a gyártó protokollja alapján RNeasy™ Mini Kit segítségével RNS-t izoláltam. A kinyert RNS mennyiségét és minőségét fotometrálassal határoztam meg.  $1\ \mu\text{g}$  RNS-t reverz transzkripcióval stabilabb komplementer cDNS-sé konvertáltam. SYBR Green alapú real time PCR technikával meghatároztam meg az iAP mRNS expressziós változásait. Viszonyítási alapul a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz mRNS expressziójának meghatározása szolgált.

## **III. Western blot**

A vizsgált biopsziás mintákat lizáló pufferben homogenizáltam, majd a felülúszó fehérje koncentrációját Dc Protein Assay felhasználásával, spektrofotometriás módszerrel határoztam meg. A 10%-os PreCast gél zsebeiben minden mintából azonos mennyiségű fehérjét futtattam. A molekulaméret alapján szétválasztott fehérjéket a poliakrilamid gélről nitrocellulóz membránra blottoltam. A membránokat 5% tejpor tartalmú oldatban blokkoltam, majd iAP-ra specifikus ellenanyaggal, ezt követően torma peroxidáz (HRPO) konjugált másodlagos ellenanyaggal inkubáltam. Viszonyítási alapul  $\beta$ -aktint használtam. Az immunoreaktív helyek kemilumineszcens szignálját ECL reagens segítségével detektáltam VersaDoc 5000MP képalkotó rendszer segítségével. Eredményeimet Quantity One szoftver segítségével értékeltem.

## **IV. Immunfluoreszcens festés iAP és TLR4 lokalizáció vizsgálatára**

A duodenumból, terminális ileumból és kolonból származó biopsziás mintákat kriomátrixba ágyaztam, majd 3-4  $\mu\text{m}$  vastagságú metszeteket festettem iAP-ra, valamint TLR4-re specifikus elsődleges, majd Alexa Fluor® 488 és Alexa Fluor® 568 jelölt másodlagos ellenanyaggal. A DNS-t Hoechst 33342-vel festettem. Végül a metszeteket Vectashield médiummal fedtem le. A szöveti festődést konfokális pásztázó lézer mikroszkóppal vizsgáltam.

## **V. Statisztika**

A real-time PCR-ek és Western blotok eredmények statisztikai analíziséhez Mann-Whitney U tesztet használtam (Statistica, StatSoft, OK, USA). Szignifikáns eltérésnek azt tekintettük, ahol  $p \leq 0,05$  volt.

## **EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK**

Az intesztinális flóra összetételének megváltozása, illetve a bélepitélium anatómiai lokalizációja meghatározó eleme a mukózális gyulladás és szöveti destrukció kialakulásának. A veleszületett immunitás elemei felismerik a jelenlévő baktériumokat, elősegítik a mukózális barrier képzését, valamint az antibakteriális védelmi válasz kialakulását. A helytelen immunválasz, valamint a mukózális barrier sérülése hozzájárul az IBD és a CD kialakulásához. Az IBD és CD patomechanizmusa, lokalizációja teljesen eltérő, de mindkettő kialakulásában alapvető fontosságú a mukózális homeosztázis felborulása és a nyálkahártya sérülése.

Előzetesen munkacsoportunk kimutatta, hogy a TLR4 expressziója fokozódik újonnan diagnosztizált IBD-s gyermekek gyulladt kolon és újonnan diagnosztizált CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájában a kontrollhoz képest.

Az LPS aktiválta TLR4 kapcsán figyelmet kapott egy új enzim, az intesztinális alkalikus foszfatáz, amely a mukózális védelemben fontos tényező. Ugyanis az iAP defoszforilálja az LPS-t, ezáltal egy inaktív, nem toxikus formát hozva létre. Ez a defoszforilálás lehetetlenné teszi az LPS és a TLR4 közötti interakció kialakulását és így a veleszületett immunválaszok aktiválódását.

Jelen tanulmányban az iAP protein és mRNS expresszióját, valamint az iAP és TLR4 lokalizációját vizsgáltam IBD-s gyermekek vastagbél és CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájában.

### **I. Az iAP expressziójának változása IBD-s gyermekek kolon nyálkahártyájában**

Eddig mindössze egyetlen humán tanulmány jelent meg, amely felnőtt IBD-s betegekben vizsgálta az iAP szerepét. Ebben a vizsgálatban bár nem mérték az iAP-fehérje mennyiségét, a kolonban csökkent LPS-defoszforiláló aktivitást találtak, amelyet az iAP aktivitás csökkenésével is magyaráztak. Tanulmányomban elsőként vizsgáltam a terápiát nem kapó, kezeletlen IBD-s gyermekekben az iAP enzimet.

