

MikroRNS-ek intesztinális expressziójának összehasonlító elemzése a gyermekkori gyulladásos bélbetegségben

Doktori értekezés

Dr. Béres Nóra Judit

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Veres Gábor, MTA doktora, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Miklós Zsuzsanna, PhD, adjunktus

Dr. Igaz Iván, PhD, főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Prohászka Zoltán, MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Gece Krisztina, PhD, egyetemi tanársegéd

Dr. Koncz Zsuzsa, PhD, klinikai orvos

Budapest

2017

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés	7
2.1. Gyulladásos bélbetegség klinikai jellegzetességei	9
2.1.1. <i>A gyulladásos bélbetegségek epidemiológiája</i>	9
2.1.2. <i>A gyulladásos bélbetegség klinikai megjelenése</i>	10
2.1.3. <i>Aktivitási indexek</i>	12
2.1.4. <i>Diagnosztika</i>	13
2.1.5. <i>A gyulladásos bélbetegség kezelése</i>	15
2.1.6. <i>A gyulladásos bélbetegség etiopatogenezise</i>	17
2.2. Epigenetika és mikroRNS-ek	26
2.2.1. <i>Epigenetika</i>	26
2.2.2. <i>MikroRNS-ek</i>	27
2.2.3. <i>MikroRNS-ek a gyulladásos bélbetegségekben</i>	37
2.2.4. <i>MiR-146a, -155 és -122 szerepe IBD-ben</i>	44
2.2.5. <i>A miR-146a, -155 és -122 szerepe a TNF-α jelátviteli útvonalban</i>	45
2.2.4. <i>MikroRNS-ek terápiás vonatkozásai</i>	47
2.3. Szekvenálás története, fejlődése	48
3. Célkitűzések	50
4. Módszerek	51
4.1. Betegek	51
4.2. Colon epitél sejtek TNF- α kezelése	54
4.3. RNS izoláció	54
4.4. Új-generációs szekvenálás	54
4.5. Reverz transzkripció és valós idejű polimeráz láncreakció	55
4.6. MikroRNS célgének keresése in silico, target predikció	58
4.7. Statisztika	59
5. Eredmények	60

5.1. Crohn-beteg gyermekek mikroRNS profilja új-generációs szekvenálással	60
5.2. Új-generációs szekvenálás validálása kvantitatív polimeráz láncreakcióval	60
5.3. Makroszkóposan gyulladt CD-s régiók mikroRNS mintázata RT-PCR-el	61
5.4. Makroszkóposan ép CD-s régiók mikroRNS mintázata RT-PCR-el	62
5.5. Makroszkóposan kóros UC-s régiók mikroRNS mintázata RT-PCR-el	62
5.6. A validált mikroRNS-ek célgénjei	62
5.8. A mikroRNS-ek biológiai folyamatokban betöltött szerepének vizsgálata	68
5.9. A miR-146a expressziója CD-s, UC-s és kontroll gyermekek biopsziás mintáiban	71
5.10. A miR-155 expressziója CD-s, UC-s és kontroll gyermekek biopsziás mintáiban	72
5.11. A miR-122 expressziója CD-s, UC-s és kontroll gyermekek biopsziás mintáiban	73
5.12. A miR-146a, -155 és -122 szabályozási rendszere	74
5.13. A TNF- α expresszió CD-s, UC-s és kontroll gyermekek vastagbél biopsziás mintáiban	75
5.14. A TNF- α hatása a miR-146a, -155 és -122 expresszióra HT-29 epitél sejteken	75
6. Megbeszélés	76
7. Következtetések	85
8. Összefoglalás	86
9. Summary	87
10. Irodalomjegyzék	88
11. Saját publikációk jegyzéke	115
12. Köszönetnyilvánítás	119
13. Ábrajegyzék	120
14. Táblázatjegyzék	121

1. Rövidítések jegyzéke

5-ASA	5-aminoszalicilsav
6-TGN	6-tioguanin
ABCB1	ATP binding cassette subfamily B
ABCG2	ATP binding cassette subfamily G
ALP	Alkalikus foszfatáz
anti-CBir1	Bakteriális flagellinek elleni antitest
anti-I2	Pseudomonas fluorescens bakteriális DNS fragmentje elleni antitest
anti-OmpC	E. coli külső membránján található porin C transzporter fehérje elleni antitest
AP-1	Aktivátor protein 1
APC	Antigén prezentáló sejtek
ASCA	Anti-Saccharomyces cerevisiae elleni antitest
ATG16L1	Autofágiához kötött 16-1 gén
BMI	Testtömeg-index
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CACO-2	Kaukázusi colon adenocarcinoma sejtvonala
CARD	Caspase recruitment domain-containing protein
CCL2	Chemokine C-C motif ligand 2
CD	Crohn's disease, Crohn-betegség
CFU	Kolóniaformáló egység
cIAPS	Apoptózis celluláris inhibitor
CREB	cAMP responsive element binding
CRP	C-reaktív protein
CXCL8	Chemokine C-X-C motif ligand 8
CXCR4	C-X-C chemokine receptor 4
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DNS	Dezoxiribonukleinsav
ECCO	European Crohn's Colitis Organization
EEN	Exkluzív enterális táplálás
EGR2	Early growth response 2
EIM	Extraintesztinális manifesztáció
ER	Endoplazmás retikulum
ESPGHAN	European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition
FADD	Fas-hoz kötődő halál ligand
FF	Frissen fagyasztott
FFPE	Formalinban-fixált, paraffinba ágyazott
FOXP3	Forkhead box P3
GAB	Kehelysejt elleni antitest
GALT	Bél-rendszer asszociált immunszövetek
GF	Növekedési faktor
GGT	Gamma-glutamil transzferáz
GO	Gene Ontology, gén ontológia
GWAS	Genome-Wide Association Studies

HIF1A	Hipoxia indukált faktor 1- α
HLA	Humán leukocita antigén
HS-CRP	High sensitivity CRP
HSP	Hősokk fehérje
HUPIR	Hungarian Pediatric Inflammatory Bowel Disease Registry
IBD	Inflammatory bowel disease, gyulladásoos bélbetegség
ICAM-1	Intracelulláris adhéziós molekula 1
IDA	Inferred from Direct Assay
IEP	Inferred from Expression Pattern
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	NF- κ B inhibítor kináz
IL	Interleukin
IMP	Inferred from Mutant Phenotype
iNOS	Indukálható nitrogén-monoxid-szintáz
IRAK-1	IL-1 receptor asszociált kináz 1
IRGM	Immunitáshoz kötött GTPáz M gén
J	Youden's J index
JAK-2	Janus-kináz-2
JNK	C-Jun N-terminális kináz
LPS	Lipopoliszacharid
MAPK	Mitogén aktivált protein kináz
MaRIA	Magnetic Resonance Index of Activity
MDP	Muramil-dipeptid
MHC	Major hisztokompatibilitási komplex
MIP-2 α	Makrofág inhibítor peptid
miR	MikroRNS
MMP	Metil-merkaptopurin
MR	Mágneses rezonancia
mRNS	MessengerRNS
Myd88	Myeloid differentiation primary response 88 protein
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NGS	Next-generation sequencing, új generációs szekvenálás
NIK	NF- κ B-indukáló kináz
NO	Nitrogén-monoxid
NOD	Nukleotid kötő oligomerizációs domén
NOS2	Nitrit oxid szintáz 2
NPV	Negatív prediktív érték
NSAID	Nem szteroid gyulladáscsökkentők
PAB	Pancreas elleni antitest
PAMP	Patogének felszínén levő mintázat
p-ANCA	Atípusos perinukleáris anti-neutrofil citoplazmatikus antitest
PCDAI	Pediatric Crohn's Disease Activity Index
PHLPP2	PH Domain And Leucine Rich Repeat Protein Phosphatase 2
PI3K	Foszfoinozítid 3-kináz
piRNS	Piwi-interacting RNS
PLZF	Promyelotic leukaemia zinc finger transzkripciós faktor
PPV	Pozitív prediktív érték

PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
PUCA1	Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index
rasiRNS	Repeat-associated small interfering RNS
REL	Proto-oncogene c-Rel
RHOU	Ras Homolog Family Member U
RIP	Receptor-kölcsönhatás protein
RNS	Ribonukleinsav
ROC	Receiver operating characteristic
rRNS	Riboszómális RNS
RT-PCR	Valós idejű polimeráz láncreakció
SELE	E-szelektin
SEM	Standard Error of the Mean
SHH	Sonic hedgehog
SHIP1	SH2 (Src homológ 2)-t tartalmazó inozitol foszfatáz-1
siRNS	Kis interferáló RNS
SMAD	Mothers against decapentaplegic homolog
snoRNS	Kis magvacska RNS
SNP	Egy pontos nukleotid polimorfizmus
SOCS-1	Citokin szignaling szupresszor-1
STAT3	Szignál transzducer és aktivátor transzkripció faktor
TAB2	TAK1 kötő fehérje2
TAK1	Transzformáló növekedési faktor β aktivált kináz-1
Tfh	Folikuláris T helper sejtek
Th	T helper sejtek
THP-1	Human acute monocytic leukemia cell line
TGF	Transzformáló növekedési faktor
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	Tumor nekrozis faktor- α
TPMT	Tiopurin metiltranszferáz
TRADD	TNF halál ligand
TRAF2	TNF receptor asszociált faktor 2
TRAF6	TNF receptor-asszociált faktor 6
Treg	Regulátor T-sejt
tRNS	Transzfer RNS
TVK	Teljes vaskötő kapacitás
UC	Ulcerative colitis

2. Bevezetés

A gyulladós bélbetegségek (inflammatory bowel disease, IBD) a gasztrointesztinális traktus remissziókkal és relapszusokkal jellemezhető krónikus gyulladással járó megbetegedései. Két fő formája a Crohn-betegség (CD) és a colitis ulcerosa (UC), melyek mellett megkülönböztetjük a két csoportba egyértelműen nem besorolható eseteket (IBD-unclassified, IBD-U) [1, 2]. Az IBD multifaktoriális kórkép, kialakulásában genetikai, epigenetikai, immunológiai és környezeti tényezők egyaránt szerepet játszanak, azonban pontos oka máig sem tisztázott. A gyulladós bélbetegségek jelentősége évről évre növekvő incidenciája és prevalenciája miatt kiemelkedő [3]. Egy nemzetközi publikációkat feldolgozó közlemény alapján, ahol több mint 260 cikket dolgoztak fel az 1900-as évektől a 20. század végéig, a CD és UC incidenciája és prevalenciája a cikkek 75 és 60%-ban szignifikáns növekedést mutatott. Ezen cikkek alapján az átlagos incidencia növekedés CD esetében 1,2%-ról 23,3%, míg UC esetén 2,4%-ról 18,1% világszerte [4]. Nehezen hihető, hogy ilyen mértékű növekedést – ilyen rövid idő alatt – genetikai okok magyaráznának. Azonban lehetséges, hogy a környezeti (leginkább táplálkozási) tényezők éppen az epigenetika útján okozzák a kórkép gyakoribbá válását. A közelmúlt vizsgálatai egyértelművé tették, hogy ezen epigenetikai tényezőknek (mikroRNS, metiláció, hiszton modifikáció) kiterjedt vizsgálata kulcsfontosságú lehet.

Az IBD 15-30%-ban gyermekkorban kezdődik. A korábbi betegség indulás hosszabb betegség lefolyást jelent és így várhatóan több a komplikáció [5-7]. A felnőtt és gyermekkori IBD mind aktivitásában, mind lokalizációjában számos különbséget mutat. A gyermekkori IBD-t súlyosabb, kiterjedtebb bélérintettség jellemzi. A krónikus gyulladós folyamat és így a következményes malnutríció miatt nem tud kialakulni a pubertás végéig a csúcs-csonttömeg, mely gyermekek növekedés elmaradásához, a rosszabb csontsűrűséghez, valamint a késői pubertáshoz vezethet. Ennek ismeretében kiemelt jelentőségű a korai kezdetű, gyermekkori IBD vizsgálata, a kialakulást elősegítő tényezők azonosítása [3, 8, 9].

Az IBD patomechanizmusát kutató vizsgálatok száma évről évre nő, ami megfelelő alapot biztosít az IBD-re specifikus diagnosztikus és prognosztikai markerek kidolgozásában, új terápiás célpontok azonosításában. A tanulmányok jelentős része

farmakogenetikai vizsgálatokkal foglalkozik, melyek kulcsfontosságúak az egyénre szabott terápia kiválasztásnak szempontjából [10]. Az utóbbi években a rohamosan fejlődő metodikák segítségével egyre több vizsgálat igazolta az epigenetikai szabályozó tényezők jelentőségét, ezen belül a mikroRNS-ek (miR) szerepét [11, 12]. A rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján célul tűztem ki a gyermekkori IBD-re – különös tekintettel a CD-re – jellemező mikroRNS mintázat feltérképezését.

2.1. Gyulladásos bélbetegség klinikai jellegzetességei

2.1.1. A gyulladásos bélbetegségek epidemiológiája

Az IBD kiemelt jelentőségét felnőtt- és gyermekkorban egyaránt növekvő incidenciájának és prevalenciájának köszönheti. Bimodális megjelenésű kórkép, a legtöbb beteget a második-harmadik, vagy az ötödik-hatodik évtizedében diagnosztizálják. Korábban a megbetegedés elsősorban a fejlett országokra volt jellemző, azonban az elmúlt évtizedekben a fejlődő országokban is növekvő gyakoriságot mutatott [13, 14]. Az European Crohn's Colitis Organization (ECCO) adatai alapján Európa 22 országában 2010-ben a CD incidenciája 3-6,5/100 000 fő, az UC-é 4,1-10,8/ 100 000 fő volt [14].

2007. január 1-je óta működik hazánkban a Hungarian Pediatric Inflammatory Bowel Disease Registry (HUPIR), egy az egész országra kiterjedő prospektív gyermekkori IBD regiszter, melybe minden 18 év alatti frissen diagnosztizált IBD-s gyermek bekerül. A HUPIR adatai alapján az IBD átlagos incidenciája hazánkban 7,8/100 000 gyermek, mely a nemzetközi adatokkal összevetve a gyakoribb előfordulási országok közé sorolja Magyarországot. A regiszterből kiderül, hogy hazánkban a gyermekkori CD gyakorisága (4,9/100 000) kétszerese az UC incidenciájának (2,3/100 000), valamint hogy míg CD-ben a fiúk dominanciája jellemző, az UC a lányok körében gyakoribb [3, 15].

2.1.2. A gyulladós bélbetegség klinikai megjelenése

Klinikai kép CD-ben

A CD klinikai képét remissziók és relapszusok váltakozása jellemzi. A tünetek, szövődmények megjelenése függ a betegség lokalizációjától, időtartamától, valamint az extraintesztinális manifesztációktól (EIM). Felnőttkori CD-ben a leggyakoribb az ileocoecalis megjelenés, a gyermekkori adatok azonban némileg ellentmondásosak, mert a lokalizáció döntően életkorfüggő. A különböző regiszterek (HUPIR, EUROKIDS) adatai alapján gyermekek esetén is az ileocoecalis megjelenés a legjellemzőbb, de ha életkor szerint stratifikálunk, akkor 5 éves kor alatt gyakoribb az izolált colitis. Fontos megemlíteni, hogy gyermekkorban a HUPIR adatai szerint a betegek közel 30%-ának van felső gasztrointesztinális érintettsége is, így az esetek 9%-ban segíti a diagnózist a felső endoszkópia [16, 17].

A gyermekkori CD tünetei nem specifikusak, a betegség leggyakrabban a klasszikus tünetek kombinációjával, hasfájással, hasmenéssel és fogyással kezdődik, a klasszikus triász azonban ritkán jelentkezik egyértelműen. A betegek 70%-ánál megjelenik a krónikus hasfájás [17], amely a vastagbél érintettségének megfelelően lehet köldök körüli, jobb alhasi, vagy diffúz alhasi. A jobb alhasi fájdalom appendicitis és lymphadenitis mesenterialis klinikai képét utánozhatja. A betegség bevezető tünete lehet a súlyvesztés (58%), a véres-nyákos széklet (22%-56%) és a láz is. Jellemző, visszatérő tünet a fisztulák kialakulása, mely a betegek 30%-át is érintheti. Kiemelt jelentőségűek a perianális fisztulák (20%), a bőrfüggelékek („skin tag”) és a visszatérő perianális tályogok (8%) előfordulása, melyek megoldása gyakran csak műtéti beavatkozással lehetséges [17-19]. Az életminőséget erősen befolyásoló EIM-ek megjelenése a betegek 20-40%-ban jellemző [3, 20, 21].

A CD progressziója során számos szövődmény jelenhet meg. A krónikus gyulladás következtében szűkületek, sipolyok-tályogok alakulhatnak ki, valamint fennáll a malignus transzformáció lehetősége is. A szövődmények miatt a betegek több, mint 70%-a esik át műtéti beavatkozáson élete során, aminek kiemelt jelentősége van a korai, gyermekkori induló CD esetén [22].

Klinikai kép UC-ban

Az UC klinikai képét a CD-hez hasonlóan remissziók és relapszusok váltakozása jellemzi, azonban a betegség folyamatos aktivitást is mutathat. A markánsabb tüneteknek köszönhetően az UC általában a CD-nél hamarabb kerül felismerésre. Az UC-s gyermekek kezdeti panasza leggyakrabban a véres széklet (84%) és a hasmenés (74%), amit rendszerint hasi fájdalom kísér (62%). Tenezmus és éjszakai székletürítés is megjelenik, azonban a súlyvesztés (31%) ritkább, mint CD esetében [17].

Felnőttkori UC-ban elsősorban a bal colonfél, a végbél disztális része és a rectum érintett [23], míg gyerekkorban gyakrabban fordul elő kiterjedt colitis, sőt akár a terminális ileum is érintett lehet („backwash ileitis”), ami megnehezítheti a diagnózis felállítását [17, 24]. Az UC-s betegek gondozásakor a legsúlyosabb szövődmény az akut, súlyos colitis, amely gyakran indokoltá teszi a colectomia elvégzését [17].

Ismert, hogy UC-ban emelkedett a colorectalis carcinoma kialakulásának rizikója. A veszprémi adatok szerint 10 év betegségfennállás után a kockázat 0,6%, 20 év után 5,4%, 32 év után 12,6%, ami jelzi a korai kezdetű UC jelentőségét. Ugyanezen adatok alapján 5 év betegség fennállás után a betegek több mint 20%-ánál végeznek műtéti beavatkozást [23, 25]. Ugyanakkor egy másik, gyermekkori UC-ban készült tanulmány szerint a betegség 10 éves fennállása esetén a colectomia az esetek 16%-ában szükséges [22]. Fontos tudni a legmagasabb gyermekkori arányszámot is, ahol Limbergen adatai alapján 10 éves UC fennállásánál a colectomia aránya 41%-v volt [26].

IBD fenotípus szerinti felosztása

A CD és UC fenotípus szerinti besorolása fontos a terápia és a prognózis megítélése szempontjából. A párizsi klasszifikáció alapján CD-ben a besorolás alapját a beteg életkora (A, age), a betegség lokalizációja (L, location) és viselkedése (B, behavior) határozza meg. A legújabb párizsi klasszifikáció alapján a 17 év alatti korosztályt 10 év alatti (A1a) és 10-17 év közötti (A1b) alcsoportra osztották. Lokalizációban megkülönböztetünk terminális ileum (L1), colon (L2), illetve ileocolonicus (L3) érintettséget, továbbá elkülöníthetővé vált a Treitz szalagtól proximális és disztális kiterjedés is (L4a, L4b, L4ab). A viselkedés besorolásában a strikturáló (B2) és penetráló (B3) forma együttes megjelenésének jelölésére a B2B3 jelölést hozták létre. A perianalis érintettséget „p” betűvel jelöljük. A növekedési elmaradást pedig G1-el jelzi a felosztás.

UC-ban a súlyosság és a kiterjedés a meghatározó. Enyhébb esetben a gyulladás a rectumra lokalizálódik (E1), súlyosabb formát jelent a bal flexuráig terjedő gyulladás (E2), a jobb flexuráig terjedő kórkép: extenzív colitis (E3) és a kiterjedt pancolitis (E4). Súlyosság szempontjából 2 csoportra oszthatjuk az UC-s betegeket: nem volt (S0), illetve elfordul már súlyos colitis (S1, PUCAI>65) [3, 19, 27].

2.1.3. Aktivitási indexek

IBD-re jellemző, hogy a klinikai kép nagy különbséget mutat mind az egyes betegek között, mind egyénenként a betegség lefolyása során. A tünetek sokrétűsége miatt a beteg állapotának megítélésében sokféle szempontot kell figyelembe venni. Ennek elősegítésére születtek a különböző indexek (radiológiai, endoszkópos, aktivitási indexek). 1991-ben alkották meg a gyermekkori CD-ben használatos Pediatric Crohn's Disease Activity Index-et (PCDAI) [28]. Az utóbbi években a súlyozott PCDAI-t (wPCDAI) egyre több helyen használják a betegség aktivitásának felmérésére, követésére [29].

UC-ban több aktivitási index is ismert, melyek közül hazánkban az ECCO és ESPGHAN által elfogadott indexet alkalmazzák. A Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI) figyelembe veszi a hasi fájdalmat, a széklet minőségét, mennyiségét,

esetleges vértartalmát, az éjszakai székelés előfordulását, valamint az általános állapotot (fizikai aktivitás). A PUCAI a PCDAI-hoz képest jobban korrelál a bél makroszkópos képével [30].

2.1.4. Diagnosztika

A gyermekkori IBD pontos diagnózisa, a szubtypusok meghatározása sok esetben kihívást jelenthet. A legújabb kutatások közelebb visznek a kórkép patomechanizmusának pontosabb megértéséhez, így egyre több szerológiai- és széklet biomarker kerül előtérbe. A legújabb endoszkópos, képalkotó technikák is nagymértékben segíthetik a diagnózis felállítását. 2013-ban jelent meg az ESPGHAN (European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) munkacsoport vezetésével a portói kritériumok átdolgozott változata, ami hozzájárulhat a pontosabb diagnózis felállításához. Az új kritérium rendszer a párizsi klasszifikáció és a korábbi portói kritériumok alapján készült el.