Vizsgálatomban az iAP mRNS expresszió csökkenése nem mutatott szignifikáns különbséget az MC-s és UC-s gyermekek gyulladt kolon nyálkahártyájában a nem-gyulladt MC és kontrollok mintáihoz képest. Az iAP mRNS szintekre vonatkozó irodalom ellentmondásos: az iAP mRNS expressziója a gyulladt MC-s és UC-s területeken emelkedett a nem-gyulladt MC-s és kontroll mintákhoz képest, amely a mukózális sejtek magasabb iAP termelésére utalhat. Kutatási eredményeim részben átfedést mutatnak López-Posadas és

munkatársai eredményeivel, akik kimutatták, hogy a gyulladt szövetek által termelt reaktív oxigén gyökök az intesztinális epitelsejtek megnövekedett iAP aktivitását okozzák.

Ugyanakkor Tuin és mtsai kimutatták, hogy az iAP mRNS expresszió csökken MC-s betegek bélnyálkahártyájában a kontrollokhöz képest. Bár megjegyzendő, hogy ebben a tanulmányban a betegek több mint fele immunszuppresszív szereket (infiximab, metotrexát, kortikoszteroidok és thiopurin) kaptak a mintagyűjtés idején, amelyek nagymértékben befolyásolhatják az iAP mRNS szintézist. Egészséges felnőttekben az iAP mRNS expressziót magasabbnak találták az ileumban, mint a kolonban, de az iAP mRNS expresszió és LPS-defoszforiláló aktivitás szignifikánsan csökkent IBD-s felnőttek gyulladt bélszakaszán, a nem-gyulladt IBD-s és kontroll mintákhoz képest. Ebben a vizsgálatban nem határozták meg az iAP fehérjemennyiségét, valamint a kezeletlen és kezelt csoportokat egy betegcsoportként kezelték.

A tendenciájában emelkedő iAP mRNS expresszió ellenére az iAP fehérjeszintje csökkent a MC-s és UC-s gyermekek gyulladt kolon nyálkahártyájában a nem-gyulladt MC és kontrollok biopsziás mintáihoz képest. A csökkent iAP fehérje szint a megnövekedett mRNS expresszió jelenlétében arra utalhat, hogy a gyulladt bélmukózában az iAP szintézise poszttranszkripciósan gátlás alá kerül. A gyulladt bélben végbemenő csökkent proteinszintézis számos poszttranszkripció útvonalon keresztül valósulhat meg. A már említett, gyulladás során felszabaduló reaktív oxigéngyökök az ubikvitin-proteozóma útvonalak aktiválása révén a proteinszint csökkenéséhez fokozott degradációhoz vezetnek.

Terápiainív gyermekek kolon nyálkahártyáját vizsgálva csökkent iAP fehérjeszintet találtam, ezért az eddigieket összetéve azt gondolom, hogy a gyulladt nyálkahártya csökkent iAP szintje összefüggésben lehet a csökkent LPS detoxifikációval és következményesen a megnövekedett TLR4 aktivációval.

Több állatmodellben kimutatták az iAP bélgyulladásra gyakorolt jótékony hatását. A legismertebb bélgyulladásos állatmodellben a DSS indukálta a kolitiszben, mind makroszkóposan, mind mikroszkóposan a humán vastagbélgyulladásnak megfelelő elváltozásokat tapasztalunk. Ramasamay és munkatársai WT és iAP KO egerekben DSS indukálta bélgyulladást generált. Az iAP KO állatokban a bélgyulladás súlyosabbnak bizonyult, valamint az orálisan adott iAP tablettá mindkét vizsgált csoportban csökkentette a kolitisz tüneteit.

Az állatkísérletek alátámasztották az iAP tablettá kolitiszre gyakorolt jótékony hatását, amit egy humán tanulmány is igazolt. Vizsgálatainknak terápiás konzekvenciája is lehet, hiszen az

hosszútávú IBD kezelése nem megoldott. Az IBD jelenlegi kezelése alapvetően konvencionális terápiából áll, de súlyos terápiarezisztens esetekben erőteljesebb, biológiai szerekre van szükség. A mikroflóra egyensúlyának visszaállítására tett terápiás kísérletek erősen hozzájárulhatnak IBD-ben a nyálkahártya mielőbbi gyógyulásához.

## **II. Az iAP és TLR4 lokalizációja IBD-s gyermekek kolon nyálkahártyájában**

Előzetesen munkacsoportunk az IBD-s gyermekek gyulladt kolon nyálkahártyájában emelkedett TLR4 mRNS-expresszióját és proteinszintet mutatott ki. A TLR4 és az iAP lokalizációjának vizsgálatára immunfluoreszcens festést végeztem. Az iAP eloszlása mind a terminális ileumban, mind a kolonban az epiteliális felszínre lokalizálódott és a TLR4-gyel való kolokalizációja egyértelmű volt. A TLR4 és iAP komplexképzése megerősítheti a mukózális integritásban betöltött szerepüket. Az iAP csökkent szintje, valamint a magasabb TLR4 expresszió az iAP/TLR4 egyensúly eltolódását okozhatja, így a mukóza kevésbé lesz ellenálló a baktériális LPS-sel szemben, amely a bélhámsejt integritásának csökkenéséhez és a bélgyulladás fenntartásához is vezethet.

Az iAP aktivitásának vizsgálata alkalmas hisztológiai módszer lehet az MC és UC elkülönítésére is. A székletben megjelenő markereket gyakran vizsgálják a betegség aktivitásának, relapszus vagy remisszió, és a terápia hatékonyságának követésére. Az iAP aktivitás szignifikánsan alacsonyabb az aktív UC-s betegek székletében a kontrollcsoporthoz képest, ugyanez a paraméter MC-s és inaktív UC-sek esetében magasabb volt, de a kontrollokhoz képest jelentős csökkenést mutatott.

## **III. Az iAP expressziójának változása CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájában**

CD-ben a glutén és a hozzá kapcsolódó proteinek genetikailag fogékony egyéneknél krónikus bélgyulladásához és következményesen a mukózális barrierintegritás megbomlásához vezetnek. A TLR mintázatfelismerő receptorcsalád összekötő hidat képez a veleszületett és adaptív immunválaszok között. Előzetesen munkacsoportunk CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájában fokozott TLR4 mRNS expressziót és proteinszintet mutatott ki. Újnan diagnosztizált CD-s gyermekek perifériás vérében a TLR4 pozitív sejtek előfordulási gyakorisága hasonló volt. Ezek az adatok alátámasztják, hogy a veleszületett immunitás,



kiemelten a TLR4 alapvetően hozzájárulhat a CD patogeneziséhez. Az iAP LPS-t detoxifikáló aktivitása révén jelentős szerepet játszhat a TLR4-LPS komplex kialakulásának megakadályozásában, ezáltal a barrierintegritás fenntartásában.

Az iAP mRNS és fehérjeexpresszióját elsőként vizsgáltam újonnan diagnosztizált és gluténmentes diétát tartó cöliákiás gyermekek duodenumból származó biopsziás mintáiban. Az iAP mRNS expressziójában nem volt szignifikáns különbség az újonnan diagnosztizált, valamint GFD-t tartó CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájában, a kontrollhoz viszonyítva. A GFD-n tartott gyermekek iAP mRNS expressziója enyhén emelkedő tendenciát mutatott a kontrollhoz képest, melynek magyarázata lehet a vékonybél-nyálkahártya még nem teljes regenerációja.

Az iAP fehérjeszintek szignifikánsan csökkentek az újonnan diagnosztizált, kezeletlen CD-s betegekben a kontrollcsoportéhoz képest. Az iAP fehérje csökkenése összefüggésben lehet az iAP enzimaktivitás csökkenésével. Prasad és munkatársai kimutatták, hogy az iAP és egyéb kefeszegélyhez-kötött enzimek aktivitásának csökkenése korrelált CD-s gyermekek hisztológiai léziójának súlyosságával. Az egyik magyarázat lehet, hogy az iAP termelése függ az enterociták számától és az iAP enzim a bélhámsejtregeneráció indikátora is lehet. Eredményeim alapján feltételezhető, hogy nem csak az iAP enzimaktivitás, hanem az iAP proteinszint is összefüggésben lehet a CD bélnyálkahártyát érintő súlyosságával.