A portói kritériumok alapján, amennyiben egy gyermeknél felmerül az IBD lehetősége, a laboratóriumi vizsgálatok mellett javasolt az ileocolonoscopia és az oesophagogastroduodenoscopia biopsziás mintavétellel, valamint a vékonybél képalkotó vizsgálata (vékonybél kapszula, mágneses rezonancia: MR vizsgálat). A laboratóriumi (vér, széklet) vizsgálatoknak ki kell zárnia egyéb kórképek lehetőségét (infekció, allergiás eredet, primer immundeficienciák). Azokban az esetekben, amikor az endoszkópián látott kép és a szövettan alapján egyértelmű az UC diagnózisa, a vékonybél képalkotó vizsgálata elhagyható [19].

Az endoszkópia szerepe az IBD diagnosztikájában

Az IBD diagnózisában „gold standard” az alsó- és felsőendoszkópia. A megbetegedésnek számos típusos és atípusos megjelenése lehetséges. CD-re jellemző, hogy a tápcsatorna bármely részét érintheti, ezért fontos a teljes gasztrointesztinális traktus endoszkópos és képalkotó vizsgálata. A nehezen meghatározható esetekben, IBD-U-ban, ahol az ileális-jejunális érintettség megléte hozzájárulhat a diagnózis felállításához, kiemelt jelentőségű a képalkotó vizsgálat. CD-re jellemző az ép és a

kóros nyálkahártya szakaszok éles határú váltakozása, szegmentális megjelenése, a kezdetben aphtosus, majd a bélfal minden rétegére kiterjedő mély, hosszanti, serpiginosus fekélyek, és az utcakőrajzolat. A pseudopolipok megjelenése már krónikus gyulladással utal. A CD makroszkópos képe rosszul korrelál a klinikai képpel [19, 31].

UC-ra jellemző a bélnyálkahártya felületen, folytonos és a béllumenben körkörös gyulladása, mely a rectumot és a tőle proximális szakaszokat érinti. Atípusos esetben megjelenhet „backwash ileitis”, ami a coecumból folyamatosan áttérjedő, a terminalis ileum területén látott aktív makroszkópos, vagy mikroszkópos gyulladás. „Backwash ileitis” a pancolitis betegeknél 20%-ban megfigyelhető és rosszabb prognózissal jár. Egy másik atípusos megjelenés a „rectal sparing”, melynél a rectum megkímélt (makroszkóposan vagy mikroszkóposan), illetve a „cecal patch”, amelynek a cecum foltos gyulladása látható. Fontos ismeret, hogy a „rectal sparing” sclerotizáló cholangitisben gyakoribb, ami a fentiek alapján hajlamosít colonicarcinomára, vagyis jelenléte rossz prognosztikai elem. A gyulladás kiterjedése és súlyossága UC-ban általában összhangban van a klinikai megjelenéssel [19, 31].

Az endoszkópia az IBD szövődésének (szűkületek, sipolyok) felismerésében is fontos, azonban toxikus megacolon esetén a vizsgálat a perforáció veszélye miatt ellenjavallt. Masszív vérzés esetén az endoszkópia feladata az érintett szakasz meghatározása és a vérzéscsillapítás is. Szűkület esetén ballonos tágítás jöhet szóba.

A 2000-es évek óta lehetőség van a vékonybél kapszulás vizsgálatra. Ez a módszer segíthet a CD igazolásában, ha az alsó-, felsőendoszkópia negatív, de klinikailag felmerül a CD lehetősége, illetve az UC kizárásában (pancolitis esetén) [19, 32]. Sajnos egészséges egyéneknél akár 10-16% lehet a gyakorisága annak, hogy kóros, pl. aftás elváltozás ábrázolódik a vizsgálatnál. Kiemelésre érdemes, hogy kb. 10%-os gyakorisággal előforduló IBD-U esetében a kapszulás endoszkópia nagyban elősegítheti a diagnózist. Fontos azonban megjegyezni, hogy a vékonybél kapszulás vizsgálatával negatív eseteknél is előfordulhat, hogy később derül ki egyértelműen a CD fennállása [31]. A vékonybél érintettségének megítélése a nehezen igazolható esetek diagnózisának felállításához mellett fontos a prognózis szempontjából is. Jejunalis érintettség esetén gyakoribbak a relapsusok, rosszabb a prognózis [33].

Szövetten, granulomák

A CD szövettani képére jellemzőek az el nem sajtosodó granulomák, melyek a tápcsatorna bármely szakaszán megjelenhetnek. A granulomák hiánya nem zárja ki a CD-t, a HUPIR adatai szerint CD-s gyermekeknek csak a 30%-ban fordulnak elő [34]. A bélfal megvastagodik (muscularis propria), jellemző a gyulladásos sejtek, főleg a neutrophil granulocyták infiltrációja, melyek crypta abscessusokat képeznek. Megjelennek a fekélyes és a krónikus nyálkahártya károsodások, ezeken a bélszakaszokon a hámszerkezet megváltozik, atrophias lesz, metaplázia alakulhat ki. Jellemző még a fibrózis, szöveti hegesedés is. A gyulladás gyakran a környező mesenterialis zsírszövetet is beszűri.

UC-ban a fekélyképződés nem érinti a teljes bélfalat, csak a mucosa és a submucosa károsodik. Az UC szövettanára jellemző a lamina propriában megjelenő basalis plasmocytosis, crypta abscessusok kialakulása, illetve a nyák depléció. A károsodott bélszakaszok gyógyulásával itt is hegesedés, fibrózis jelenhet meg, a nyálkahártya atrophiaival gyógyul. Fontos gyakorlati ismeret, hogy a legjellemzőbb szövettani UC ismérv (crypta tályog) CD-ben is előfordul.

2.1.5. A gyulladásos bélbetegség kezelése*CD kezelése*

A gyermekkori CD kezelésének nemzetközi ECCO/ESPGHAN ajánlása 2014-ben jelent meg. A kezelés legfontosabb irányelve a mély remisszió (PCDAI $10 \geq$, illetve ne legyen mucosalis fekély a béltraktusban) lehetőleg szteroidmentes állapotban, a növekedés elmaradás- és csontsűrűség csökkenés elkerülése. Újabb adatok alapján egyértelmű, hogy a kezelés első lépése az exkluzív enterális táplálás (EEN). Enyhe ileo-coecalis érintettségű CD-ben a budesonide alkalmazható, perianális fisztulák esetén antibiotikum terápia (metronidazole, ciprofloxacin), illetve fenntartó terápiaként azathioprin (Imuran) javasolható. Rossz prognózisú gyermekek esetében (perianális fisztulák, súlyos strikturázó/penetráló kórkép, súlyos növekedés elmaradás, panenterális érintettség, mély colon fekély, terápia rezisztencia) az anti-tumor nekrozis faktor (TNF)- α kezelés lehetne az elsőként választandó remisszió indukciós terápia („top down”

séma). Fenntartó kezelésre a nemzetközi irányelvek immunmodulátorokat (azathioprin, 6-mercaptopurine, methotrexate) javasolnak. Amennyiben ez a terápia nem elégséges, fenntartó kezeléshez is az anti-TNF- α terápia a választandó.

A sebészeti kezelés hatékony az ileocecalis formánál, illetve szóbajön azon gyermekeknél, akiknek szűkületekkel jár a betegségük és hagyományos terápiákra nem reagál. Perianális érintettség esetén a Seton-drainage és tályog ellátás is a sebészeti kezelés része [35].

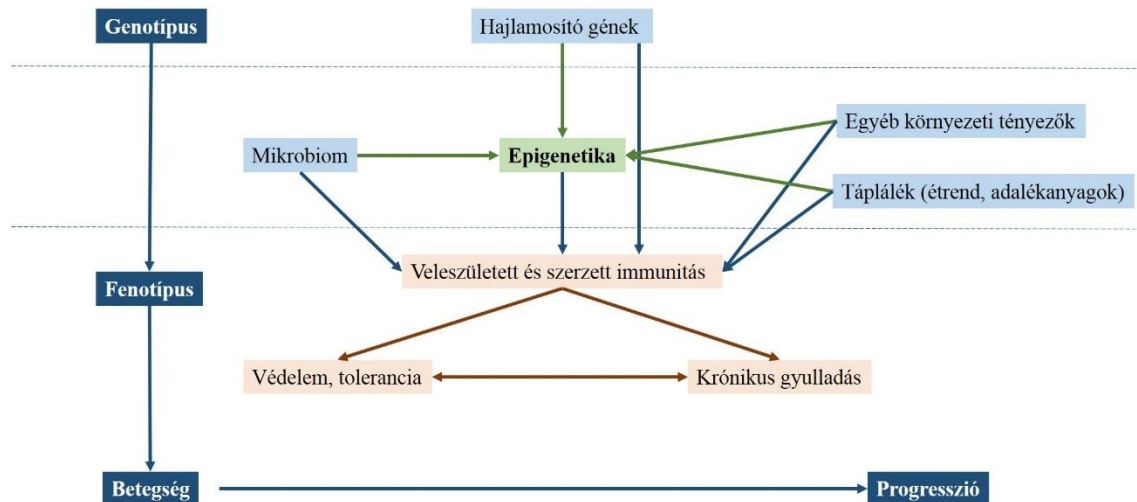
UC kezelése

A gyermekkori UC kezelésének nemzetközi ECCO/ESPGHAN ajánlása 2012-ben jelent meg. Enyhe és közepesen aktív UC-ban a remisszió indukálására és fenntartására az orális és topikális 5-aminoszalicilsav (5-ASA) az elsőként választandó terápia. Szteroid kezelés az 5-ASA kezelés kiegészítésére javasolt hatástalanság esetén, fenntartó kezelésként azonban nem javasolt. Közepesen súlyos UC esetén orális, súlyos UC-ban az intravénás szteroid terápia választandó.

Az 5-ASA kezelést rosszul toleráló, gyakori relapszusok esetén, vagy szteroid refrakter betegségben szenvedő gyermekek esetén az immunmodulátor (azathioprin, 6-mercaptopurine) terápia jöhet szóba. Immunmodulátor kezelés javasolt továbbá kifejezetten súlyos akut colitisben a szteroid indukciót követően fenntartó kezelésként. Anti-TNF- α terápia szteroid dependens, szteroid hatástalanság esetén, terápia refrakter UC-ban ajánlott remisszió indukcióra, azonban thiopurin naív betegek esetén a későbbiekben javasolt a thiopurin terápiára való áttérés. A CD-hez hasonlóképpen, az UC-ban is szóbajön a sebészeti kezelés [30].

2.1.6. A gyulladós bélbetegség etiopatogenezise

Az IBD patomechanizmusa nem pontosan tisztázott, a technikai fejlődésnek köszönhetően azonban egyre közelebb kerülünk a kórkép megértéséhez. Napjaink szakirodalma alapján az IBD genetikailag fogékony egyéneknél alakul ki, környezeti tényezők hatására a bél immunrendszere kórosan aktiválódik és kontrollálatlan immunválasz alakul ki. Az utóbbi évek tudományos közleményei felvetik az epigenetikai tényezők szerepét a kórkép kialakulásában, progressziójában, a fenotípusában és a terápiára adott válaszában is (1.ábra).



1. ábra: **IBD etiopatogenezise:** Az epigenetika összekötő kapocs a genetika, a környezeti tényezők és a gyulladós bélbetegségek fenotípusa, progressziója, valamint terápiára adott válasza között.

Genetika

A családfakutatások figyelemfelkeltő hatásának köszönhetően az elmúlt 25 évben fokozódott az érdeklődés az IBD patomechanizmusát befolyásoló genetikai tényezők iránt. A betegek 10-20%-ának egyik elsőfokú rokona is IBD-ben szenved [36]. Iker vizsgálatokból kiderül, hogy egypetűjű ikrekben a CD együttes előfordulása 20-50%-os, míg kétpetűjű ikrekben kb. 10%-os. UC-ban ez kisebb jelentőségűnek bizonyult, egypetűjű ikreknél kb. 14-19%-os, kétpetűjű ikreknél kb. 0-7%-os az együttes előfordulás [37]. A betegség kialakulásának kockázata testvérek között magasabbnak bizonyult, mint más gyakori, ismert genetikai háttérrel rendelkező betegség (1-es, 2-es típusú diabétesz, skizofrénia) esetén, mely tovább erősíti az IBD genetikai tényezőinek fontosságát [38]. A kórkép az egymást követő generációkban egyre rosszabb prognózisú, egyre korábban és súlyosabb formában jelentkezik, a gyulladás lokalizációja azonban hasonló [39].

A Nemzetközi IBD Consortium fogja össze az eddigi genetikai kutatásokat, 1988 óta folyamatosan gyűjtik az adatokat, melyek segítségével fény derült számos addig IBD szempontjából kevésbé, vagy nem kutatott biológiai folyamatra (autofágia, barrier funkció, Thelper (Th)-17 szerepe), illetve kapcsolatot találtak az IBD és egyéb immunmediált kórképek (ankylosis spondylitis, psoriasis és primer sclerotizáló cholangitis) között [40].

A „*Genome-Wide Association Studies*” (GWAS) kezdete óta jelenleg összesen 163, IBD szempontjából releváns lókuszt azonosítottak metaanalízisek segítségével. A 163 azonosított génen belül 110 közös, 30 CD-re, 23 pedig UC-re specifikus. Ezek a lókuszok alátámasztották a veleszületett és szerzett immunitás szerepét IBD-ben (<http://www.ibdgenetics.org/>) [41].

A teljes, 163 génből álló lista kialakulását az ImmunoChip vizsgálat segítette elő, ahol több, mint 75 000 beteg és egészséges felnőtt metaanalízisét végezték. Az IBD szempontjából releváns lókuszok vizsgálatán kívül 200 000 egy pontos nukleotid polimorfizmust (SNP) igazoltak az IBD-s betegekben, melyek sok esetben kapcsolatot mutattak egyéb immunmediált kórképekkel [12]. A CD-re és UC-ra jellemző közös hajlamosító gének a hasonló patomechanizmust támasztják alá. A Th17, interleukin (IL)-12/IL-23 és az IL-10 útvonal defektusai a legfontosabb közös etiológiai tényezők.

Az érintett gének közül az interleukin-23-receptor (IL23R), az IL12B, a Janus-kináz (JAK) 2, a szignál transzducer és aktivátor transzkripció faktor (STAT) 3, a Caspase recruitment domain-containing protein (CARD) 9, az IL1R2, a proto-oncogene c-Rel (REL) és a mothers against decapentaplegic homolog (SMAD) 3 a leginkább kutatott [42, 43].

Az első CD-re specifikus lókuszt (IBD1) a 16-os kromoszómán találták meg, mely a nukleotid kötő oligomerizációs domén (NOD) 2/CARD15 gént kódolja [36]. A NOD és a Toll-like receptorok (TLR) bakteriális mintázat felismerő receptorként fontos szerepet játszanak a fertőzésekre adott válaszban. A NOD2/CARD15 hajlamosító gén a muramyl-dipeptidet (MDP) és a bakteriális lipopoliszacharidokat (LPS) felismerő NOD2 fehérjét kódolja. A NOD intracelluláris jelátviteli útvonalakon keresztül a nuclear factor kappa B (NF- κ B) transzkripció faktor aktivációját idézi elő. Mutációja antigén nélkül is folyamatos stimulálást, kontrollálatlan gyulladást hozhat létre [44]. CD-re önálló hajlamosító tényező két SNP (SNP8: Arg702Trp és SNP12: Gly908Arg) és egy frame-shift mutáció (SNP13: Leu1007insC) a NOD génben [45]. Önmagában egy allél mutációja 2-4-szeres rizikót jelent, míg több polimorfizmus esetén a rizikó 20-40-szeres is lehet. A NOD2 mutációja önálló prediktora a betegség korai kezdetének, az ileum érintettségnek, a fibrosztenotizáló és fisztulázó fenotípusnak, illetve a CD-vel kapcsolatos sebészeti beavatkozásoknak [45, 46].

A 16-os kromoszómán egyéb hajlamosító géneket is azonosítottak: CD11, CD19 integrinek, Sialophorin, IL-4R génje. A 6-os (IBD3) és 12-es (IBD2) kromoszómán CD-re és UC-ra hajlamosító géneket is azonosítottak, többek között: interferon (IFN)- γ , humán leukocita antigén (HLA)-A, HLA-B, HLA-DQ, tumor-nekrózis faktor (TNF)- α , TNF- β , hősokk fehérjék (HSP), C2, C4 komplement és a D-vitamin receptor génjét [47]. Mindezekből látható, hogy a főbb hajlamosító gének (IBD1-7) szerepet játszanak a bakteriális érzékelésben, major hisztokompatibilitási komplex (MHC)/HLA komplexben, illetve számos gyulladáshoz mediátor (interleukinek, citokinek) képződésében.

A GWAS metaanalízise hívta fel a figyelmet az IL-23R szerepére, melynek mutációja nem csupán a fenotípust, hanem a terápiára adott választ (anti-TNF- α hatékonyságát UC-ban) is befolyásolja. Mindezek mellett prediktora számos EIM-nek (ankylosis spondylitis, psoriasis) [46, 48]. Az autofágiához kötött 16-1 (ATG16L1) és az immunitáshoz kötött GTPáz M (IRGM) gén mutációja is hajlamosító tényező CD-

ben. Az ATGL16L1 és a NOD2 gén mutációja a nyugati populációban gyakrabban fordul elő, mely részben oka lehet a kelet-nyugati irányultságnak [49, 50]. A Janus-kináz-2 (JAK2) mutációját is összefüggésbe hozták a CD ileocolonicus érintettségével és a stenózis gyakoriságával. A JAK2 kulcsszerepet játszik számos IBD-ben releváns jelátviteli útvonalban (IL-12 és -23) [46]. Sajnos az intenzív genetikai kutatások ellenére komoly gyakorlati értéket nem sikerült felmutatni, még a legtöbbre tartott NOD2 mutáció vizsgálata sem értékelhető érdemben gyakorlati felhasználásra.

Teljesen más jellegű az igen korai kezdetű („very early onset IBD”) IBD diagnosztikája, itt az egyik leggyakoribb az IL-10R mutációjának a vizsgálata. Fontos kiemelni, ez nem IBD, itt valójában olyan monogénes immunhiányos állapotokat keresünk, ami fenotípusában hasonlít az IBD-re azonban valójában több különálló kórképről van szó [51, 52]. A főbb hajlamosító géneket a 2. ábra foglalja össze.

ADAPTÍV IMMUNITÁS	VELESZÜLETETT IMMUNITÁS		
<p>Th17/Treg funkció</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ IL23R ▪ IL12B ▪ STAT3 ▪ JAK2 ▪ TYK2 ▪ CCR6 ▪ IL2/IL21 ▪ RORC ▪ ICOSLG ▪ IL27 ▪ VDR ▪ IL6ST ▪ ISM ▪ CD6 ▪ PTPN22 ▪ FASLG ▪ TAGAP ▪ TNFSF15 ▪ TNFRSF9 ▪ TNFRSF18 ▪ TNFRSF6B ▪ NFIL3 ▪ CD226 ▪ IL10 ▪ IL2RA 	<p>Epitél barrier funkció</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ MUC19 ▪ SLC22A4/5/IBD5 ▪ PTGER4 ▪ NKX2-3 ▪ TAB1 ▪ SMAD7 ▪ SMAD3 ▪ GPR35 ▪ TNFAIP3 ▪ STAT3 ▪ SMURF1 		
<p>Th1 sejt funkció</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ IL12B ▪ SOCS1 ▪ STAT1/STAT4 ▪ IL18RAP, IL1R1 ▪ IFNG ▪ IL27 ▪ LGALS9 	<p>Bakteriális, gomba és vírus felismerés</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ NOD2 ▪ RIPK2 ▪ LGALS9 ▪ CARD9 ▪ FUT2 ▪ IFNGR2, IFNAR1 ▪ SP140 ▪ LACC1 ▪ IFIH1 ▪ CXCR5 	<p>Autofágia, APC funkció, ER stresszre adott válasz</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ ATGL16L1 ▪ IRGM ▪ LRRK2, SMURF1 ▪ MST1 ▪ CD40 ▪ TNFRSF9, TRAF3IP2 ▪ CCL13, CCL2 ▪ PTGER4 ▪ IRF8 ▪ FCGR2 ▪ ORMDL3 ▪ ERAP2/ERAP1 	
<p>Tfh és B sejt funkció</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ IL2/IL21 ▪ DOK3 ▪ RASGRP1 ▪ REL ▪ CXCR5 ▪ GPR183 ▪ PRKCB 	<p>A betegség fenotípusának predikciója: Extraintesztinális manifesztációk (psoriasis): IL23R, IL12B, PTPN22 Betegség viselkedése (stenotizáló, fisztulázó): NOD2, JAK2 Betegség lokalizációja (ileális érintettség): NOD2</p>		
<p>A terápia hatékonyságának predikciója: Terápia hatékonysága (pl.: anti-TNF-α terápiára, szteroid kezelésre adott válasz): IL23R Terápia mellékhatásainak predikciója (pl. fertőzések): IL12B, TYK2, STAT3</p>			

2. ábra.: A főbb IBD-ben releváns hajlamosító gének, kiemelve jelentőségüket a betegség típusának és a terápia hatékonyságának előrejelzésében. A gének felosztása biológiai funkciójuk szerint történt. (APC: antigén prezentáló sejtek, ER: endoplazmás retikulum, Th: T helper sejtek, Tfh: folliculáris T helper sejtek) [46]

Környezeti tényezők

Az IBD patomechanizmusának szerény hányadát (CD: 13,6%, UC: 7,5%) lehet a hajlamosító gének varianciájával magyarázni [12], ezen felül a kialakulásában kiemelt szerepet játszanak a környezeti tényezők is.