#### **IV. Az iAP és TLR4 lokalizációja CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájában**

Előzetesen munkacsoportunk kimutatta, hogy a TLR4 mRNS expresszió és proteinszintek növekedtek újonnan diagnosztizált CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájában. Emellett kimutattam CD-s és kontroll gyermekek duodenum nyálkahártyájában az iAP és TLR kolokalizációját. Az iAP kizárólag a duodenális epitél felszínére lokalizálódott az újonnan diagnosztizált, a GFD-t tartó CD-s, valamint a kontroll csoportban és a TLR4-gyel való kolokalizációja egyértelműnek bizonyult. Az iAP és TLR4 együttes lokalizációja felveti funkcionális kapcsolatukat is. Feltételezhető, hogy az iAP proteinszintek csökkenése és TLR4 proteinszintek emelkedése együttesen hozzájárulnak az intesztinális barrierintegritás felbomlásához CD-ben.

Számos tanulmány jelent meg CD-ben a gluténmentes étrend kiváltására egy alternatív, adjuváns terápiás lehetőséggel. CD-ben a gluténmentes étrend bevezetése és fenntartása rontja az életminőséget, valamint a normális étrendnél jóval költségesebb, ezért egy alacsony

kockázatú, gazdaságosabb és hatékony gyógymód elérése a cél. Az iAP monoterápiás alkalmazása feltehetően nem lenne elegendő a gluténmentes étrend kiváltására, de más újabb CD-ben alkalmazható terápiával kombinálva esetleg hozzájárulhat a mielőbbi mukózális regenerációhoz. Az iAP képes a mukózális barrierintegritás visszaállítására az LPS detoxifikáló aktivitása révén, megelőzve ezzel a TLR4 megnövekedett és kontrollálatlan aktiválódását.

Eredményeimet összegezve elmondható, hogy az iAP fehérjeszintje csökkent az MC-s és UC-s gyermekek gyulladt kolon nyálkahártyájában a nem-gyulladt MC és kontrollok mintáihoz képest. Az iAP fehérjeszint csökkent az újonnan diagnosztizált CD-s gyermekek duodenum biopsziás mintáiban a kontrollcsoporthoz és a gluténmentes étrendet tartó cöliákias gyermekekéhez képest. Az iAP mRNS expresszió nem változott szignifikánsan sem az IBD-s, sem a CD-s vizsgált csoportokban. Az iAP-TLR4 komplexképzése a duodenum, terminális ileum, valamint kolon epitéliumban is kimutatható volt.

Az alacsonyabb iAP szinthez csökkent LPS-detoxifikáló hatással bírhat, hozzájárulhat bélpermeabilitás megnövekedéséhez vezethet. Irodalmi adatok alapján az iAP tablettá hatásos lehet DSS-indukálta kolitiszes egerekben és felnőtt UC-s betegekben, ezáltal az exogén iAP enzim kiegészítő terápia lehet aktív IBD-s és újonnan diagnosztizált CD-s betegek számára, amennyiben kontrollált vizsgálatok megerősítik ezt a feltételezést.

## TÉZISEK

Értekezésem legfontosabb megállapításait az alábbi pontokban foglalom össze:

(1) Elsőként mutattam ki, hogy az iAP fehérje szint csökken mind MC-s, mind UC-s gyermekek gyulladt kolon nyálkahártyájában a nem gyulladt területről származó MC-s és kontroll bélbiopsziás mintákhoz képest. Az iAP mRNS expressziója nem mutatott szignifikáns eltérést a vizsgált csoportokban. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az iAP jelentős szerepet tölt be a mukozális barrierintegritás fenntartásában és a fehérjeszint csökkenése hozzájárulhat az IBD kialakulásához is.

(2) Megállapítottam, hogy az iAP kizárólag az enterociták felszínére lokalizálódott, továbbá az iAP és a TLR4 együttes jelenléte pontszerű, erőteljes jelet adott; a vizsgált csoportokban festődési különbség nem volt. Ez a megfigyelés összhangban van munkacsoportunk korábbi megfigyeléseivel, hogy a TLR4 expressziója fokozott újonnan diagnosztizált IBD-s betegek bélnyálkahártyájában és perifériás vérében egyaránt. Az iAP TLR4-gyel való komplexképzése alátámasztja az iAP veleszületett immunválaszok beindításában betöltött szerepét, valamint az LPS-t detoxifikáló hatását.

(3) Elsőként mutattam ki az iAP proteinszintek csökkenését újonnan diagnosztizált CD-s gyermekekben, gluténmentes diétát tartó CD-s gyermekek és kontrollcsoporthoz képest. Az iAP mRNS expressziója nem mutatott szignifikáns eltérést a vizsgált csoportokban. Előzetesen az iAP enzimaktivitását vizsgálták CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájában és az iAP enzimaktivitás csökkenése összefüggést mutatott a szövettani lézió súlyosságával. Ez a megfigyelés és eredményeink arra utalnak, hogy a csökkent iAP fehérjeszinteknek szerepe lehet a CD patomechanizmusában.