Az IBD és a környezeti tényezők közötti kapcsolatot először a dohányzási szokások vizsgálata igazolta. UC-ban a dohányzás protektív, ritkábban van szükség colectomiára, CD-ben azonban a dohányzás rizikó faktor, gyakoribb a colectomiát követő relapszusok aránya [53]. A 20. századi incidencia növekedés hátterében a higiénia hipotézisnek, illetve a megváltozott étrendnek (emulgeáló- és tartósítószer) tulajdonítanak nagy jelentőséget [54-57]. Az ún. „hűtőhipotézis” azon alapszik, hogy 4°C-on bizonyos baktériumok (*Yersinia*, és *Listeria* fajok) jól szaporodnak, és ezen baktériumfajok sokszor megtalálhatóak a CD-s léziókban [58]. Számos epidemiológiai vizsgálat felveti a perinatális, a kisgyermekkorú ártalmak (passzív dohányzás), valamint a nem specifikus infekciók (gastroenteritis) lehetséges szerepét [54]. Több tanulmány igazolta az anyatejes táplálás védő szerepét IBD-vel szemben [59, 60]. Igazolták az antibiotikum használatával összefüggő bélflóra változást a korai (1-3 év) életkorokban, ami hajlamosít az IBD későbbi kialakulására [61-63]. Az appendectomia, ha valóban gyulladt volt a féregnyúlvány - UC-ban protektív, míg CD-ben a betegség kialakulásának rizikófaktora [64].

Az utóbbi években egyre nagyobb jelentőséget tulajdonítanak az intraluminális tényezőknek, az étellel bekerült antigéneknek és a bélbaktériumoknak. Az étrend összetevőivel kapcsolatban ellentmondásos adatok láttak napvilágot, szerepüket azonban alátámasztja az EEN remissziót indukáló hatása.

Mikrobiom

A teljes gasztrointesztinális traktus kb. 10^{14} kolóniaformáló egység (CFU)/g, a normál colon bélflóra önmagában kb. 10^{10-12} CFU/g mikroorganizmusból áll, melynek többsége baktérium. A bélnyálkahártya és a non-invazív, protektív baktériumok kölcsönhatásban vannak, a normál bakteriális flóránk védelmet jelent a patogén mikroorganizmusok ellen. A normál humán bakteriális flóra feltérképezésében, valamint a taxonómiai csoportok kialakításában a *Human Microbiom Project*-nek kiemelkedő szerepe van [65, 66].

A mikrobiom egyensúlyának felborulása, a diszbiózis, és a diverzitás csökkenése igazoltan szerepet játszik számos betegség, így az IBD patomechanizmusában is. A mikrobiom megváltozását sokféle tényező elősegíti, többek között az étrendünk (nyugati típusú étrend, emulgeáló- és tartósítószeres), az anyatejes táplálás, a császármetés és az antibiotikumok használata [56, 67]. IBD-ben kimutatták a protektív, anti-inflammatorikus *Bacteroides* és *Firmicutes* törzsek alacsonyabb számát, és a pro-inflammatorikus *Proteobacteria*-k túlzott jelenlétét. Mindezek mellett az egészséges egyének flórája anti-inflammatorikus anyagokat (rövid szénláncú zsírsavak, például butirát) termel, melyek szintje CD-ben csökken [56, 62]. CD-ben ez a megváltozott flóra kedvez a patogén törzsek megtelepedésének [62, 68]. Fontos kérdés, hogy a megváltozott mikrobiom oka, vagy következménye a különböző kórképek kialakulásának, ismert azonban, hogy a bél immunrendszere, a mucosa és a potenciális patogének között szoros a kapcsolat.

Az utóbbi években előtérbe kerültek a diszbiózis megszüntetését célzó terápiák, köztük a *Clostridium difficile* fertőzésben sikerrel alkalmazott széklet transzplantáció is. A széklet biológiailag aktív mikroorganizmusokból áll, ezért feltételezik, hogy transzplantációja a kórosan megváltozott bélflóra egyensúlyának visszaállítása, a toxintermelő törzsek kiszorítása és ezzel a természetes baktérium flóra visszaállítása révén fejti ki pozitív hatását. Feltételezik továbbá, hogy a donor flóra antimikrobiális anyagokat termel, pro-inflammatorikus faktorokat gátol, aktivál különböző anti-inflammatorikus citokineket, valamint serkenti a protektív veleszületett és szerzett immunitást [69-71].

Immunológiai tényezők

Az IBD patomechanizmusában a genetika és a környezeti tényezők mellett az immunológiai tényezők szerepe is kiemelendő. Az antigén és a szervezetünk erre adott effektor válasza határozza meg az immunológiai reakciót. Szervezetünk alapvetően két módon reagál az antigénekre, egyrészt a veleszületett immunitás gyors, másrészt a szerzett immunitás lassabb, szelektívebb aktiválódásán keresztül. Az idegenek ítélt antigéneket az immunrendszer eliminálja, míg a saját antigénekkal szemben tolerancia alakul ki.

A bélnyálkahártya szervezetünk legnagyobb védő barriere [72]. Külső és belső nyákréteg borítja, amelyben a baktériumok megragadnak. Ismert, hogy a különböző, főleg tartósító- és emulgeáló szereket tartalmazó étrendek csökkentik a nyákréteget, így redukálva a nyálkahártya és a baktériumok közötti távolságot [56]. A nyákréteg alatt helyezkedik el az epitél réteg, ami egy fizikai és kémiai barrier, véd a környezeti faktoroktól, megakadályozza a baktériumok szervezetbe jutását, továbbá reagál a külső stimulusokra. Szerepe van a megfelelő immunválasz beindításában, koordinálásában, illetve az immuntolerancia, vagy a patogének elleni védekezés kialakításában, károsodása fokozott immunválaszhoz vezet. A bakteriális transzlokáció növeli az IBD kialakulásának valószínűségét, ami jelzi az epiteliális barrier károsodás központi szerepét a kórkép kialakulásában [72]. Az epitél réteg alatt helyezkedik el a lamina propria, ami egy leukocitákban (B-sejtek által termelt immunglobulin (Ig) A), makrofágokban gazdag réteg, melyek az immunválasz effektor sejtjei [73]. Kiemelendő továbbá a többi bél-rendszer asszociált immunszövet (GALT), mint például a Peyer-plakkok és a mesenterialis nyirokcsomók. A GALT-nak kettős szerepe van, egyrészt véd a fertőzések és ártalmas antigének ellen (protektív immunitás), másrészt toleranciát alakít ki a táplálékokban található antigénekkal szemben (orális tolerancia) [74].

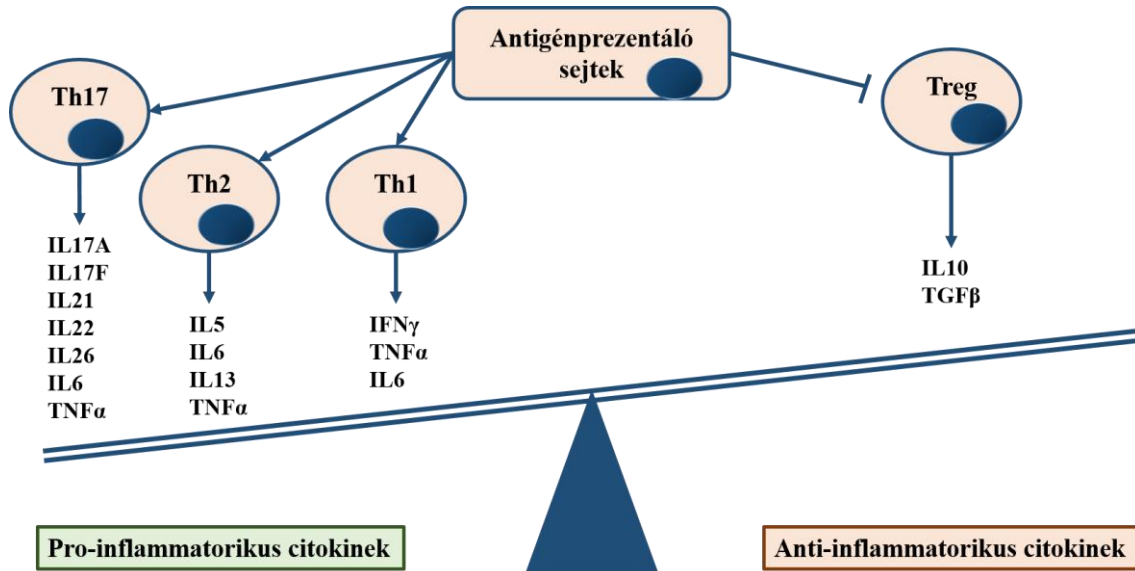
A veleszületett immunrendszer fő sejtjes alkotói a granulociták és leukociták, a makrofágok, a természetes ölüsejtek, azok termékei, illetve ezen kívül a keringő plazmafehérjék, melyek közül a legfontosabbak a komplementrendszer fehérjei. A bélflóra jelentős hatással van az intesztinális immunrendszer megfelelő fejlődésére, funkciójára. Az intesztinális immunsejtek a felszínükön és a citoplazmájukban levő bakteriális mintázat felismerő receptorokon keresztül képesek felismerni a kommenzalista és a patogén baktériumok konzervált felszíni mintázatait (PAMP), és a

baktériumok által kibocsátott termékeket. Ezen mintázat felismerő receptorok családjába tartoznak a TLR-ek és NOD jellegű receptorok, amelyek a veleszületett immunrendszer antigén érzékelői. A CD kutatásának egyik legnagyobb lépését a NOD2/CARD15 gén mutációjának és feladatának felismerése jelentette. Ismert, hogy az IBD-s betegek mucosájában emelkedett a TLR szint [75]. A mikrobák aktiválják a TLR dependens mucosális immunválaszt a myeloid differentiation primary response 88 protein (Myd88), NF- κ B és szignál transzducer és aktivátor transzkripciós faktor (STAT) jelátviteli útvonalon keresztül, így számos gyulladással kapcsolatos mediátor [IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-14 β] és kemokin (chemokine C-C motif ligand 2 (CCL2) és chemokine C-X-C motif ligand 8 (CXCL8), C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4)] expresszióját fokozzák [76-84].

A makrofágok felszínén számos receptor található, melyek különböző stimulusok hatására aktiválják a sejtet. Két fő formájuk van, az M1 irányú polarizáció gyulladással, patogén eltávolító folyamatokat indít be (reaktív oxigén és nitrogén vegyületek felszabadítása), míg az M2-es a hegképződést, gyulladást gátló mechanizmusokat indukál az IL-4 és IL-13 citokinek által [85].

A gyulladás fenntartásáért az adaptív immunitás fő effektorai, a T-sejtek által termelt pro-inflammatorikus citokinek felelősek. Az adaptív immunválasz során a T-sejt fenotípusa a kórokozó jellegétől függően Th1, Th2 és Th17 típusú lehet. Egészséges egyénben az immunválasz két módon gátlódik: a T-sejtek apoptózisával és a regulátor T-sejtek (Treg) közvetítésével. IBD-ben, főként CD-ben a T-sejtek apoptózisa elmarad (rezisztensekké válnak), proliferációs képességük fokozódik. A fentiek következtében valamely ágens által elindított immunválasz folyamatos (önfenntartó) gyulladást hoz létre, amely szövetkárosodáshoz vezet. Az IBD két fő altípusára jellemző egyes effektor sejtek dominanciája: CD-ben elsősorban a Th1-, míg UC-ban főként a Th2-sejtek vesznek részt a gyulladással kapcsolatos folyamatokban [82]. A makrofágok által termelt IL12/23, IL-6 citokinek aktiválják CD-ben a Th1 és Th17 limfocitákat. Ezek a Th sejtek felelősek a CD-ben látható emelkedett IFN γ , IL-6, TNF- α , IL-17, IL-21 és IL-22 termelésért (3. ábra). Az UC-ban jellemző Th2 aktiváció felelős a fokozott IL-5, IL-6, IL-13 és TNF- α termelésért. Emellett a Treg sejtek termelik az anti-inflammatorikus IL-10 és transzformáló növekedési faktor (TGF)- β citokineket (3. ábra). Utóbbi az egyik

legfontosabb tényező a fibrózis kialakulásában, a mesenchymalis sejtek indukálásában [82, 86].



3. ábra: A *pro- és anti-inflammatorikus citokinek egyensúlya az IBD patomechanizmusában*. Az antigénprezentáló sejtek aktiválják a Th17, Th1 és Treg sejteket, amelyek különböző interleukinokat és citokineket termelnek, ezáltal befolyásolva a gyulladás és regeneráció egyensúlyát [42].

2.2. Epigenetika és mikroRNS-ek

2.2.1. Epigenetika

Néhány évtizede még az egyedi tulajdonságok-, illetve a fenotípus kialakulását az akkori tudományos kutatások alapján a DNS→RNS→fehérje lánc alapján determinálták. A „*Human Genom Project*” során azonban kiderült, hogy génállományunk csupán igen kis része kódol fehérjéket. Ismert, hogy a genetikai szabályozó tényezők csak kismértékben befolyásolják az IBD kialakulását, ezért számos vizsgálat foglalkozik a genetika mellett a környezeti tényezőkkel is. Az epigenetika a genetikai és a környezeti tényezők közti kapocsként olyan jelenségekkel foglalkozik, melyek következtében anélkül nő a genom genetikai sokféleséget létrehozó képessége, hogy a DNS szekvenciája változna. A legismertebb példa az Aegouti-gén metilációs vizsgálata, melyben a genetikusan identikus egerek az anyai étrendtől függően különböző fenotípusúak lesznek [87]. Négy fő epigenetikai mechanizmus létezik: a hiszton modifikáció, a DNS metiláció, az autoreguláció és a nem kódoló RNS-ek.

A nem kódoló RNS-ek, melyek a fehérje expresszió szabályozásában vesznek részt, méretük és funkciójuk szerint csoportosíthatóak. A transzkriptumok hossza szerint két fő csoportba oszthatjuk őket. A 200 nukleotidnál rövidebbek a rövid-, a 200 nukleotidál hosszabbak a hosszú nem-kódoló RNS-ek. A rövid, nem-kódoló RNS-ek tovább oszthatók: transzfer (t)RNS, riboszómális (r)RNS, kis interferáló (si)RNS, kis sejtmagi (sn)RNS, mikroRNS (miR) és kis magvacska (sno)RNS. Jelenleg kb. 10 000 rövid, és 15 000 hosszú, nem-kódoló RNS-t ismerünk, mely a teljes genom (kb. 60 500 gén) csaknem 40%-át teszi ki [88, 89].

2.2.2. MikroRNS-ek

Definíció

A rövid, nem kódoló RNS-ek számos fajtája, funkciója ismert [88]. A mikroRNS-ek rövid, 18-24 nukleotidból álló, kétszálú RNS-ek, melyek poszttranszkripciós szinten szabályozzák a génexpressziót [90].

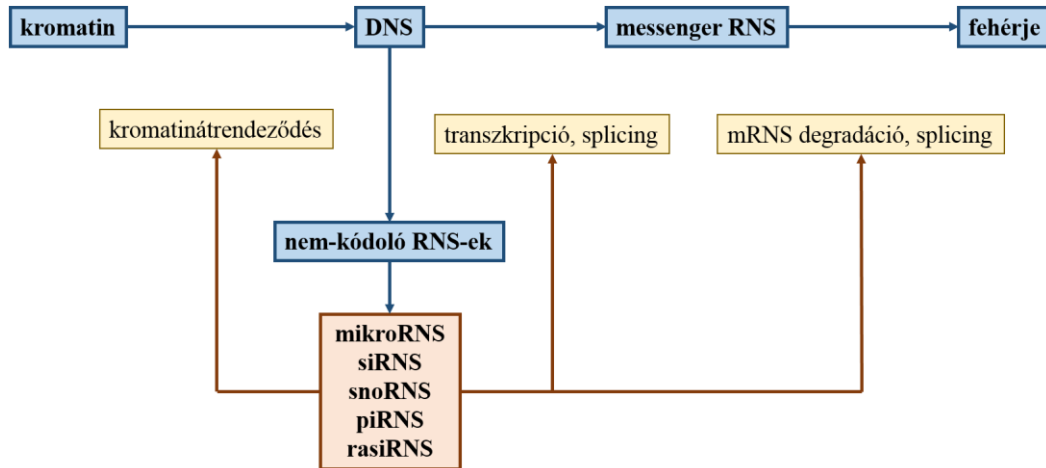
A miR-eket 1993-ban írták le a *Caenorhabditis elegans* (nematoda) vizsgálatok során a LIN-14 proteint kódoló lin-4 génnel kapcsolatban [91]. A téma iránti fokozottan növekvő figyelmet jelzi, hogy míg 2000-ben összesen 3 közlemény jelent meg, addig 2017-re ez a szám több ezerre emelkedett. Az elmúlt néhány év intenzív kutatásának köszönhetően kiderült, hogy több ezer mikroRNS létezik, és ezek szerepet játszanak a biológiai folyamatok regulálásában, valamint számos kórkép patomechanizmusában.

MikroRNS-ek képződése és működése

A legtöbb mikroRNS génje intron régióban található (80%), a fehérje kódoló és nem-kódoló szakaszokban egyaránt, csupán 20%-uk génje található a nem-kódoló exonokon. Egyes mikroRNS gének az alternatív splicing mechanizmusoknak köszönhetően mindkét helyen megtalálhatók.

Bioszintézisük során először primer mikroRNS-ek (pri-miR) képződnek, melyeket az RNS polimeráz II/III ír át a DNS-ről. A pri-miR-t a Drosha és a DiGeorge Syndrome critical region 8 multiprotein komplex (DGCR8) alakítja tovább prekursor-mikroRNS-sé (pre-miR). A 70-100 bázispár hosszú pre-miR-t a Ran GTP dependens Exportin 5 transzportálja a nukleusból a citoplazmába, ahol a DICER (RNase III endonukleáz család tagja) enzim hasítja 19-24 bázispár hosszú mikroRNS-sé [92]. Az érett mikroRNS alkalmassá válik arra, hogy része legyen az Argonaute (Ago) proteint is tartalmazó RNS-indukált silencing komplexnek (RISC). A RISC képes a mikroRNS „mag szekvenciájának” (=seed sequence) megfelelő messenger RNS-t (mRNS) megkötni, majd az mRNS 3' vagy 5' UTR (untranslated region) régiójához kötődni [89, 90, 93].

A mikroRNS-ek az RNS-interferencia, géncsendesítés endogén mediátorai, poszttranszkripció szinten szabályozzák a génextpressziót, valamint mRNA-bontó endonukleázok aktiválása révén mRNA bontást indukálnak (4. ábra) [88].



4. ábra: A fenotípus kialakulását szabályozó tényezők. A DNS 98%-át alkotó nem kódoló RNS-ek családja, illetve azok funkciója (kromatinátrendeződés, transzkripció, transzláció, messengerRNS degradáció indukciója, génextpresszió szabályozása) (siRNS: kis interferáló RNS, snoRNS: kis nukleáris RNS, piRNS: Piwi-interacting RNS, rasiRNS: repeat-associated small interfering RNS, mRNA: messenger RNS)

Ismert biológiai folyamatok szabályozása

Egy sejttípuson belül minden mikroRNS-nek több száz mRNS célpontja lehet, illetve egy mRNS-hez akár egy időben is, több mikroRNS kapcsolódhat. Ennek megfelelően a humán transzkriptom nagy része a mikroRNS-ek regulációja alatt áll, amik ily módon részt vesznek minden biológiai folyamat szabályozásába [90, 94].

Szerepet játszanak a differenciálódásban, a proliferáció- és az apoptózis szabályozásában, valamint a stressz- és immunválasz kialakításában. Ezen ismert funkcióik alapján eddig leginkább daganatos és immunmediált betegségekben vizsgálták szerepüket. Ezen túlmenően egyes mikroRNS-ek szerepet játszhatnak a kardiovaszkuláris-, neurodegeneratív, infekciós és metabolikus kórképek kialakulásában is [81, 89, 90, 95].

A jelenlegi kutatások fő iránya az egyes betegségekre specifikus mikroRNS mintázatok meghatározása és funkciójuk azonosítása, melyekkel lehetőség nyílik új diagnosztikus és prognosztikus markerek bevezetésére. Felmerül továbbá, hogy az adekvát mikroRNS kezelés a jövőben terápiás értékűvé válik, akár IBD-ben is. Jelenleg humán fázis 2b vizsgálatokban sikeresen alkalmazzák a miR-122 gátoló Miravirsent®, ami megakadályozza a hepatitis C vírus replikációját [96].

MikroRNS-ek a veleszületett immunitásban

A mikroRNS-ek fiziológias és kóros körülmények között egyaránt befolyásolják a veleszületett immunitásban részt vevő sejtek proliferációját, differenciálódását, túlélését, valamint a limfocita aktivációt, effektor- és ölü mechanizmusokat. Nemcsak a mikroRNS-ek hatnak az immunrendszerre, annak aktivációja számos mikroRNS expresszióját megváltoztatja.

Az immunválasszal kapcsolatban a leginkább kutatott mikroRNS a miR-146a, ami negatív regulátora a gyulladásos folyamatoknak [85, 97]. Az első vizsgálat, ami az LPS indukálta TLR választ elemezte humán makrofágokban - a miR-146a expresszió növekedését mutatta ki. Az LPS indukció idő - és dózis-dependensen a TLR-2, -4 és -5 útvonalon keresztül növeli a miR-146a expresszióját humán akut monocytá leukémia sejtvonalon (THP-1) is. Ezzel szemben a miR-146a szintje nem emelkedik a TLR-3, -7 és -9 útvonalakon keresztül [97, 98]. *In vivo* az LPS kezelés a makrofágok túlaktiválódásához, túlzott gyulladásos válaszhoz kialakulásához vezet a miR-146a hiányos (knock out) egerekben, melyek fenotípusa LPS hatására autoimmun megbetegedés képét mutatja (splenomegalia, lymphadenopathia, többszervi gyulladás) [85, 99]. A TLR és T-sejt receptor mediált NF- κ B jelátviteli folyamatokban is felülexpresszálódik a miR-146a, és mintegy negatív feedback mechanizmusként gátolja az NF- κ B utat, valamint a TLR szignalizációs útvonal két kulcsmolekulájának, az IL-1 receptor asszociált kináz 1 (IRAK1)-nak és a TNF receptor-asszociált faktor 6 (TRAF6)-nak a működését [97, 100, 101]. A miR-146a-nak az IRAK1 és TRAF6 gátlásán keresztül szerepe van az endotoxin tolerancia kialakításában is [98]. Emelkedett miR-146a expresszió mutatható ki kifejezetten magas, 1 ng/ml IL-1 β koncentrációnál humán alveoláris epitél sejtekben, ami jelzi a miR-146a súlyosabb gyulladásnál aktiválódó gyulladást csökkentő, negatív visszacsatolási mechanizmusát [102].