(4) Kimutattam az iAP és a TLR4 kolokalizációját a duodenum enterocitáinak felszínén és a 3 vizsgált csoport festődési különbséget nem mutatott. Munkacsoportunk előzetesen kimutatta, hogy az újonnan diagnosztizált CD-s gyermekek perifériás vérében a TLR4 pozitív sejtek prevalenciája megemelkedik, ugyanakkor GFD-t tartó gyermekekben is magas marad a TLR4 prevalencia a kontrollhoz képest. A duodenum biopsziás mintákban szintén emelkedett volt a TLR4 szint az újonnan diagnosztizált és glutén-mentes diétát tartó CD-s csoportban. Az iAP jelenléte hozzájárulhat az LPS detoxifikálásához, ezáltal megakadályozva a TLR4-LPS komplex kialakulását.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni mindenk előtt Dr. Tulassay Tivadar Professzor Úrnak, a kutatólaboratórium vezetőjének, aki biztosította számomra a kutatómunka elvégzéséhez szükséges szellemi műhelyt.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Veres Gábornak, hogy pályámon elindított. Hálás vagyok, hogy munkámat, szakmai fejlődésemet mindvégig baráti, tanácsokkal látta el, irányt mutatott mind a gyermekgyógyászati, mind a kutató gondolkodás elsajátítására.

Köszönöm Dr. Vannay Ádámnak, a molekuláris biológia kutatólaboratórium vezetőjének, hogy példaként szolgált számomra kutatói magatartásával és gondolkodásmódjával, és gyakorlatilag a munka valamennyi szakaszában önzetlenül segített.

Hálás vagyok Dr. Arató András Professzor Úrnak, hogy szellemi és anyagi támogatással hozzájárult a vizsgálatok felépítéséhez és kivitelezéséhez, valamint észrevételeivel, tanácsaival segített a kapott eredmények értelmezésében.

Köszönöm Dr. Vásárhelyi Barnának a kapott eredmények közlésében és a doktori értekezésem létrehozásában nyújtott segítségét, biztatását.

Köszönöm Dr. Szabó Dolóresznek, Dr. Bánki Nóra Fanninak, Dr. Sziksz Ernának, Dr. Balicza-Himer Leonóranak, Dr. Cseh Áronnak és Dr. Prókai Ágnesnek, hogy a baráti légkör mellett fáradtságot nem ismerve segítettek a publikálásban, illetve a kísérletek elvégzésében.

Köszönettel tartozom Bernáth Máriának munkám technikai kivitelezésében nyújtott segítségéért, valamint emberi támogatásáért. Köszönöm a labor vezető kutatóinak és PhD-társaimnak, hogy nemcsak szakmai, hanem baráti légkört teremtettek és biztatásukkal nagymértékben hozzájárultak e dolgozat megszületéséhez.

Köszönöm Dr. Dezsőfi Antalnak, Dr. Müller Katalin Eszternek, Dr. Gyórfy Hajnalkának, valamint a Semmelweis Egyetem I. Sz. Gyermekklinika gasztroenterológiai osztály és ambulancia munkatársainak a minták gyűjtésében és szövettani kiértékelésében nyújtott segítségét.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni Családom, legfőképpen Édesanyám szeretetét, rendületlen támogatását, amely nélkül e munka sem jöhetett volna létre.

## SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### A doktori értekezés témájához kapcsolódó közlemények

1. **Molnár K**, Vannay A, Szebeni B, Bánki NF, Sziksz E, Cseh A, Gyórfy H, Lakatos PL, Papp M, Arato A, Veres G. : Intestinal Alkaline Phosphatase in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2012; 18: 3254-3259 (IF:2.24)
2. **Molnár K**, Vannay A, Sziksz E, Bánki NF, Gyórfy H, Arato A, Dezsőfi A, Veres G.: Decreased mucosal expression of intestinal alkaline phosphatase in children with coeliac disease. *Virchows Arch.* 2012; 460:157-61. (IF:2.33)
3. **Molnár K**, Vannay Á, Szebeni B, Arató A, Gyórfy H, Sziksz E, Nagy Szakál D, Cseh Á, Bánki NF, Tulassay T, Dezsőfi A, Veres G: Intestinalis alkalikus phosphatase expressziója IBD-s gyermekek vastagbél nyálkahártyájában. *Gyermekgyógyászat*, 2011; 62: 125-29. (IF : 0,00)