Igazolták továbbá, hogy míg a miR-146a gátolja, addig a miR-155 erősíti a gyulladásos folyamatokat. A miR-155-öt az LPS, az IFN- γ és számos egyéb TLR ligand aktiválja [103]. Aktivációja számos pro-inflammatorikus interleukin és citokin (TNF- α , IL-1 β , IL-6, TNF receptor szupercsalád) aktivációjához vezet, valamint szerepet játszik a dendritikus sejtek antigén prezentáló kapacitását gátló citokin szignaling szupresszor (SOCS)-1 regulációjában [104]. A miR-155 gátolja a SH2 (Src

homológ 2)-t tartalmazó inozitol foszfatáz-1 (SHIP1)-et, ami a SOCS1-hez hasonló foszfoinozítid 3-kináz (PI3K) és TLR4 szignáltranszdukciós útvonal gátló. A miR-155 fokozott expressziója mieloproliferációhoz vezet [105, 106]. A miR-155 hiányos dendritikus sejtek nem képesek az antigén prezentálásra, így nem aktiválják a T-sejteket. A miR-155 hiányos egerek immundeficiensek, bélrendszerükben több patogén kórokozó él, csökkent a patogének elleni védekezés, ezáltal súlyosabb a colitisek fenotípusa is. A miR-155 komplex hatásait mutatja, hogy gátolja a pro-inflammatorikus a transzformáló növekedési faktor β aktivált kináz-1 (TAK-1) kötő fehérje 2 (TAB2)-t [74, 107].

Míg a miR-146a és -155 expressziója LPS hatására fokozódik, a miR-125b mennyisége csökken. A miR-125b targetje a TNF- α mRNS, így a miR-125b csökkent szintje fokozott gyulladásos válaszhoz vezet [104].

A makrofágok fertőzésekre adott válaszkor számos mikroRNS szintje megemelkedik, például a miR-9, -21, -99b, -125a, -132, -146a, -146b, -147, -187, -223 és a let-7e szintje. Ezek a mikroRNS-ek a miR-146a-hoz hasonlóan a TLR-eken keresztül aktiválódhatnak, és befolyásolják az NF- κ B jelátviteli útvonalat [108-110]. Emellett a miR-21 gátolja a programozott sejthalál 4 fehérjét (PDCD4), ami egy IL-10 inhibitor, így emelkedett IL-10 expresszióhoz vezet. Az IL-10 gátolja a miR-155-öt, ezáltal csökken az SHIP1 szintje, és gátódik a TLR szignalizáció [111]. Igazolták továbbá colon epitél sejtvonalon, hogy az alulexpresszált miR-192 közvetlenül szabályozza a makrofág inhibitor peptid (MIP)-2 α expresszióját, ami egy UC-ban ismerten emelkedett gyulladásos mediátor [81].

Egy haematopoetikus őssejtek mikroRNS mintázatát vizsgáló tanulmányban a miR-223 expressziós szintje a makrofágok mellett a veleszületett immunitás sejtalkotóiban, granulocitákban, monocitákban és a természetes ölüsejtekben is emelkedett volt a többi vizsgált mikroRNS-hez képest [112]. A makrofágokban a pro-inflammatorikus, M1 irányú polarizációt segíti elő. A fent említett mikroRNS-ekhez hasonlóan aktiválja az NF- κ B útvonalat, és fokozza az IL-1 β és -6 citokinek termelődését [113].

Az IBD patomechanizmusában ismert NOD2 a miR-29 és -122 targetjei közé tartozik. A miR-122 kapcsolódása NOD2-höz csökkenti az LPS indukált apoptózist humán colon epitél (HT-29) sejtekben. MiR-122 előkezelt, majd LPS stimulált HT-29

sejtekben a NOD2 indukált NF- κ B jelátviteli út gátlásának köszönhetően csökkent a pro-inflammatorikus (TNF- α , IFN- γ), és emelkedett az anti-inflammatorikus (IL-4, -10) citokinek expressziója [44, 74].

Mindezek alapján elmondható, hogy a mikroRNS-ek több ponton befolyásolják a veleszületett immunrendszer működését, részt vesznek a baktériumok felszínén levő mintázat felismerésben, a TLR és NF- κ B jelátviteli útvonal befolyásolásában, illetve aktiválják a különböző veleszületett immunitásban résztvevő sejteket és azok citokin termelését.

MikroRNS-ek a szerzett immunitásban

A mikroRNS-ek regulálják a T- és B-sejt érését, aktivációt és effektor funkcióit. Specifikus mikroRNS mintázat jellemzi a T- és B-sejtek különböző érési stádiumait. A miR-15b, -16, -21, -24, -30c, -106b, -142-3p, -142-5p, -150, -155, -181, -223, -342, -451, let-7 magasabb expressziót mutatnak a többi immunsejthez és a reticulocytákhoz képest, továbbá a miR-342 expressziója magasabb a T-sejtekben a B-sejtekhez képest [112, 114].

MiR-155 felelős a T- és B-sejt érésért. MiR-155 deficiens sejtekben a Th1/Th2-sejt arány eltolódik a Th2-sejtek irányába és nő a Th2-sejtekre jellemző citokinek termelése (IL-4, -5 és -10). A miR-155 szabályozása alatt áll a Treg-sejtek transzkripciós faktora [forkhead box P3 (FOXP3)] is. A miR-155 hiányos B-sejtek plazmasejteké váló átalakulása gátolt, nem tudnak antitest csoportot sem váltani. Ezek az eredmények magyarázzák, hogy a miR-155 knock-out egerek immundeficiensek [115, 116].

A miR-150 nélkülözhetetlen a T- és B-limfocita érésben, expressziója a progenitor alakokban magasabb, az érés során pedig csökken. Továbbá a miR-150 konstitutív expressziója gátolja a B-sejtek fejlődését, így nem történik meg a pre-B-sejtek pro-B-sejteké alakulását. Mindezek miatt akadályozott az érett B-sejtek kialakulása [117]. MiR-150 transzgenikus egér B-sejt érése kóros, a T-sejt érése viszont normális. Ezzel ellentétben a miR-150 hiányos egerekben a B1-sejtek mennyisége megnő, a B2-sejtek aránya relatíve csökken, a többi T- és B-sejt alak viszont nem érintett [118]. Ezeket a változásokat a miR-150 által direkt módon szabályozott,

limfocita érést több ponton befolyásoló c-Myb transzkripciós faktor működésével magyarázhatjuk [118].

A miR-21 szintje az effektor és memória T-sejtekben magasabb expressziót mutatott a naív sejtekhez képest [114]. A miR-223 expressziója emelkedett T-sejtekben a különböző gyulladásoz kórképekben [113].

A miR-181 befolyásolja az antigén stimulációra adott T-sejt szenzitivitást, emelkedett mennyisége a korai T-sejtekben fokozott antigénválaszt vált ki. Az effektor T-sejtekben az inhibitor foszfatázok gátlásán keresztül a T-sejt receptor jelátviteli utat erősíti [119]. A miR-181 magasabb expresszióját mutatták ki egér B-sejtekben, ektópiás expressziója csontvelői őssejtekben és progenitor sejtekben a T- és mieloid-sejtekkel szemben fokozza a B-sejtek mennyiségét [120].

A miR-17~92 család az anti-apoptikus BCL-2-vel kölcsönhatásban levő mediátorokat, foszfatázokat és tenzin homológokat regulál. Ez a mikroRNS család az érés során a T-sejt túlélést növeli, fokozott expressziója látható a kétlépcsős timopoezis során, továbbá szerepet játszik a folliculáris Th-sejtek differenciálódásában [121].

A miR-34a konstitutív expressziója gátolja a pre-B-sejtek pro-B-sejteké alakulását, melynek következtében kevesebb lesz az érett B-sejtek mennyisége [122]. Mindez a miR-34a által negatívan regulált FOXP1 transzkripciós faktorra kifejtett hatásával magyarázható, ami nélkülözhetetlen eleme a B-sejt érésnek.

MikroRNS-ek a bélrendszerben

A bélrendszer baktériumai komplex módon szabályozott szimbiotikus kapcsolatban vannak a mucosát alkotó epitél- és immunsejtekkel. A bélnyálkahártya egyensúly felborulása számos gyulladásos kórkép kialakulásához vezethet. A gazdaszervezet és a kommenzális baktériumok szimbiózisának megőrzésében az utóbbi években a mikroRNS-ek fontos szabályozó szerepét azonosították [74]. A mikroRNS-ek számos, az immunrendszerrel, gyulladással összefüggő szignál transzdukciós útvonalat és génexpressziót regulálnak a gazdaszervezetben, melyeknek fontos szerepe van a bélrendszerben végbemenő folyamatokban. Befolyásolják a baktériumok felismerését szabályozó gének expresszióját és az immunrendszer válaszáinak csökkentését, ezáltal szerepük van a tolerancia kialakulásában [74].

Egészséges kontrollok endoszkópos vizsgálata során a terminális ileum, coecum, colon transversum, colon sigmoideum és a rectum területéről származó minták alapján igazolták a régióként eltérő mikroRNS mintázatot. A miR-22, -31 és a -215 magasabb expressziót mutat a terminális ileumban, a miR-23, -26, -126, -320, -422b és a let-7d colonra specifikusak [123].

Intraepitélium és mikroRNS expresszió

A bélnyálkahártya különböző sejtjeinek mikroRNS expressziós mintázata eltérő. Az intesztinális epitél sejtekben a miR-146a az IRAK1-en keresztül csökkenti a bélgyulladást, újszülöttekben igazolták továbbá az intesztinális tolerancia kialakulásában betöltött szerepét is [101, 124]. Az IL-6/STAT3 jelátviteli útvonal fokozott aktivitását, az IL6/STAT3 emelkedett szintjét igazolták IBD-ben. A STAT3 és a miR-124 expressziója ellentétesen változik IBD-ben a kontroll csoporthoz képest, melyet igazoltak DNS-metiltranszferáz inhibitorral kezelt HCT-116 colon epitél sejtvonalon is [125]. HT-29 colon epitél sejteken a miR-122 a NOD2 gátlásán keresztül kivédte az LPS indukált apoptózist [44]. Caco-2 (kaukázusi colon adenocarcinoma) sejtvonalon kimutatták, hogy az occludin, mely a bélnyálkahártya epitél sejtjei közötti tight junction alkotóeleme, a miR-122 targetje. A miR-122 occludin degradációt indukálva intesztinális epiteliális tight junction károsodást okoz, növelve a bélnyálkahártya permeabilitását. A miR-122 emelkedést mutatott TNF- α kezelt CaCo2

sejtekben, és az occludin gátlásán keresztül növelte a bélnyálkahártya permeabilitását [126]. A miR-21 emelkedett szintje a Caco2 sejtvonalon a tight junction károsodását okozza, növeli az inulin permeabilitást, valamint csökkenti a RhoB szintjét, aminek szerepe ismert a bél permeabilitás megőrzésében [127]. Állatkísérletes modellben igazolták, hogy a miR-21 génkiütött egerekben a DSS-indukált colitis enyhébb, míg humán IBD-ben emelkedett az expressziója [128]. A miR-141 intesztinális epitél sejtekben a CXCL12 β gátlásán keresztül befolyásolja a leukocita migrációt. A miR-141 „overexpressziója” IL-10 génkiütött egerben csökkentette a kemokin (CXCL12 β) szintet, így nem áramlottak ki a gyulladással járó sejtek a bélalba, a kontrollnál enyhébb fokú colitis alakult ki. A miR-141 expresszió csökkenését igazolták CD-s biopsziákban a kontroll csoporthoz képest [129].

Lamina propria és mikroRNS expresszió

Izolált, humán lamina propria T-sejtjeiben TGF- β hatására fokozódik a miR-155 expressziója, ami IL-2 és IFN- γ csökkenéshez vezet [130]. Humán bélből izolált dendritikus sejtekben a NOD2 ligandok kötésének hatására nő a miR-29 expressziója, ami a pro-inflammatorikus IL-23 szint csökkentésén keresztül protektív a colitissel szemben. MiR-29 génkiütött egerekben a DSS-indukált colitis súlyosabb lefolyást mutat, illetve CD-ben a NOD2 polimorfizmusok miatt csökken a bakteriális komponensek által kiváltott miR-29 expresszió [131]. Egérből izolált Peyer-plakkokban található Treg sejtekben TGF- β hatására a miR-10a mennyisége fokozódik, ami a B-sejt lymphoma (Bcl)-6-hoz kötődve szabályozza a Treg sejtek átalakulását Th sejtekké [124]. Vad típusú és indukálható nitrogén-monoxid-szintáz (iNOS) génkiütött egerből izolált makrofágok MDP kezelését követően fokozódott a NOD2 indukált iNOS, és nitrogén-monoxid (NO) expressziója, mely végül a miR-146a emelkedéséhez vezetett [132].

A miR-143 és -145 a bél mesenchymális részében expresszálódik. Hiányuk hatására egerekben az IGF út vonal károsodása miatt a bél regenerációja zavart szenved, a simaizom és miofibroblaszt sejtek működése károsodik [133].

Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy a mikroRNS-ek sejt specifikusak, ezért fontos lenne IBD-ben releváns sejtek (pl. CD4 $^{+}$ és CD8 $^{+}$ T-, valamint epitél sejtek)

további vizsgálata, ami azonban számos metodikai nehézségbe ütközik (pl. szövetdarabból sejtszeparálás). Ennek alapján a legtöbb IBD-hez köthető vizsgálat heterogén sejtsoportot feldolgozó teljes szövet vagy vérvizsgálat, illetve állatkísérletes modell, ami nehezíti eredményeink értékelését.

2.2.3. MikroRNS-ek a gyulladós bélbetegségekben

Az utóbbi évek kutatásai számos szövet és vér mikroRNS mintázatot azonosítottak IBD-ben. A mikroRNS-ek IBD-ben betöltött funkcionális jelentőségét azonban kevés tanulmány vizsgálja. Az eddigi funkcionális mikroRNS kutatások leginkább az IBD-ben jelen levő gyulladós jelátviteli folyamatokat, bélpermeabilitás változást és a baktériumok sejtalkotóira adott választ vizsgálták. A mikroRNS-ek funkciójának és diszregulációjának pontosabb megértése közelebb vihet az IBD patomechanizmusának megértéséhez, továbbá potenciális biomarkerek és terápiás targetek kerülhetnek előtérbe.

A GWAS azonosította az autofágiában fontos szerepet játszó IRGM és ATG16L1 géneket, mint IBD hajlamosító lókuszokat. Humán intesztinális epitél sejtvonalon a NOD2 kapcsolódik az ATGL16L1-hez, így szabályozza a bakteriális clearancet [134]. Az IRGM egy olyan fehérjét kódol, amelynek az intracelluláris patogének elleni védekezésben ismert a szerepe [135]. Az ATG16L1A a miR-17 család, a miR-93, -106b és a -142-3p direkt célgénje, ami felelős az autofágia szabályozásáért. IBD-sekben emelkedett miR-93, -106b és -142-3p, és csökkent ATG16L1 expressziót találtak [136, 137]. A miR-196 magasabb expressziót mutat CD-ben, míg az IRGM szintje csökkent [135].

Fontos kérdés, hogy a diszregulált mikroRNS-ek okai, vagy következményei-e az IBD-ben zajló kórfolyamatoknak, hiszen az epigenetikai szabályozó tényezők időben dinamikusán változnak a környezeti tényezők (terápia, étrend) hatására [12]. A továbbiakban a legjelentősebb IBD-ben végzett mikroRNS-ekkel kapcsolatos klinikai kutatásokat ismertetem, melyek célkitűzései IBD-ben használható potenciális biomarkerek, prognosztikai faktorok felderítése.

Intesztinális mikroRNS-ek CD-ben

2008-ban Wu és mtsai. elsőként végeztek IBD-s betegek biopsziás mintáin mikroRNS méréseket valós idejű polimeráz láncreakcióval (RT-PCR). Munkájuk során aktív és inaktív UC-s, aktív CD-s, irritábilis bél szindrómás, mikroszkópikus colitises, fertőzések colitises és kontroll felnőttek szigma biopsziáit vizsgálták. A mikroRNS expresszió a CD (terminalis ileum és colon érintettség) csoportok között nem mutatott eltérést, azonban a kontroll csoporthoz képest emelkedett expressziót mutatott a miR-16, -21, -23b, -106a, -191, -223 és -594, míg a miR-19b és -629 szintje csökkent [123].

Fasseu és mtsai. vizsgálata alapján 23 mikroRNS (miR-9, -21, -22, -26a, -29a, -29c, -30b, -31, -34c-5p, -106a, -126, -127-3p, -130a, -133b, -146a, -146-3p, -150, -155, 181c, -196a, -324-3p, -375) expressziója emelkedett a CD-s biopsziákban a kontrollhoz képest RT-PCR technikával. Ezek közül 5 miR aktív CD-re jellemző (miR-9, -126, -130a, -181c és -375), a többi 18 az inaktív nyálkahártyában is felülexpresszált. Hat olyan mikroRNS-t (miR-196b, -199a-3p, -199b-5p, -320a, -150 és -223) azonosítottak, ami inaktív CD és UC között expressziós különbséget mutat, így segíthet a két kórkép differenciálásában [138].

Lin és munkatársai új-generációs szekvenálással 44 diszregulált mikroRNS-t azonosítottak IBD-sek mucosájában, melyek közül 9 (miR-31, -146a, -194b, -206, -216b, -424, -548e, -559 és -663) kifejezett emelkedést mutatott. Nagyobb elemszámon RT-PCR-el a miR-31, -146a, -206 és -424 mutatott magasabb expressziót IBD-sekben. A miR-31 emelkedett expressziót mutatott más, az IBD differenciáldiagnosztikájában fontos kórképekhez képest (fertőzések eredetű (*Clostridium difficile*, CMV) colitis, krónikus ischaemiás colitis) [139].

Iborra és mtsai. eltérő miR-18a, -140-3p, -328, -422a, -629, -885-5p és let-7b expressziót találtak aktív és inaktív CD-s biopsziák összehasonlítása során. Ezek közül a miR-18a, -140-3p, -629 és let-7b expressziója emelkedett aktív CD-sek biopsziájában az inaktív betegek biopsziáihoz képest [11]. Aktív CD-ben a miR-31, -106b és -196 emelkedését is igazolták [135, 136, 139]. Huang és mtsai. pedig alacsonyabb miR-141 szintet mutattak ki CD-sek szigma biopsziáiban a kontroll csoporthoz képest [129]. Schaefer és mtsai. emelkedett miR-31, -101 és -146, és csökkent miR-375 szintet találtak CD-s betegek colon biopsziáiban [137].

Intesztinális mikroRNS-ek UC-ban

Wu és mtsai. 11 UC-ban diszregulált mikroRNS-t azonosítottak, melyek közül 8 felülexpresszált (miR-16, -21, -23a, -24, -29a, -126, -195 és let-7f), 3 alulexpresszált (miR-192, -375 és -422b) a kontroll csoporthoz képest [81]. Takagi és mtsai igazolták a miR-21 és -155 expresszió emelkedését UC-s biopsziákban [140].

Fasseu és mtsai. szélesebb spektrumon vizsgálták IBD-sek mintájában a mikroRNS-eket. Hasonló mennyiségben találtak UC-s biopsziákban alul és felülexpresszált mikroRNS-eket, melyeket tovább elemeztek gyulladt és nem gyulladt mucosat vizsgálva. A 14 diszregulált mikroRNS (miR-7, -29a, -29b, -31, -126, -127, -135, -188, -196a, -215, -223, -320a, -324 és -346) közül a miR-188, -215, -320a és a -346 alulexpresszált. Kiemelték a miR-196a-t, amely specifikus a nem gyulladt UC mucosára, vagyis nem mutatott eltérő expressziót gyulladt és nem gyulladt CD-s és gyulladt UC-s mintákban [138].

A miR-31 magasabb expresszióját felnőtt UC-s biopsziákban több munkacsoport is igazolta [138, 139]. Iborra és mtsai 5 olyan mikroRNS-t (miR-650, -548a-3p, -630, -489 és -196b) találtak, amelyek segíthetnek az aktív és inaktív UC közötti differenciációban [11]. Schaefer és mtsai. a kontroll csoporthoz képest emelkedett miR-19a, -21, -31 és -101 szintet igazoltak UC-s betegek biopsziás mintáiban. Az intestinális mikroRNS-eket IBD-ben az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat: **Intesztinális mikroRNS (miR)-ek gyulladós bélbetegségeiben (IBD).** (CD: Crohn-betegség, RT-PCR: valós idejű polimeráz láncreakció, UC: colitis ulcerosa, ↑: magasabb expresszió, ↓: csökkent expresszió)

Szerző	Mérési módszer	Vizsgálati csoport	MikroRNS
Wu és mtsai.	RT-PCR	aktív CD vs. kontroll	miR-16, -21, -23b, -106a, -191, -223 és -594 ↑; miR-19b és -629 ↓
		UC vs. kontroll	miR-16, -21, -23a, -24, -29a, -126, -195 és let-7f ↑; miR-192, -375 és -422b ↓
Fasseu és mtsai.	RT-PCR	aktív CD vs. kontroll	miR-9, 126, -130a, -181c és -375 ↑
		inaktív CD vs. kontroll	miR-196b, -199a-3p, -199b-5p, -320a, -150 és -223 ↑
		UC vs. kontroll	miR-7, -29a, -29b, -31, -126, -127, -135, -196a, -223, -324; miR-188, -215, -320a és a -346 ↑
Lin és mtsai.	NGS	IBD vs. kontroll	miR-31, -146a, -194b, -206, -216b, -424, -548e, -559 és -663 ↑
	RT-PCR	IBD vs. kontroll IBD vs. fertőzőes eredetű colitis, krónikus ischémiás colitis	miR-31, -146a, -206 és -424 ↑ miR-31 ↑
Iborra és mtsai.	miRNA array, RT-PCR	aktív CD vs. inaktív CD	miR-18a, -140-3p, -629 és let-7b ↑; miR-328, -422a, -629, és -885-5p ↓
		aktív UC vs. inaktív UC	miR-650, -548a-3p, -630, -489 és -196b ↑
Huang és mtsai.	RT-PCR	CD vs. kontroll	miR-141 ↓
Schaefer és mtsai.	miRNA array, RT-PCR	CD vs. kontroll	miR-31, -101 és -146 ↑; miR-375 ↓
		UC vs. kontroll	miR-19a, -21, -31 és -101 ↑
Takagi és mtsai.	miRNA array, RT-PCR	UC vs. kontroll	miR-21 és -155 ↑

Szérum mikroRNS-ek CD-ben

A szöveti mikroRNS mintázat mellett potenciális non-invazív diagnosztikai és prognosztikai marker után kutatva számos munkacsoport vizsgálta IBD-ben a szérum mikroRNS mintázatot. Korábban azt gondolták, hogy a szérum mikroRNS mintázat egyértelműen tükrözi a szöveti mikroRNS mintázatot [141], azonban az IBD-ben végzett kutatások sok esetben ellentétes szöveti-szérum mikroRNS mintázatot tártak fel.

Iborra és munkatársai 9 aktív és 9 inaktív CD-s beteg szérumát hasonlították össze egészséges kontrollok szérumával. A kontrolltól eltérően expresszált 21 mikroRNS-t azonosítottak aktív és inaktív CD-sek szérumában, melyek közül 14 UC-ban is eltérő expressziót mutatott. Eredményeik alapján a miR-27a, -140-3p, -140-5p, -16 és -195 szintje emelkedett, a miR-877 szintje csökkent CD-ben a kontroll csoporthoz képest [11]. Schaefer és mtsai. csökkent miR-21, -31, -146a és -155 expressziót találtak CD-s betegek szérumában a kontroll csoporthoz képest, míg a miR-101 és -375 expressziója nőtt [137].

Wu és mtsai. emelkedett miR-199a-5p, -362-3p, -340 és -532-3p, és csökkent miR-149 szintet találtak CD-s betegek szérumában a kontroll csoporthoz képest, Crohn ileitises és Crohn colitis-es betegek mintái között azonban nem volt különbség. A miR-199a-5p, -362-3p és -532-3p szintje emelkedett aktív CD-s betegek szérum mintáiban, az inaktív betegek szérumában azonban nem volt különbség ezen mikroRNS-ek szintjében a kontroll csoporthoz képest. A miR-340 és -149 az aktív és inaktív csoportokban is eltérő expressziót mutatott [142].

Paraskevi és mtsai. 290 CD-s és egészséges kontroll szérumot vizsgált, mely során emelkedett miR-16, -23a, -29a, -106a, -107, -126, -191, -199a-5p, -200c, -362-3p és -532-3p expressziót igazoltak [143].

Szérum mikroRNS-ek UC-ban

Wu és mtsai. 9 UC-ra specifikus mikroRNS-t (miR-28-5p, -151-5p, -103-2, -199a-5p, -340, -362-3p, -532-3p, -505) azonosítottak szérum mintákban, melyek közül a miR-505 az aktív és inaktív UC-ban is alacsonyabb expressziót mutatott a kontroll csoporthoz képest. A miR-103-2 és -362-3p mutatta a legnagyobb expresszió növekedést az aktív és inaktív UC-s betegek szérumában a kontroll csoporthoz képest. A miR-28-5p, -151-5p, -199a, és -340 magasabb expressziót mutatott az aktív UC-s betegekben, az inaktív UC-s betegekben viszont nem volt emelkedés ezen miR-ek mennyiségében a kontroll csoporthoz képest [142].

Iborra és mtsai. 39 UC-ban eltérő expressziót mutató mikroRNS-t azonosítottak, melyek közül 25 volt UC-ra specifikus [11]. Chen és mtsai. szteroid szenzitív és

rezisztens UC-s betegek mintáit hasonlították össze, a miR-195 expressziója a szteroid szenzitív csoportban emelkedett volt [144].

Schaefer és mtsai. a biopsziákban kapott eredményekkel szemben csökkent miR-21, -31 és -146a és emelkedett miR-19a, -101, -142-5p, -223, -375 és -494 expressziót találtak az UC-s szérumban a kontroll csoporthoz képest [137]. A szérumban mikroRNS-eket IBD-ben a 2. táblázat foglalja össze.

2. táblázat: **Szérumban mikroRNS (miR)-ek gyulladással járó bélbetegségekben (IBD).** (CD: Crohn-betegség, RT-PCR: valós idejű polimeráz láncreakció, UC: colitis ulcerosa, ↑: magasabb expresszió, ↓: csökkent expresszió)

Szerző	Mérési módszer	Vizsgálati csoport	MikroRNS
Iborra és mtsai.	miRNA array, RT-PCR	CD vs. kontroll	miR-27a, -140-3p, -140-5p, -16 és -195 ↑; miR-877 ↓
Paraskevi és mtsai.	RT-PCR	CD vs. kontroll	miR-16, -23a, -29a, -106a, -107, -126, -191, -199a-5p, -200c, -362-3p és -532-3p ↑
Schaefer és mtsai.	miRNA array, RT-PCR	CD vs. kontroll	miR-101 és -375 ↑; miR-21, -31, -146a és -155 ↓
		UC vs. kontroll	miR-19a, -101, -142-5p, -223, -375 és -494 ↑; miR-21, -31 és -146a ↓
Wu és mtsai.	RT-PCR	CD vs. kontroll	miR-199a-5p, -362-3p, -340 és -532-3p ↑; miR-149 ↓
		aktív CD vs. kontroll	miR-199a-5p, -362-3p és -532-3p ↑
		aktív CD vs. inaktív CD	miR-340 és -149 ↑
		UC vs. kontroll	miR-28-5p, -151-5p, -103-2, -199a-5p, -340, -362-3p, -532-3p, -505 ↑
		aktív UC vs. kontroll	miR-28-5p, -151-5p, -199a, és -340 ↑
Chen és mtsai.		szteroid rezisztens UC vs. szteroid szenzitív UC	miR-195 ↑

MikroRNS-ek gyermekkori IBD-ben

Az első gyermekkori IBD-ben végzett mikroRNS vizsgálatot Zahm és mtsai. közölték 2011-ben. 46 CD-s gyermek szérumban mintáját hasonlították össze 32 egészséges kontrollal. A miR-16, -20a, -21, -30e, -106a, -195, -140, let-7b, -192, -484 és -93 szintje volt emelkedett CD-s gyermekekben a kontroll csoporthoz képest. Ezek közül a miR-16 és -484 igen jó szenzitivitású és specificitású biomarkernek bizonyult. Terápia hatására a miR-195 és -484 szintje lecsökkent, expressziójuk azonban nem korrelált az aktivitási indexszel [145]. Rectális mintákban 21 mikroRNS-t azonosítottak,

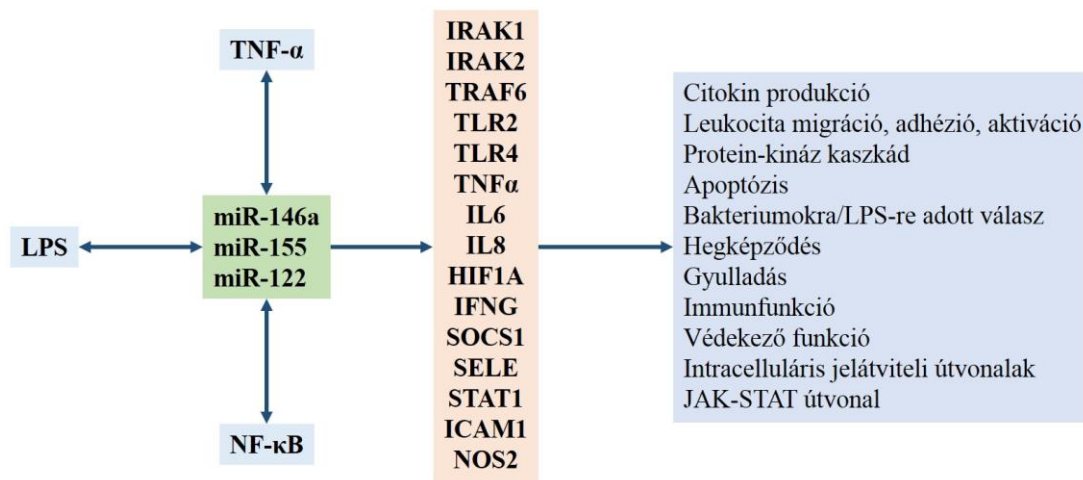
amik eltérően expresszázódtak UC, vastagbél érintettségű CD és kontroll csoportban. A miR-142-3p, miR-146a, miR-21 és let-7i szintje nőtt, a miR-192, miR-194, miR-200b és miR-375 szintje csökkent az UC-s biopsziákban, a miR-21 szintje nőtt, míg a miR-375 szintje csökkent expressziót mutatott CD-sekben a kontroll csoporthoz képest. A fenti említett, eltérően expresszázó mikroRNS-ek közül gyermekkori IBD-ben a miR-21 és -142-3p mutatja a legnagyobb különbséget a kontroll csoporthoz képest. A miR-24 eltérő szint mutatott az IBD altípusai között (szenzitivitás: 83,3%, specificitás: 85,7%), így a későbbiekben potenciális differenciáldiagnosztikai marker lehet. A 21 rectális mintákban azonosított mikroRNS közül 3 (miR-21, -142-3p és -192) szintje a szérumban is magasabb expressziót mutatott, azonban ezek közül egyik sem különbözött az IBD altípusai között [146]. A miR-124 és -4284 szintje csökkent gyermekkori UC-ban [125, 147] (3. táblázat).

3. táblázat: **Mikro-RNS-ek gyermekkori gyulladásoos bélbetegségekben (IBD).** (CD: Crohn-betegség, RT-PCR: valós idejű polimeráz láncreakció, UC: colitis ulcerosa, ↑: magasabb expresszió, ↓: csökkent expresszió)

Szerző	Mérési módszer	Minta	Vizsgálati csoport	MikroRNS
Zahm és mtsai.	RT-PCR	szérum	CD vs. kontroll	miR-16, -20a, -21, -30e, -106a, -195, -140, let-7b, -192, -484 és -93 ↑
Zahm és mtsai.	low density array, RT-PCR	biopszia	UC vs. kontroll	miR-142-3p, -146a, -21 és let-7i ↑; miR-192, -194, -200b és -375 ↓
			CD vs. kontroll	miR-21 ↑; miR-375 ↓
			CD vs. UC	miR-24 ↓
Koukos és mtsai.	miRNA array, RT-PCR	biopszia	UC vs. kontroll	miR-124 és -4284 ↓

2.2.4. MiR-146a, -155 és -122 szerepe IBD-ben

A gyulladásos válasz regulációjában több mikroRNS is érintett lehet, a következőkben azonban három kiemelt fontosságú, IBD-ben eltérő expressziót mutató mikroRNS-t emelek ki. A miR-146a, -155 és -122 számos olyan célgént befolyásol, melyek szerepet játszanak a veleszületett és a szerzett immunitás (gyulladásos válasz, citokin produkció) regulációjában, és így számos immunmediált kórkép patomechanizmusában amelyeket az előzőekben tárgyaltam. A célgének és azok funkciói az 5. ábrán láthatók.

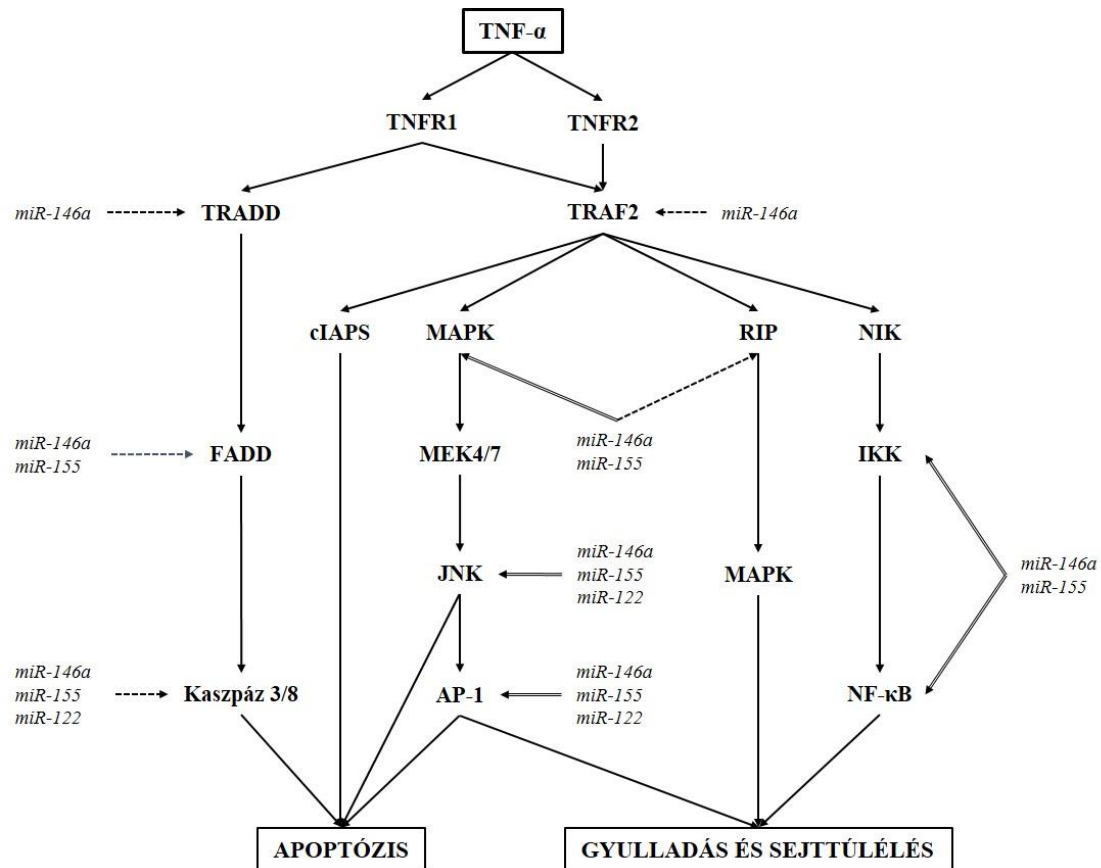


5. ábra: A *miR-146a*, *-155* és *-122* szerepe. A *miR-146a*, *-155* és *-122* célgénjei számos olyan biológiai folyamatot szabályoznak, melyek szerepet játszanak a gyulladással járó betegségek patomechanizmusában (LPS: lipopoliszacharid, NF-κB: Nuclear factor kappa B, IRAK1 és 2: interleukin-1 receptor asszociált kináz-1 és -2, TRAF6: TNF receptor asszociált faktor-6, TLR2 és 4: Toll-like receptor 2 és 4, TNFα: tumor nekrosis faktor-α, IL6 és 8: interleukin-6 és -8, HIF1A: hipoxia indukált faktor 1-α, IFNG: interferon-γ, SOCS1: citokin szignaling szupresszor 1, SELE: E-szelektin, STAT1: szignál transzducer és transzkripciós aktivátor 1, ICAM1: intracelluláris adhézios molekula 1, NOS2: nitrit oxid szintáz2)

2.2.5. A miR-146a, -155 és -122 szerepe a TNF- α jelátviteli útvonalban

Számos vizsgálat igazolta a legfőképp aktivált T-sejtek által termelt TNF- α fokozott produkcióját IBD-sek gyulladt nyálkahártyájában [76-80]. A CD-ben jellemző Th1 citokin profil gyulladáshoz vezető mediátorai közül a TNF- α -nak kiemelkedő jelentősége van. Indukálja az MHCII antigének expresszióját, serkenti a pro-inflammatorikus citokinek és a sejtfelszíni adhéziós molekulák termelődését, továbbá antiapoptotikus hatású. A TNF- α IBD patomechanizmusában betöltött központi szerepét a konvencionális terápiára nem reagáló esetekben alkalmazott TNF- α gátlók terápiás hatékonysága jelezi [35]. Számos vizsgálat igazolta a miR-146a, -155 és -122 TNF- α jelátviteli útvonalban betöltött szerepét (6. ábra) [148-168].

A miR-146a közvetlenül szabályozza a TNFR1 és -2 útvonalon keresztül aktiválódó TNF halál ligand-ot (TRADD) és a TNF receptor asszociált faktort (TRAF2) [161, 163]. A TRADD aktiválja a Fas-hoz kötődő halál ligandot (FADD) és a kaszpáz 3/8-at, melyek részt vesznek az apoptózis regulálásában. A FADD a miR-146a és -155, a kaszpáz 3/8 ezeken kívül a miR-122 direkt targetje [151, 153, 155, 158, 159, 161, 167, 169]. A TRAF2 indukált MAPK jelátviteli út apoptózishoz és gyulladáshoz vezető citokinek termeléséhez vezet. A MAPK útvonal részei a c-Jun N-terminális kináz (JNK) és az aktivátor protein 1 (AP-1), melyek célgenjeit a miR-146a, -155 és -122 is befolyásolja [150, 151, 154, 157, 160, 164, 166, 168, 170]. Fontos továbbá megemlíteni, hogy bár a miR-146a és -155 közvetlenül szabályozza a TNF- α és az NF- κ B útvonalat is, az nem pontosan tisztázott, hogy a TNF- α milyen módon befolyásolja a miR-146a, -155 és -122 expresszióját.



6. ábra.: A *miR-146a*, *-155* és *-122* szerepe a *TNF-α* jelátviteli útvonalban.

A *TNF-α* egy fontos pro-inflamatorikus citokin, amelynek ismert az IBD patomechanizmusában betöltött központi szerepe. A *miR-146a*, *-155* és *-122* a *TNF-α* útvonal fontos szabályozói, amelyek képesek apoptózist, gyulladás indukálni, regulálják a sejtülélést. Az ábrán látható adatok a MiRTarBase adatbázis adatain alapulnak, kiegészítve a legfrissebb nemzetközi publikációkból származó információkkal. A szaggatott nyilak az erős evidenciájú metodikákkal igazolt direkt targeteket (*Luciferase assay*, *MiR-mimic*, *MiR-inhibitor* vizsgálatok), a dupla vonalú nyilak a direkt és indirekt targeteket jelzik. (*TNF-α*: tumor nekrosis faktor- α ; *TNFR1*, 2: *TNF* receptor 1, 2; *TRADD*: *TNF* receptor 1-es típusához asszociált halál domain protein; *FADD*: *Fas*-hoz asszociált halál domain; *TRAF2*: *TNF* receptorhoz asszociált 2-es faktor; *cIAPS*: apoptózis celluláris inhibítora; *MAP3K1*: mitogén-aktivált protein kináz kináz kináz 1; *MEK4/7*: mitogén-aktivált protein kináz kináz kináz 4/7; *JNK*: *c-Jun* N-terminális kináz; *AP1*: aktivátor protein 1; *RIP*: Receptor-kölcsönhatás protein; *NIK*: *NF-κB*-indukáló kináz; *IKK*: *NF-κB* inhibitor kináz)

2.2.4. MikroRNS-ek terápiás vonatkozásai

A mikroRNS-ek terápiás felhasználásának két fő iránya: 1.: a mikroRNS antagonisták, 2.: mimikrik használata. Fiziológias körülmények között a mikroRNS-ek megnövekedett expressziója csökkenti a célgének mennyiségét. Amennyiben a célgénnek védő funkciója van, a mikroRNS „overexpressziója” miatt kialakuló csökkenő célgén mennyiséget mikroRNS antagonistákkal előzhetjük meg. Ennek ellenkezője, ha egy mikroRNS alulexpresszált, minek következtében a pro-inflammatórikus célgén felszabadul a gátlás alól, a gyulladásos folyamatok kerülnek előtérbe. Ennek terápiás megoldása lehet a mikroRNS mimikrik alkalmazása.

Jelenleg a miR-122 a legismertebb mikroRNS, antagonistája fázis II vizsgálatban (Miravirsen®) van a hepatitis-C vírus (HCV) fertőzés terápiájában. A miR-122 atípusosan kötődik a májsejtekben a HCV 5' UTR régiójához, és stimulálja a vírus replikációját. A miR-122 működésének gátlásán keresztül az antiszenz oligonukleotid Miravirsen® képes redukálni a vírus szaporodását, így új, hatékony antivirális terápiás szer lehet [171].

A mikroRNS-ek terápiás felhasználását más kórképek kapcsán is vizsgálják, a miokardiális fibroblasztokra ható miR-21-et szívelégtelenségben [172], az onkomiR-155 gátlását lymphómában tanulmányozzák [173], illetve különböző tumorokban, kardiovaszkuláris-, metabolikus betegségekben, ateroszklerózisban vizsgálják a potenciális terápiás lehetőségeket [174, 175].

A mikroRNS terápiás felhasználása esetén kiemelt jelentőségű a célhelyre juttatás formája mikrovezikulában vagy nanopartikulumokban [173], valamint a sejt- és szövetspecifitás [174].

Mindezek alapján az IBD-ben ismerten diszregulált mikroRNS-ek potenciális terápiás targetek lehetnek, a cél pedig különböző anti-inflammatorikus és anti-fibrotikus készítmények fejlesztése.