### A doktori értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények

4. Szakál DN, Gyórfy H, Arató A, Cseh Á, **Molnár K**, Papp M, Dezsőfi A, Veres G.: Mucosal expression of claudins 2, 3 and 4 in proximal and distal part of duodenum in children with coeliac disease. *Virchows Arch.* 2010; 456:245-50. (IF:2.33)
5. Vannay Á, Sziksz E, Prókai A, Veres G, **Molnár K**, Szakál DN, Ónody A, Korponay-Szabó IR, Szabó A, Tulassay T, Arató A, Szebeni B.: Increased expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in coeliac disease. *Pediatr Res.* 2010; 68:118-22. (IF:2.60)
6. Cseh Á , Vásárhelyi B, Szalay B, **Molnár K**, Nagy-Szakál D, Treszl A, Vannay Á, Arató A, Tulassay T, Veres G.: Immune Phenotype of Children with Newly Diagnosed and Gluten-Free Diet-Treated Celiac Disease., *Dig Dis Sci.* 2011;56:792-8. (IF:1.838)

7. Cseh Á, **Molnár K**, Pintér P, Szalay B, Szebeni B, Treszl A, Arató A, Vásárhelyi B, Veres G.: Regulatory T Cells and T Helper Subsets in Breast-fed Infants With Hematochezia Caused by Allergic Colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010; 51:675-7. (IF:2.183)
8. Cseh Á, Vasarhelyi B, **Molnár K**, Szalay B, Svec P, Treszl A, Dezsőfi A, Lakatos PL, Arató A, Tulassay T, Veres G.: Immune phenotype in children with therapy-naïve remitted and relapsed Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2010; 16:6001-9. (IF:2.24)
9. Kovács M, Müller KE, Arató A, Lakatos PL, Kovács JB, Várkonyi A, Sólyom E, Polgár M, Nemes E, Guthy I, Tokodi I, Tóth G, Horváth A, Tárnok A, Tomsits E, Csozánzsky N, Balogh M, Vass N, Bódi P, Dezsőfi A, Gárdos L, Micskey E, Papp M, Szűcs D, Cseh Á, **Molnár K**, Szabó D, Veres G; on behalf of the Hungarian IBD Registry Group (HUPIR). Diagnostic yield of upper endoscopy in paediatric patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. Subanalysis of the HUPIR registry. *J Crohns Colitis.* 2012;6:86-94. (IF:2.628)
10. Kovacs M, Lakatos PL, Papp M, Jacobsen S, Nemes E, Polgar M, Solyom E, Bodi P, Horvath A, Muller KE, **Molnar K**, Szabo D, Cseh A, Dezsofi A, Arato A, Veres G. Pancreatic autoantibodies and autoantibodies against goblet cells in pediatric patients with inflammatory bowel disease (IBD). *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012 Mar 29. [megjelenés alatt] (IF:2.183)
11. Kovacs M, Papp M, Lakatos PL, Jacobsen S, Nemes E, Polgar M, Solyom E, Bodi P, Horvath A, **Molnar K**, Szabo D, Cseh A, Muller KE, Dezsofi A, Arato A, Veres G. Low mannose-binding lectin (MBL) is associated with paediatric inflammatory bowel diseases and ileal involvement in patients with Crohn disease. *J Crohns Colitis.* 2012 Apr 13. [megjelenés alatt] (IF:2.628)

12. **Molnár K**, Papp M, Szőnyi L, Lakatos PL, Tornai I, Földi I, Arató A, Dezsőfi A, Veres G.: Haptoglobin polymorhismus primer sclerotisalo cholangitisben szenvedő gyermekekben és felnőttekben. *Gyermekgyógyászat*, 2008;59:277-281. (IF : 0,00)
13. Pintér V, Gyórfy H, Arató A, Dezsőfi A, **Molnár K**, Veres G.: Allergiás és eosinophil colitises gyermekek laboratóriumi és klinikai jellemzői. *Gyermekgyógyászat*, 2008;59:291-295. (IF : 0,00)
14. Veres G, Putz R, Szabó D, **Molnár K**, Bodánszky H, Dezsőfi A, Arató A.: Adalimumab kezelés infliximab-rezisztens Crohn-beteg gyermekekben. *Orv Hetil.* 2009;150: 1858-60. (IF : 0,00)
15. **Molnár K.**: Eozinofil enteropathia vagy IBD? A hematochesia okai kisdedkorában. *Gyermekgyógyászati Továbbképző Szemle*, 2010; 15: 19-21. (IF : 0,00)