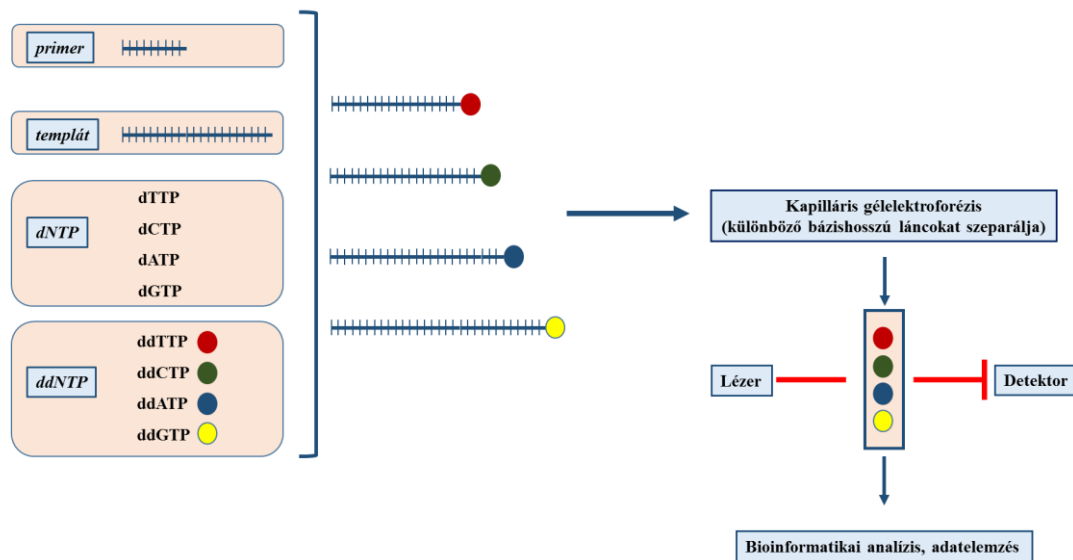
2.3. Szekvenálás története, fejlődése

A DNS szekvenálás és a bioinformatika fejlődése a „*Human Microbiome Project*” (2007-2012) segítségével lehetővé tette az emberi test (bőr, orr-száj nyálkahártya, gasztrointesztinális traktus, urogenitális rendszer) mikrobiális összetételének meghatározását. A kutatás következő lépése az eddigi eredmények alapján egy integrált adatbázis létrehozása a betegségekhez társuló, a mikrobiomban bekövetkező változásokról (2013-2015) [65, 66].

Az utóbbi években a szekvenálás metodikája is jelentősen fejlődött. A teljes humán genom feltérképezése („*Human Genome Project*”) a hagyományos, automatizált Sanger-módszer segítségével 10 évet vett igénybe. Az automata fluoreszcens szekvenálás kidolgozása és a szekvenátorok megjelenése gyorsította a hagyományos, izotópos technikát igénylő, láncterminációs Sanger-féle szekvenálást, mely négy külön reakcióelegyet igényelt. Az automata fluoreszcens szekvenálás a Sanger-módszer alapján történik egy reakcióelegyben. A módszer alapja a klasszikus polimeráz-láncreakció és a kapilláris gélelektroforézis. A méréshez szükséges az egyszálú DNS (RNS esetén reverztranszkripció segítségével állítható elő), az univerzális primer, a DNS-polimeráz, a hagyományos, illetve a módosított, különböző színekkel jelölt nukleotidok. A lánchosszabbítás során a módosított nukleotidok véletlenszerű bekötődése megállítja a komplementer DNS szál szintézisét (irreverzibilis láncterminálás), ennek eredménye különböző hosszúságú, jelölt nukleotidot tartalmazó DNS darabok létrejötte. Az így kapott szakaszokat gélelektroforézis segítségével méret alapján szeparálják. A különböző méretű termékekbe beépülő utolsó nukleotidot az általa kibocsájtott fluoreszcens fény hullámhossza alapján határozzák meg (7. ábra).

Mára az új-generációs szekvenálással (next-generation sequencing: NGS) ez a metodika nagyságrendekkel gyorsabban, olcsóbban képes elvégezni a feladatot. Az NGS metodika a hagyományos Sanger-módszer alapelvein nyugszik, azonban elhagyja a lassú kapilláris elektroforézist, ezáltal lehetőség nyílt több millió párhuzamosan futó DNS-szál szekvenálásra. Az NGS technika számos metodikát tartalmaz, többféleképpen valósulhat meg a templát preparálás, szekvenálás, leképezés és adat elemzés is. A két fő típusa az amplifikált (szekvenálás szintézissel vagy ligációval) és az egy-molekulás szekvenálás. A kereskedelmi forgalomban főleg a Roche (piroszekvenálás), Illumina

(reverzibilis terminációs szekvenálás szintézissel), Solid (ligálás) és az Ion Torrent (ion félvezető) által forgalmazott eszközök terjedtek el. A kapott eredményeket a nyilvános adatbázisok és intenzív bioinformatikai analízis segítségével tudjuk elemezni. Továbbá az eredmények értelmezését segíti a „fold change” (FC) érték használata, ami megadja, két génexpresszió változását egységre vonatkoztatva [176].



7. ábra: A **Sanger-féle szekvenálás folyamatábrája**. A szekvenálni kívánt kettős szálú DNS-t denaturálják, majd a leolvasni kívánt templát szálhoz komplementer primereket (dNTP) párosítanak. A lánchosszabbítás során a módosított nukleotidok (ddNTP) véletlenszerű bekötődése megállítja a komplementer DNS szál szintézisét. A DNS-láncok méret szerinti elválasztása kapilláris gélelektroforézissel történik.

3. Célkitűzések

A lokális mikroRNS profil meghatározása és annak további elemzése közelebb vihet az IBD patomechanizmusának pontosabb megértéséhez, potenciális terápiás targetek és differenciáldiagnosztikai markerek kerülhetnek előtérbe.

A mikroRNS-ek gyermekkori IBD-ben betöltött szerepével kapcsolatban azonban jelenleg kevés adat áll rendelkezésre, ezért munkacsoportunk mikroRNS vizsgálatokat végzett IBD-s gyermekek biopsziás mintáin.

1/A.: Célul tűztük ki az IBD-s gyermekek fagyasztott biopsziás mintáiban a mikroRNS profil meghatározását új-generációs szekvenálással, majd valós idejű polimeráz láncreakcióval (RT-PCR).

1/B.: Az érintett mikroRNS-ek és célgénjeik biológiai funkcióinak meghatározását terveztük.

2.: A klinikai gyakorlatban azonban a formalinban-fixált, paraffinba ágyazott biopsziás minták könnyebben elérhetőek, ezért kiválasztottunk három mikroRNS-t, melyek expresszióját megmértük formalinban-fixált, paraffinba ágyazott és fagyasztott biopsziákon egyaránt, hogy megvizsgáljuk, vajon a konzerválás módja befolyásolja-e a mikroRNS expresszió változását.

3.: Korábbi tanulmányokból ismert, hogy a TNF- α -indukálta jelátviteli útvonalat a miR-146a, -155 és -122 számos ponton befolyásolhatja. Tekintettel a TNF- α IBD-ben betöltött központi szerepére, megvizsgáltam a miR-146a, -155 és -122 expressziójára kifejtett hatását HT-29 colon epitél sejtekben.

4. Módszerek

4.1. Betegek

A vizsgálatba bevont CD, UC és nem colitises kontroll gyermekek a Semmelweis Egyetem I. sz. Gyermekgyógyászati Klinikán kezelt és gondozott betegek. A vizsgálatot a Semmelweis Egyetem Egészségügyi Tudományos Tanácsa engedélyezte (TUKEB No.: 10408/2012).

A betegeket a Portói kritériumoknak megfelelően klinikai és a laboratóriumi paraméterek, továbbá az endoszkópos, és szövettani vizsgálat alapján diagnosztizáltuk. A betegség aktivitását PCDAI és PUCAI aktivitási indexekkel mértük. A vezető klinikai tünetek a súlyvesztés, hasi fájdalom, hasmenés, véres széklet, anémia és perianális fisztulák voltak. A kontroll, nem-colitises biopsziák olyan gyermekekből származnak, akiknek diagnosztikus endoszkópos vizsgálatára véres széklet, krónikus abdominális fájdalom, súlyvesztés, polip, refluxbetegség, ill. Meckel-divertikulum gyanúja miatt került sor, de a nyálkahártya gyulladás fennállását mind makroszkóposan, mind mikroszkóposan kizártuk. Mintáink formalinban-fixált, paraffinba ágyazott és fagyasztott, -80°C-on tárolt colon biopsziák.

A mikroRNS profil meghatározásához új-generációs szekvenálásra 4 terápia naív CD gyermek makroszkóposan kóros és ép fagyasztott biopsziás mintáit (CD ép: n=4, CD kóros: n=4) küldtük el, míg kontrollként nem colitises gyermekek (n=4) mintái szolgálták (4. táblázat/A). Az új-generációs szekvenálás során kapott mikroRNS-ek közül 18 mikroRNS-t nagyobb elemszámon vizsgáltunk, „fold change” értékük, illetve irodalmi adatok alapján. A nagyobb elemszámon történő validálást makroszkóposan ép (CD ép: n=10) és kóros (CD kóros: n=15) CD, makroszkóposan kóros UC (UC: n=10) és kontroll (K: n=11) gyermekek mintáin végeztük (4. táblázat/B). A formalinban-fixált, paraffinba ágyazott biopsziák makroszkóposan ép (CD ép: n=12) és kóros (CD kóros: n=12) CD-s és kontroll (K: n=16) gyermekek mintái. Összehasonlításként fagyasztott biopsziás minták makroszkóposan ép (CD ép: n=14) és kóros (CD kóros: n=24) CD-s, makroszkóposan kóros UC-s (UC: n=10) és kontrollok (K: n=23) mintái szolgálták (5. táblázat). A makroszkóposan ép és kóros biopsziás minták egyazon

gyermektől származtak, illetve elemszámnövelés céljából további makroszkóposan kóros biopsziákat használtunk fel.

4. táblázat.: **Klinikai jellemzői és laboratóriumi paraméterei a szekvenálásba (A) és PCR validálásba (B) bevont csoportoknak.** BMI: testtömegindex; CRP: C-reaktív protein; PCDAI: gyermekkori Crohn-betegség aktivitási index; TVK: teljes vaskötő kapacitás; * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$ vs. Kontroll, # $p \leq 0.05$ vs. UC

§: a nem-gyulladt nyálkahártya minták a gyulladt nyálkahártyájú gyermekektől származnak (n=10).

β: 5-ASA, szteroid és azatioprin terápiát kaptak

A	Kontroll	CD
n	4	4
Kor (év)	11,38±2,98	10,88±2,66
BMI (kg/m ²)	18,66±1,9	16,98±1,23
PCDAI (PUCAI)	-	18,75±2,98
Vas (umol/l)	10,75±2,5	4,25±1,25
TVK (umol/l)	62,5±2,99	46,5±5,19*
Albumin (g/l)	51,75±4,40	36,25±3,35*
Haemoglobin (g/l)	134,3±7,76	107,5±7,24*
Haematokrit (%)	0,39±0,02	0,35±0,02
Trombocita (Giga/l)	325,8±21,1	473±69,01
CRP (mg/l)	1,28±0,7	25,58±11,53*
Terápia	-	-

B	Kontroll	CD [§]	UC
n	11	15	10
Kor (év)	5,18±0,99	12,8±1,26***	11,45±1,77*
BMI (kg/m ²)	17,22±1,27	16,82±0,9014	17,97±1,15
PCDAI/PUCAI	-	29,5±3,45****,#	42,5±4,43
Vas (umol/l)	15,6±2,04	3,73±1,04#	5,78±1,61***
TVK (umol/l)	56,5±1,56	49,62±4,25	60,56±3,86
Albumin (g/l)	47,6±1,99	36,5±1,74***	41,6±2,237
Haemoglobin (g/l)	124,7±1,63	101,8±5,52*	110,7±7,51
Haematokrit (%)	0,36±0,01	0,31±0,01*	0,33±0,02
Trombocita (Giga/l)	340,8±25,62	503±54,73*	422,1±44,07
CRP (mg/l)	1,33±0,64	50,63±22,31*	6,01±1,82
Terápia	0	1 ^β	1 ^β

5. táblázat.: A formalinban fixált, paraffinba ágyazott (A) és a fagyasztott (B) biopsziás csoportok klinikai jellemzői és laboratóriumi paramétereik. BMI: testtömegindex; CRP: C-reaktív protein; PCDAI: gyermekkori Crohn-betegség aktivitási index; TVK: teljes vaskötő kapacitás; * $p \leq 0.05$, ** ≤ 0.01 , p*** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$ vs. Kontroll, # $p \leq 0.05$ vs. UC
§: a nem-gyulladt nyálkahártya minták a gyulladt nyálkahártyájú CD gyermekektől származnak (n=14).

A	Kontroll	CD [§]
n	16	12
Kor (év)	10,56±1,36	14,73±0,58*
BMI (kg/m ²)	19,87±1,78	17,76±1,47
PCDAI	-	33,89±5,27
Vas (umol/l)	17,23±1,415	10,15±2,33*
Albumin (g/l)	46,42±0,7732	40,32±1,53**
Trombocita (Giga/l)	340,6±23,78	504,7±33,88****
CRP (mg/l)	1,15±0,63	33,54±9,02*

B	Kontroll	CD _{gyulladt}	CD _{ép}	UC
n	23	24	14	10
Kor (év)	8,57±1,09	12,92±1,13	12,86±1,6	11,8±1,75
BMI (kg/m ²)	16,88±0,86	16,28±0,78	17,53±0,82	18,38±1,04
PCDAI/PUCAI	-	26,20±2,98****	26,35±4,22****	36,00±4,00****
Vas (umol/l)	16,52±1,45	5,29±0,92****	6,57±1,29****	5,70±1,89****
Albumin (g/l)	46,39±0,56	38,35±1,28****	39,86±1,69**	41,60±2,48
Trombocita (Giga/l)	368,3±17,74	538,3±37,79**	513,8±52,46*	486,1±38,15
CRP (mg/l)	0,5167±0,17	40,89±15,32*	27,95±9,18	10,41±1,64

4.2. Colon epítél sejtek TNF- α kezelése

A humán colon epítél (HT-29) sejteket 10%-os borjú savóval kiegészített McCoy táptalajon (1%-os penicillin és streptomycin) tenyésztettük standard körülmények között (37°C, 5% CO₂/95%-os levegő). A sejttenyészetet 10 ng/ml koncentrációjú rekombináns humán TNF- α -val (R&D Systems, Minneapolis, MN) kezeltük 24 órán keresztül. A kontroll sejteket ugyanilyen körülmények között, szintén 24 óráig kezeltük TNF- α mentes vehikulummal (foszfát alapú puffer, PBS).

4.3. RNS izoláció

A frissen fagyasztott colon minták és a HT-29 sejtek RNS izolálásához Quick-RNA Miniprep Isolation Kit-et (Zymo Research, Irvine, CA) használtunk, RNS eluáló oszloppal és a gyártó által biztosított DNase felhasználásával.

Formalinban-fixált, paraffinba ágyazott colon mintákból, RNeasy minikit segítségével (Qiagen, Düsseldorf, Germany) izoláltuk a teljes RNS-t. A DNS-t enzimatis emésztéssel távolítottuk el DNase (Ambion, Life Sciences, Foster City, CA, USA) felhasználásával. Végül a koncentrált RNS-t RNeasy MinElute spin oszlopokkal (Qiagen, Düsseldorf, Germany) eluáltuk.

4.4. Új-generációs szekvenálás

A cDNS könyvtár készítés 1 ug teljes RNS alapján történt TruSeq Small RNA Sample Preparation Kit segítségével (Illumina, San Diego, CA, USA). A fragmentumok méret és molalitás szerinti eloszlásához BioAnalyzer DNA1000 chip-et használtunk (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). A kis RNS könyvtár 10 nM-ra lett beállítva, majd a cluster képzés TruSeq SR Cluster kit v3-cBot-HS kit-el történt, cBot eszközön. 50 bp hosszú szekvenálás az UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Ltd. szolgáltató által (Debrecen, Hungary) Illumina HiScan SQ eszközön (Illumina, San Diego, CA, USA) történt.

4.5. Reverz transzkripció és valós idejű polimeráz láncreakció

A mikroRNS-ek mérése során az izolált RNS-ekből a reverz transzkripciót az általunk választott mikroRNS-ekre specifikus primerekkel (TaqMan Assay, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit-tel (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) végeztük a gyártó előírásának megfelelően. A reverz transzkripciónál 10 ng RNS-t használtunk fel 7,5 uL össztérfogatban. A minták egyedi relatív mikroRNS mennyiségét TaqMan MicroRNA Assay (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) felhasználásával, RT-PCR-el mértük. Standardként U6-ot alkalmaztunk (8. ábra). Az általunk vizsgált mikroRNS-ek és a hozzájuk rendelt Assay azonosítókat a 6. táblázatban tüntettem fel.

Az mRNS-ek mérésekor a reverz transzkripció Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) felhasználásával történt 20 uL össztérfogatban. A TNF- α mRNS mennyiséget LC480 SyberGreen Master Mix (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) és TNF- α specifikus primer (forward: 5' GGC TCC AGG CGG TGC TTG TTCC 3', reverse: 5' TGG CCC GGC GGT TCA GC) (IDT, Coralville, IA) segítségével mértük. Referenciaként RPLP0 mRNS (forward: 5' GGG GGA ATG TGG GCT TTG TGTT 3', reverse: 5' GGT GCC CCT GGA GAT TTT AGT GGT 3') mennyiséget mértük. A felhasznált primerek szekvenciáját a 7. táblázat tartalmazza, a metodikát a 8. ábrán összegeztem. Az RT-PCR-eket LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) típusú géppel végeztük.

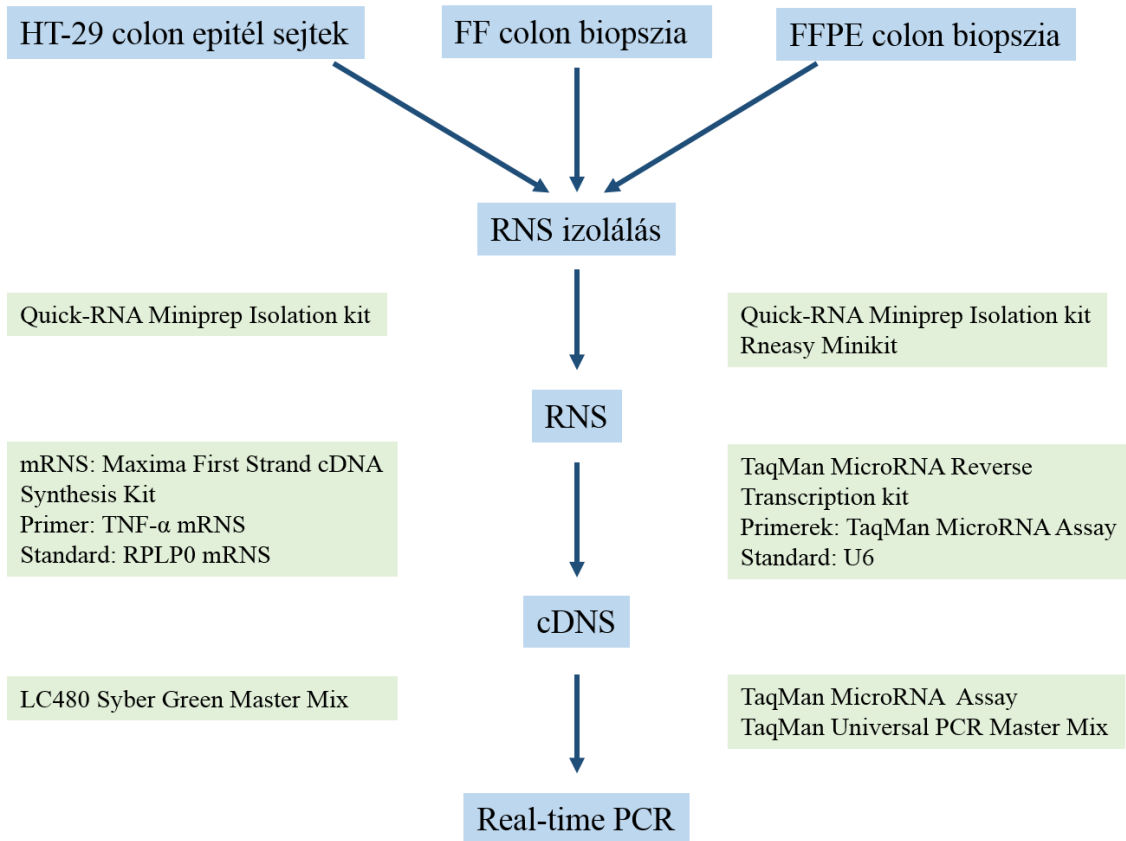
A relatív expressziót $2^{-\Delta C_q}$ képlettel számítottam ki.

6. táblázat: *Az általunk vizsgált mikroRNS-ek és a hozzájuk rendelt Assay azonosítók (ID)*

mikroRNS	Assay ID	mikroRNS	Assay ID	mikroRNS	Assay ID
miR-18a	002422	miR-122	002245	miR-150	000473
miR-20a	000580	miR-125a	002198	miR-155	002623
miR-21	000397	mir-126	002228	miR-185	002271
mir-31	002279	miR-141	000463	miR-204	000508
miR-99a	000435	miR-142-3p	000464	miR-221	000524
miR-99b	000436	miR-142-5p	002248	miR-223	002295
miR-100	000437	miR-146a	000468	U6	001973

7. táblázat: *mRNS mérés során használt primerek szekvenciája és karakterisztikája*

Gén	Szekvencia	Bekötési lépés beállításai
TNF-α (forward)	5' GGC TCC AGG CGG TGC TTG TTCC 3'	95°C 5" 63°C 5"
TNF-α (reverse)	5' TGG CCC GGC GGT TCA GC 3'	72°C 7" 87°C 1"
RPLP0 (forward)	5' GGG GGA ATG TGG GCT TTG TGTT 3'	95°C 5" 59°C 5"
RPLP0 (reverse)	5' GGT GCC CCT GGA GAT TTT AGT GGT 3'	72°C 7"

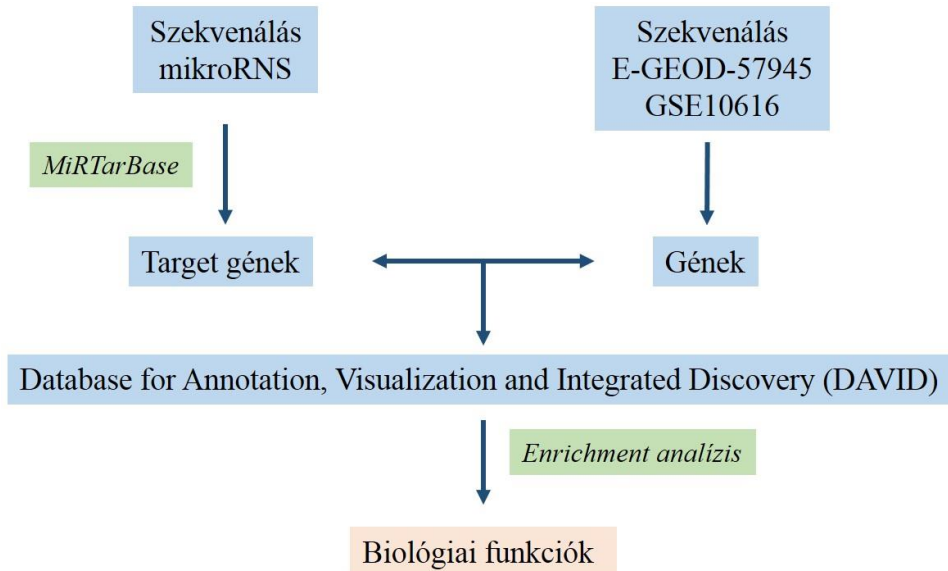


8. ábra: Az **mRNS** és a **mikroRNS** expresszió mérés: a formalinban-fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) (Rneasy Minikit), a frissen fagyasztott (FF) biopsziákból és az epitél sejtekből (Quick-RNA Miniprep Isolation Kit) teljes RNS-t izoláltunk, majd a kapott RNS-t mikroRNS-ekre specifikus primerekkel, illetve univerzális primerrel complemeter (c)DNS-sé írtuk át. A minták egyedi mikroRNS és mRNS mennyiségét RT-PCR segítségével határoztuk meg.

4.6. MikroRNS célgének keresése in silico, target predikció

Az új-generációs szekvenálással szignifikánsnak talált mikroRNS-ek potenciális célgénjeit a MiRTarBase adatbázis segítségével határoztuk meg, ezen belül is a szigorúan kísérletes úton validált (Western blot, reporter assay, stb.) célgéneket vettük figyelembe (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>) [177].

A nemzetközileg elérhető, nyilvános ArrayExpress adatbázisból kontroll, CD és UC gyermekek biopsziás mintáinak RNAseq adatait elemeztük: E-GEOD-57945 [178] és GSE10616 [179]. Az új-generációs szekvenálás során kapott adatokat t-teszttel hasonlítottuk össze, és azokat a géneket vettük figyelembe, amelyek „fold change” értéke $\pm 1,5$ feletti. Az így kapott közös génhalmazt, az IBD-ben jellegzetes mikroRNS-ek IBD-ben releváns célgénjeit tovább elemeztük. A közös génhalmazon Gene Ontology (GO) analízist végeztünk a Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID, <https://david.ncifcrf.gov>) [180, 181] segítségével. Azokat a GO kategóriákat vettük figyelembe, amelyek p értéke meghaladta a 0,05-t a Benjamini-Hochberg módszer szerinti többszörös korrekciós teszt alapján. A kapott GO kategóriákat tovább szűrtük az evidencia kódjuk alapján, azokat választottuk ki, amelyek kísérletes úton igazoltak (Inferred from Direct Assay (IDA), Inferred from Mutant Phenotype (IMP), Inferred from Expression Pattern (IEP)). A REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>) szoftver képes összefoglalni, egységesíteni, csoportba rendezni a GO kategóriákat, egy algoritmus segítségével pedig a funkcionális redundanciát csökkenti a hasonlósági mértékük (Resink) alapján [182]. Az így kapott kapcsolatokat a Cytoscape 3.2.1 szoftver segítségével ábráztuk (www.cytoscape.org) [183]. A folyamatot az 9. ábrán tüntettem fel.



9. ábra: A **bioinformatikai analízis folyamata**: Az új-generációs szekvenálás eredményeként szignifikánsan változó mikroRNS-ek célgénjeit összevetettük CD-s és UC-s gyermekek biopsziás mintáiból készült teljes transzkriptom szekvenálás során kapott génekkel. A közös halmazon „enrichment” analízist végeztünk, így megkaptuk az IBD-ben érintett mikroRNS-ek IBD szempontjából releváns célgénjeinek biológiai funkcióját.

4.7. Statisztika

A statisztikai analízishez GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) és MedCalc (MedCalc Software, Ostend, Belgium) statisztikai programot használtam. Az adatokat Mann-Whitney U-teszttel, Kruskal-Wallis, ANOVA és Post-Hoc teszttel, illetve Benjamin-Hochberg algoritmussal elemeztük. A mikroRNS-ek expressziójának szenzitivitását és specificitását a biopsziákban „receiver operating characteristic” (ROC) görbe analízisével határoztuk meg. A power analízis határértékei: I-es típusú hiba: 0,05, II-es típusú hiba: 0,2. A cut-off értékeket Youden’s J (J) index határozta meg. Szignifikáns eltérésnek $p \leq 0,05$ vettük. Ábráimon és a táblázatban az átlag \pm az átlag szórását (SEM: Standard Error of the Mean) tüntettem fel.

5. Eredmények

5.1. Crohn-beteg gyermekek mikroRNS profilja új-generációs szekvenálással

Új-generációs szekvenálással 170 eltérően expresszált mikroRNS-t azonosítottunk CD-s betegek mintáiban. Ezek közül 148 eltért a makroszkóposan gyulladt CD-s mintákban a makroszkóposan ép CD és kontroll mucosához képest. Ezen belül 114 mikroRNS diszregulált a gyulladt CD-s nyálkahártyában a kontroll csoporthoz képest, míg 99 diszregulált az ép CD mintákhoz képest. Összesen 61 mikroRNS mutatott eltérő expressziót a makroszkóposan ép CD biopsziákban a kontroll csoporthoz képest, ezek között 22 olyan mikroRNS-t azonosítottunk, melyek csak ebben a csoportban mutattak eltérő expressziót (8. táblázat).

8. táblázat: *Az új-generációs szekvenálással kapott mikroRNS-ek száma, amelyek „fold change” értékei $\geq 1,5$, vagy $\leq -1,5$ (FC: fold change)*

	CD kóros vs. Kontroll	CD ép vs. Kontroll	CD kóros vs. CD ép
FC > 1,5	55	45	23
FC < -1,5	59	16	66

5.2. Új-generációs szekvenálás validálása kvantitatív polimeráz láncreakcióval

Az új-generációs szekvenálással kapott mikroRNS-ek közül 18-t választottunk ki további, nagyobb elemszámon, RT-PCR-el végzett validálást követően. A kiválasztási kritérium, hogy a CD csoportban a kontrollhoz képest a „fold change” érték $\geq 1,5$, vagy $\leq -1,5$ legyen. Az új-generációs szekvenálás alapján kiválasztott mikroRNS-ek és azok „fold change” értékeit a 9. táblázatban tüntetem fel, míg a validálás eredményei a 10-12. ábrákon láthatók.

9. táblázat: A szekvenálás alapján kiválasztott mikroRNS-ek „fold change” értékei

	CD gyulladt vs. Kontroll	CD ép vs. Kontroll
miR-18a	3,275	3,675
miR-20a	-1,941	1,113
miR-21	1,928	2,140
mir-31	6,295	2,999
miR-99a	3,209	-
miR-99b	2,558	1,908
miR-100	4,905	2,385
miR-125a	1,999	2,226
mir-126	2,141	2,397
miR-141	-3,012	1,530
miR-142-3p	3,450	2,194
miR-142-5p	3,450	2,194
miR-146a	2,028	1,984
miR-150	2,605	1,095
miR-185	2,267	1,860
miR-204	-4,662	-1,597
miR-221	2,798	2,661
miR-223	5,310	2,842

5.3. Makroszkóposan gyulladt CD-s régiók mikroRNS mintázata RT-PCR-el

A miR-18a, -21, -31, -99a, -99b, -100, -125a, -126, -142-5p, -146, -150, -185 és -223 expressziója emelkedett a CD-s gyermekek gyulladt mucosájában a kontroll csoporthoz képest. A miR-141 és a -204 szintje csökkent a CD-s gyermekek gyulladt régióiban a makroszkóposan ép és a kontroll csoporthoz képest. A miR-142-3p szintje emelkedett a gyulladt régiókból származó biopsziákban a makroszkóposan ép CD-s biopsziákhoz képest.

5.4. Makroszkóposan ép CD-s régiók mikroRNS mintázata RT-PCR-el

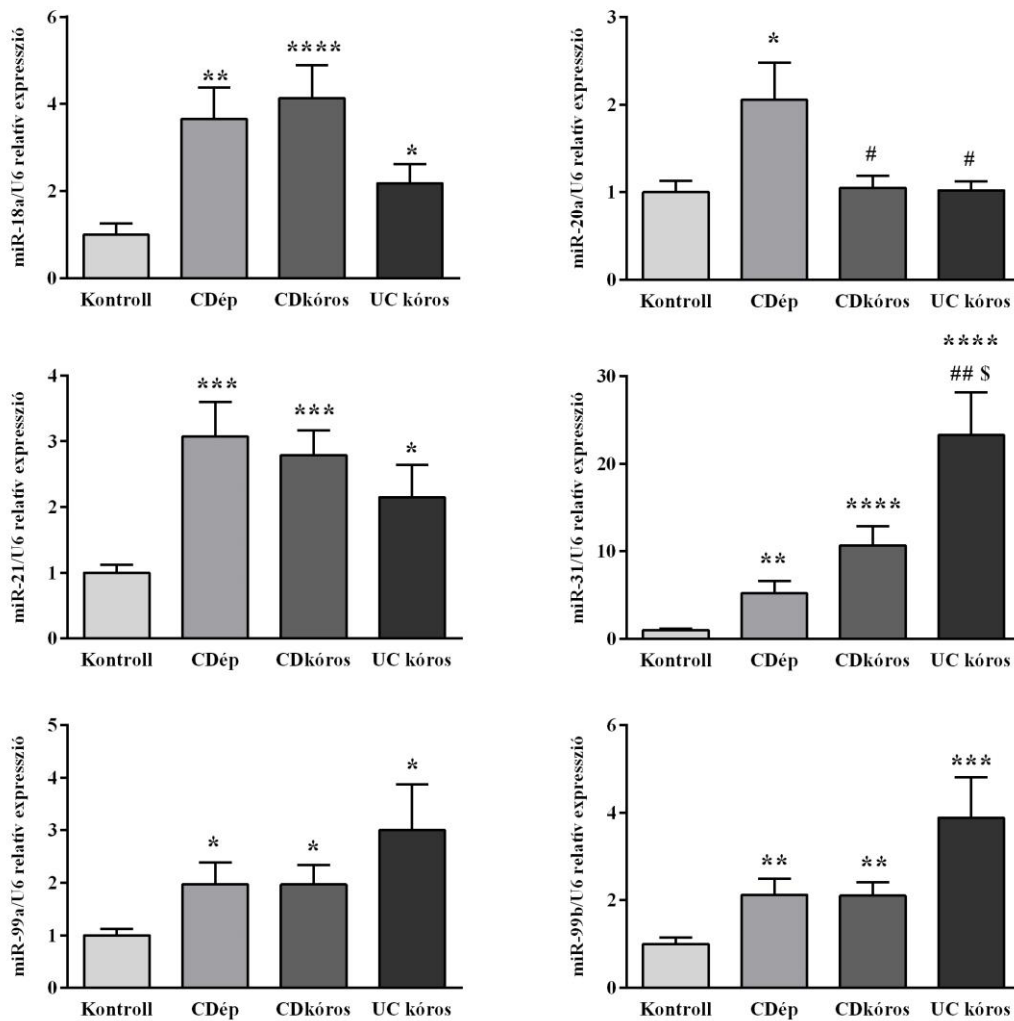
A miR-18a, -20a, -21, -31, -99a, -99b, -100, -125a, -126, -142-5p, -146, -185, -204, -221 és -223 expressziója emelkedett a makroszkóposan ép CD-s biopsziás mintákban a kontroll csoporthoz képest, közülük a miR-20a, -204 és -221 csak ebben a csoportban mutatott eltérést a kontroll csoporthoz képest, a makroszkóposan kóros biopsziákban nem. A miR-142-3p expressziója csökkent a CD-s gyermekek ép nyálkahártyájában a kontroll csoporthoz képest.

5.5. Makroszkóposan kóros UC-s régiók mikroRNS mintázata RT-PCR-el

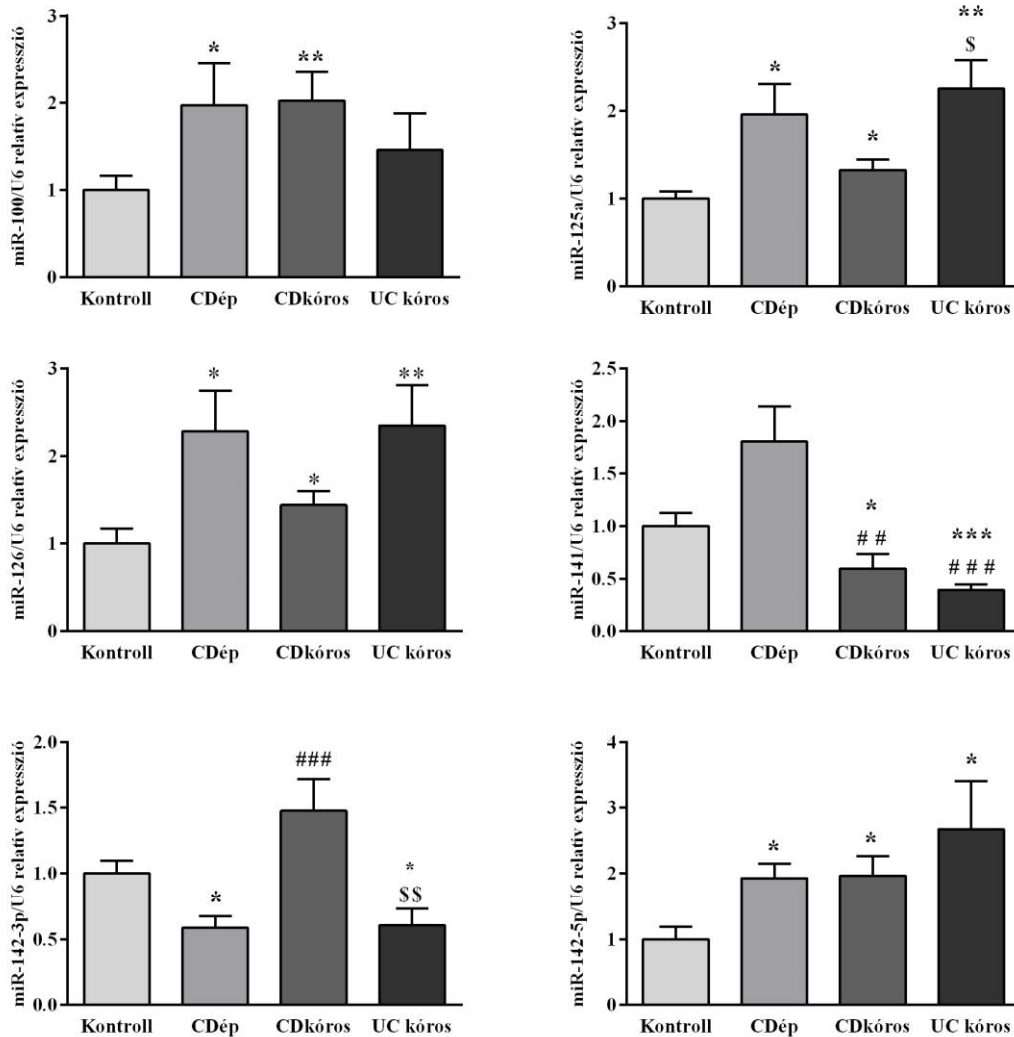
A miR-18a, -21, -31, -99a, -99b, -125a, -126, -142-5p, -146 és -223 expressziója emelkedett az UC-s csoportban a kontroll csoporthoz képest, közülük a miR-31, -125a, -146a és -223 expressziója a CD csoportokhoz képest is emelkedett. A miR-141 és -204 szintje csökkent a gyulladt CD és UC nyálkahártyában a makroszkóposan ép nyálkahártya (CD ép és kontroll) mintákhoz képest.

5.6. A validált mikroRNS-ek célgénjei

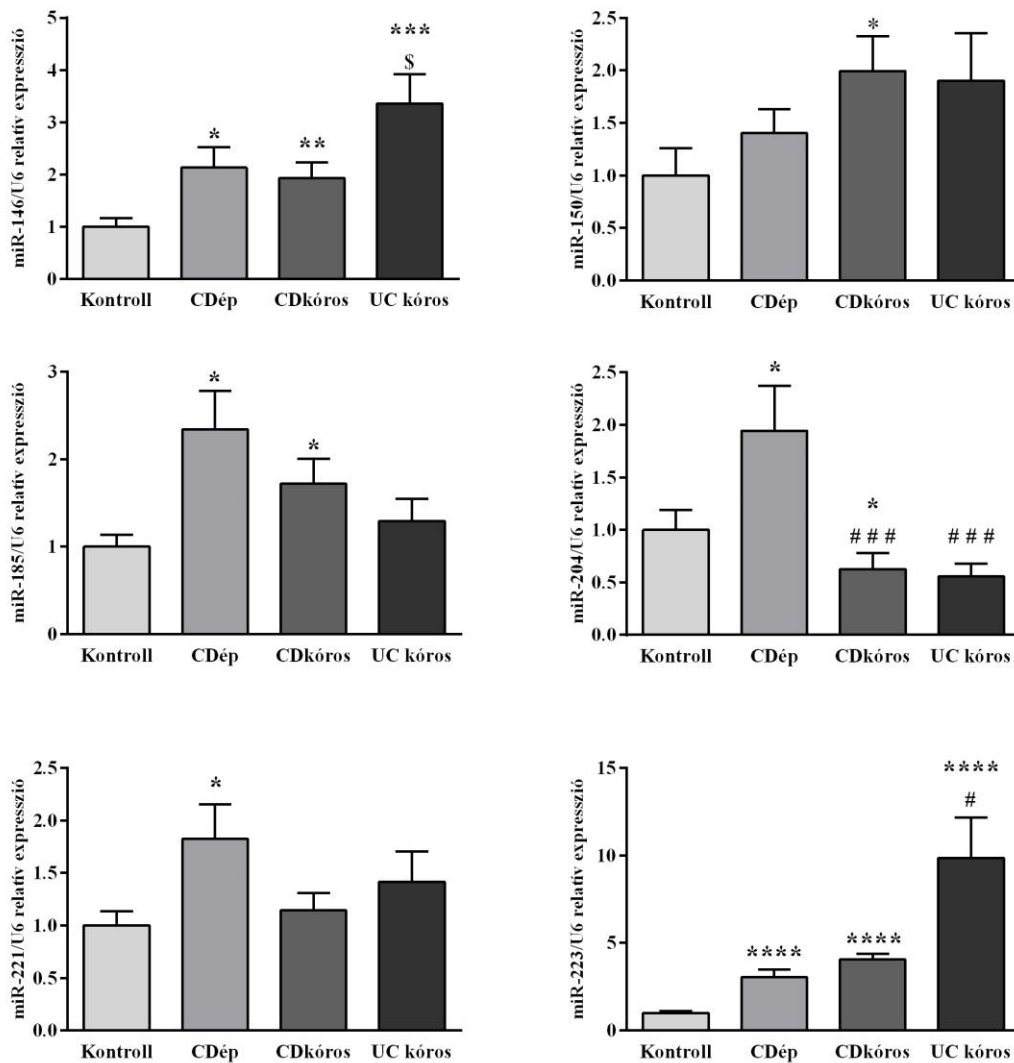
Az általunk validált 18 mikroRNS közül 14-nek van olyan célgénje, amely a gyermekkori CD biopsziák transzkriptom szekvenálás eredményeivel átfedést mutat (13. ábra). A célgének egyik felének (TLR2, -4, STAT1, IL6, ICAM1) ismert, másik felének: prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), SOCS3, E-szelektin (SELE), early growth response 2 (EGR2), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), cAMP responsive element binding (CREB5), NOTCH3) máig ismeretlen az IBD patomechanizmusában betöltött funkciója.



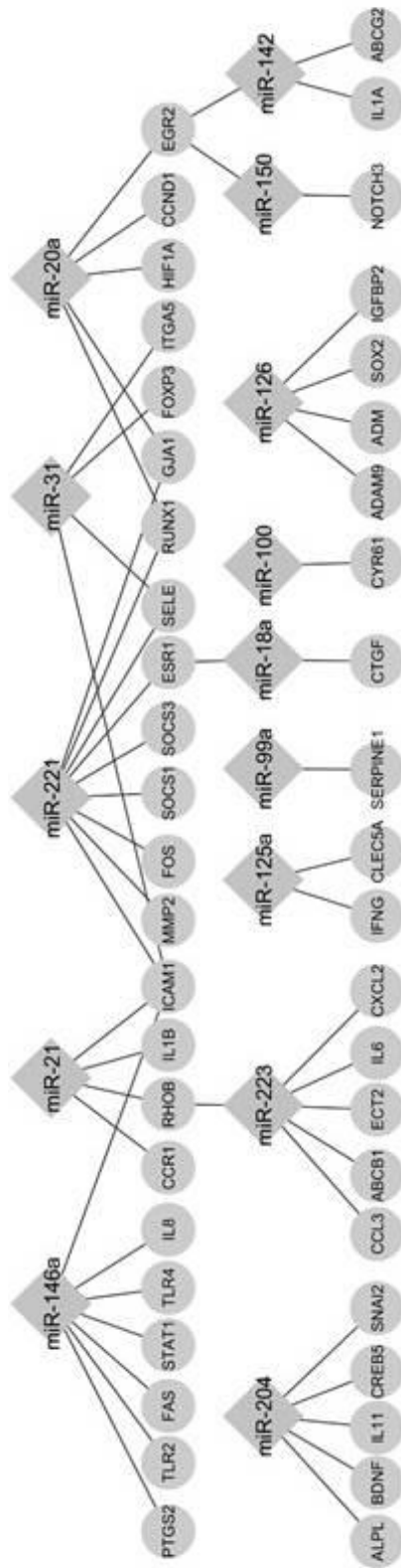
10. ábra: A miR-18a, -20a, -21, -31, -99a és -99b expressziója CD, UC és kontroll vastagbél biopsziákban: A miR-18a, -21, -31, -99a és -99b szintje emelkedett IBD-s betegek mintáiban a makroszkópos képtől függetlenül a kontroll csoporthoz képest. A miR-31 az UC-s csoportban a CD-s mintákhoz képest is emelkedett expressziót mutat. A miR-20a expressziója emelkedett a makroszkóposan ép területekről származó biopsziákban a kontroll csoporthoz képest, valamint a gyulladt nyálkahártyájú CD és UC csoportokhoz képest. (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$ vs. K; #: $p < 0,05$; ##: $p < 0,01$ vs. CD ép; \$: $p < 0,05$ vs. CD körös)



11. ábra: A miR-100, -125a, -126, -141, -142-3p és -142-5p expressziója CD, UC és kontroll vastagbél biopsziákban: A miR-100, -125a, -126 és -142-5p expressziója emelkedett CD gyermekek biopsziás mintáiban a makroszkópos képtől függetlenül a kontroll csoporthoz képest. A miR-125a, -126 és -142-5p szintje ezen felül az UC-s mintákban is emelkedett a kontroll csoporthoz képest. A miR-141 az IBD altípusától függetlenül alacsonyabb expressziót mutat a gyulladt nyálkahártyában az ép nyálkahártyához (ép CD és kontroll) képest. A miR-142-3p szintje emelkedett a makroszkóposan kóros CD-s biopsziákban az ép CD biopsziákhoz képest. A kóros UC-s biopsziákban csökkent a miR-142-3p expressziója a gyulladt CD és kontroll csoportokhoz képest. (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ vs. K; #: $p < 0,05$; ##: $p < 0,01$; ###: $p < 0,001$ vs. CD ép; \$: $p < 0,05$; \$\$: $p < 0,01$ vs. CD kóros)



12. ábra: A miR-146a, -150, -185, -204, -221 és -223 szintje CD, UC és kontroll vastagbél biopsziákban. A miR-146a, -185 és -223 szintje emelkedett IBD-s betegek biopsziájában a kontroll csoporthoz képest a makroszkópos képtől függetlenül. A miR-146a és -223 szintje az UC-s csoportban a CD-s biopsziákhoz képest is emelkedett expressziót mutatott. A miR-150-nek emelkedett az expressziója a gyulladt CD-s mintákban, a miR-204 és -221 szintje az ép biopsziákban emelkedett a kontroll csoporthoz képest. A miR-204 szintje csökkent expressziót mutat a gyulladt CD és UC biopsziákban. (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ vs. K; #: $p < 0,05$; ##: $p < 0,01$; ###: $p < 0,001$ vs. CD ép; \$: $p < 0,05$ vs. CD kóros)



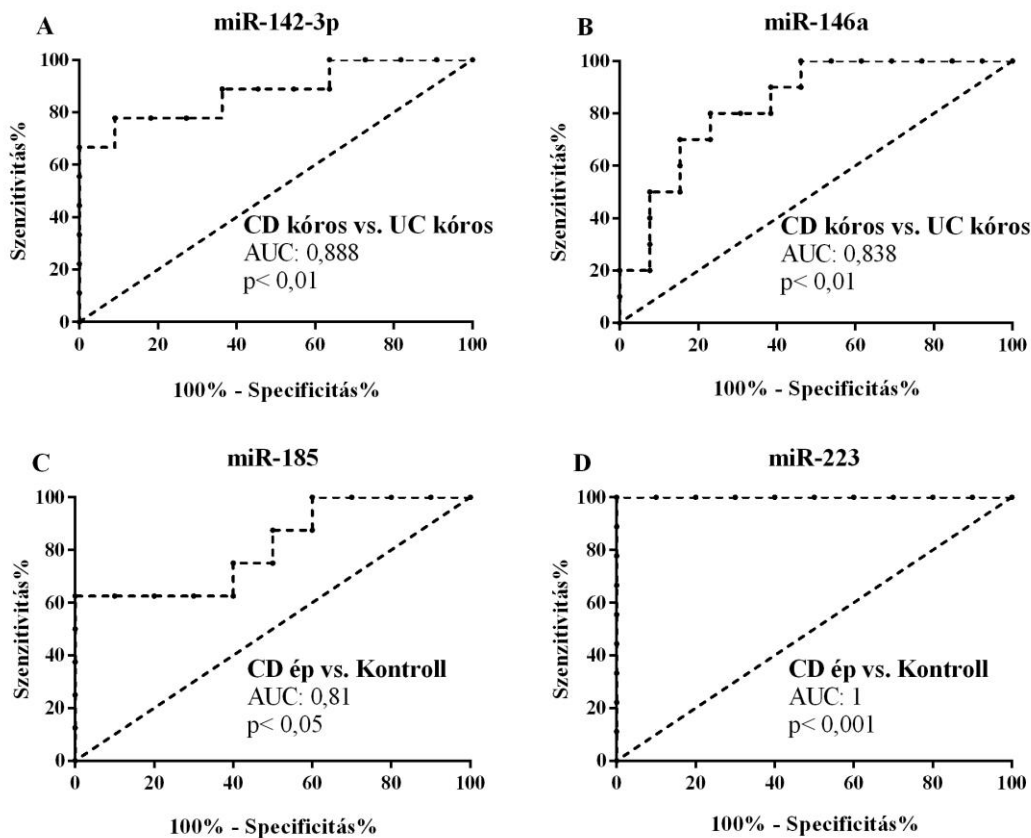
13. ábra: Validált mikroRNAs-ek CD-s mintákkal átfedő célgénjei és azok rövidítés magyarázata.

ABCB1	ATP binding cassette subfamily B	EGR2	Early growth response 2	ITGA5	Integrin subunit alpha 5
ABCG2	ATP binding cassette subfamily G	ESR1	Estrogen receptor 1	MMP2	Matrix metalloproteinase 2
ADAM9	ADAM metalloproteinase domain 9	FAS	Fas cell surface death receptor	NOTCH3	Notch 3
ADM	Adrenomedullin	FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
ALPL	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	FOXP3	Forkhead box P3	RHOB	Ras homolog family member B
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor	GJA1	Gap junction protein alpha 1	RUNX1	Runt related transcription factor 1
CCL3	Chemokine (C-C motif) ligand 3	HIF1A	Hypoxia inducible factor 1 alpha subunit	SELE	Selectin E
CCND1	Cyclin D1	ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1	SERPINE1	Serpin peptidase inhibitor 1
CCR1	Chemokine (C-C motif) receptor 1	IFGF2P	Insulin like growth factor binding protein 2	SNAI2	Snail family zinc finger 2
CLEC5A	C-type lectin domain family 5 member A	IFNG	Interferon, gamma	SOCS1	Suppressor of cytokine signaling 1
CREB5	cAMP responsive element binding	IL11	Interleukin-11	SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3
CTGF	Connective tissue growth factor	IL1A	Interleukin-1A	SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2
CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	IL1B	Interleukin-1B	STAT1	Signal transducer and activator of
CYR61	Cysteine rich angiogenic inducer 61	IL6	Interleukin-6	TLR2	Toll-Like Receptor 2
ECT2	Epithelial cell transforming 2	IL8	Interleukin-8	TLR4	Toll-Like Receptor 4

5.7. A ROC analízis eredménye

A ROC analízisek eredményeként 4 mikroRNS mutatott megfelelő statisztikai erősséget. A makroszkóposan gyulladt CD és UC csoport között a miR-142-3p expresszió AUC értéke 0,888 ($p < 0,01$), az optimális cut-off értéknél a szenzitivitás 77,78%, a specificitás pedig 90,31% ($J=0,69$) (14. ábra/A). A miR-146a esetén a gyulladt régiók összehasonlításánál 0,838 ($p < 0,01$) AUC értéket kapunk, 80%-os szenzitivitással és 76,92% specificitással (14. ábra/B).

A makroszkóposan ép CD és kontroll csoport között a miR-185 expresszió AUC értéke 0,81 ($p < 0,05$). Az optimális cut-off értéknél a szenzitivitás 62,5%, 100%-os specificitással ($J=0,63$) (14. ábra/C). Ugyanezen csoportok összehasonlításánál a miR-223 expresszió AUC értéke 1 ($p < 0,001$), 100%-os szenzitivitással és specificitással (14. ábra/D).



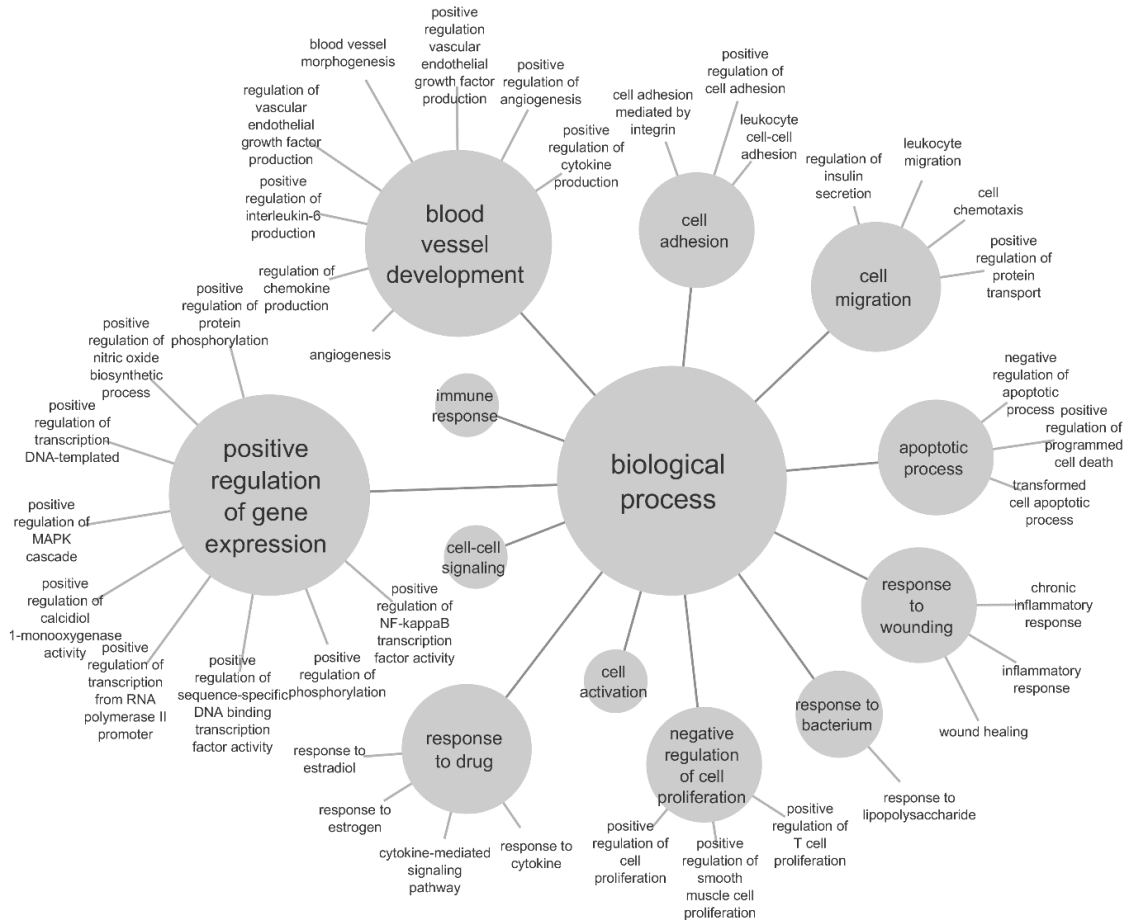
14. ábra: A miR-142-3p, -146a, -185 és -223 „receiver operating characteristic” ROC analízisének eredménye.

5.8. A mikroRNS-ek biológiai folyamatokban betöltött szerepének vizsgálata

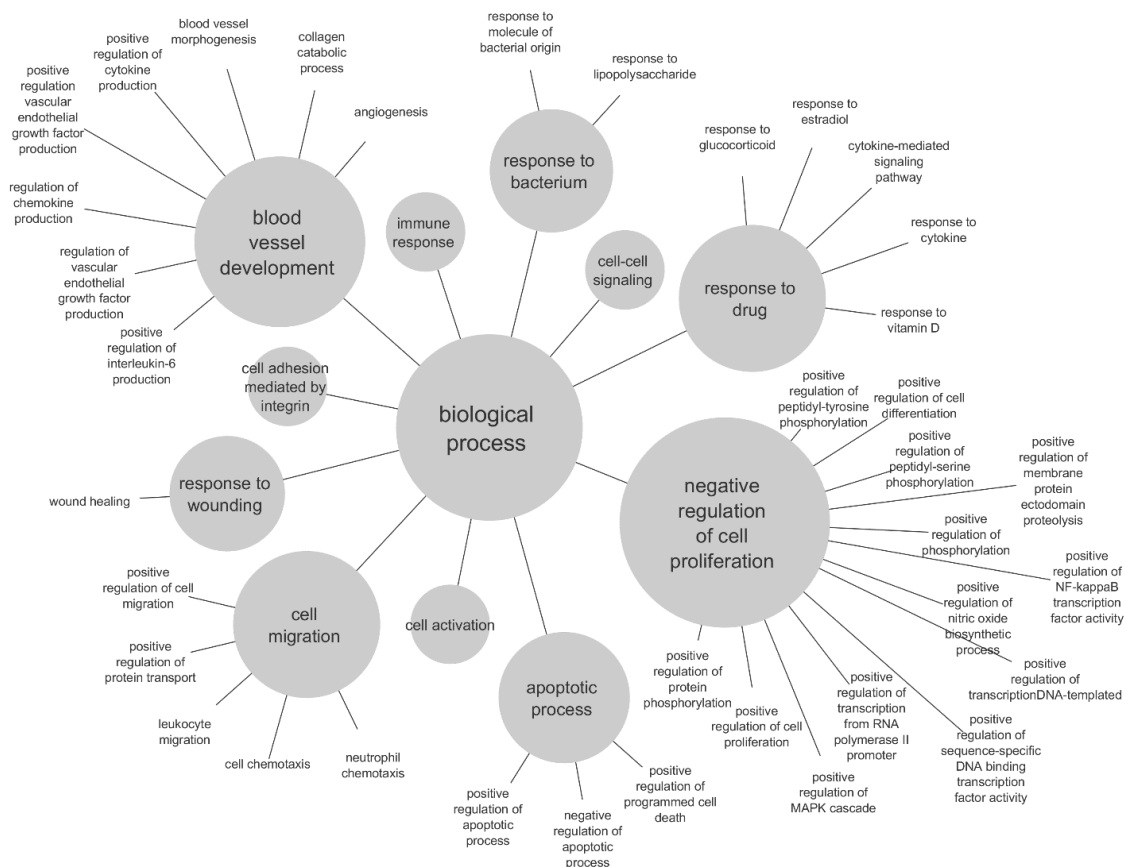
A szekvenálással igazolt, IBD-ben releváns mikroRNS-ek által szabályozott célgéneket összehasonlítottuk nyilvános adatbázisból elérhető CD-s gyermekek biopsziáiból készült teljes transzkriptom szekvenálással kapott IBD-ben releváns génekkel. Az így kapott közös génhalmazt felannotáltuk biológiai funkciók szerint (GO term-ek). A transzkriptom szekvenálás (E-GEOD-57945) és a mikroRNS szekvenálás célgénjei alapján 126 gént vizsgáltunk tovább. Az „enrichment” analízis 248 GO term kategóriát eredményezett, melyeket további 50 csoportba soroltunk az evidencia kódok alapján (IDA, IMP, IEP). A csoportok 12 fő kategóriába oszthatók (15. ábra). A legjelentősebb csoportok: az apoptózis szabályozása, a hegképződésre adott válasz, a baktériumok elleni védekezés, a sejt-migáció és -adhézió, az érújdonképződés, a génexpresszió szabályozása, valamint a sejt-sejt jelátviteli utak szabályozása.

A validált mikroRNS-eknek 64 célgénje mutatott átfedést a gyermekkori CD-s biopsziákból készült teljes transzkriptom szekvenálás génlistájával. Az „enrichment” analízis eredményeként 192 GO kategóriát kaptunk, melyeket 11 főcsoportba osztottunk további elemzéssel (16. ábra).

A colitis ulcerosás gyermekek biopsziáiból készült transzkriptom szekvenálással (GSE10616) 4 gén mutatott átfedést (ABCG2, PHLPP2, ABCB1, RHO) az általunk vizsgált mikroRNS-ekkel (miR-20a, -126, -141, -142 és -223).



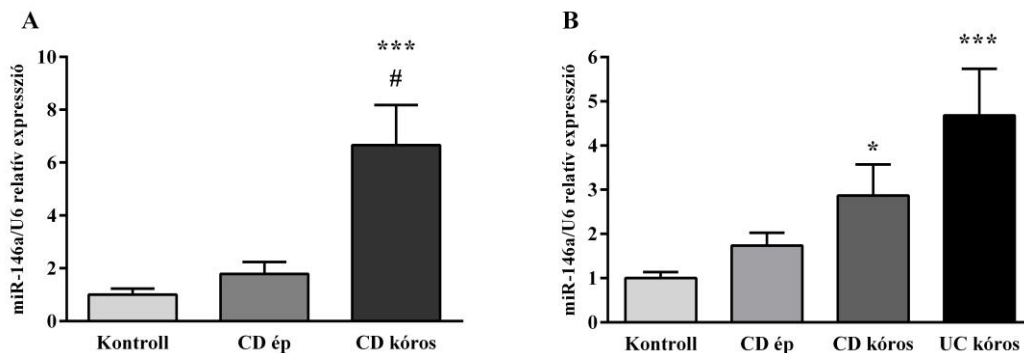
15. ábra. Az új-generációs szekvenálással szignifikáns eltérést mutató mikroRNS-ek CD-ben releváns célgénjeinek biológiai funkciója. Az új-generációs szekvenálással szignifikáns eltérést mutató mikroRNS-ek által szabályozott célgének és CD-s biopsziás minták transzkriptom szekvenálással kapott közös géneket gén ontológiai (GO) csoportokba annotáltuk, majd a redundanciát megszüntetve ezeket további algoritmusok segítségével főcsoportokra osztottuk. A 248 GO kategória leredukálása után 12 főcsoportot, azokon belül 50 alcsoportot kaptunk. Ezekben 126 gén által szabályozott biológiai út jelenik meg, melyek közül a kísérletes körülmények között igazolt utakat vettük figyelembe. A főcsoportok mérete arányos az alcsoportok számával. Legjelentősebbek a gén expresszió regulációja, az immunválasz, az érújdonképződés, a sejtadhézió és -migráció, az apoptotikus folyamatok, a hegesedés, a baktérium alkotókra adott válasz, a sejtproliferáció negatív regulációja, a sejtaktiváció, a gyógyszerek által kiváltott válasz és a sejt-sejt jelátviteli útvonalak.



16. ábra: A validálásra kiválasztott mikroRNS-ek CD-ben releváns célgénjeinek biológiai funkciója. Az új-generációs szekvenálással kapott, validálásra kiválasztott mikroRNS-ek által szabályozott célgének és CD-s biopsziás minták transzkriptom szekvenálással kapott közös géneket gén ontológiai (GO) csoportokba annotáltuk, majd a redundanciát megszüntetve ezeket további algoritmusok segítségével további főcsoportokra osztottuk. A 192 GO kategória leredukálása után 11 fő csoportot kaptunk, melyeknek 43 alcsoportja van. Ezekben 64 gén által szabályozott biológiai út jelenik meg. Azokat a biológiai utakat vettük figyelembe, amelyeket kísérletes körülmények között igazoltak. A főcsoportok mérete arányos az alcsoportok számával. Legjelentősebbek a sejtproliferáció szabályozása, az apoptózis folyamatának regulálása, a sejtaktiváció, a sejt migráció, a hegesedés, az integrin szabályozta sejtadhézió, az érújdonképződés, az immunválasz, a baktériumokra adott reakció és a gyógyszerekre adott válasz.

5.9. A miR-146a expressziója CD-s, UC-s és kontroll gyermekek biopsziás mintáiban

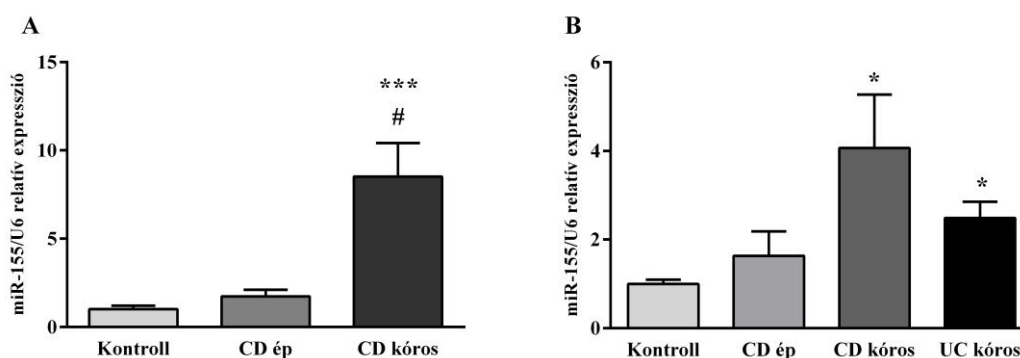
A formalinban-fixált paraffinba ágyazott biopsziákban a miR-146a szintje magasabb a makroszkóposan kóros CD-s mintákban a makroszkóposan ép és kontroll csoporthoz képest (CD kóros vs. K: $p < 0,001$, CD kóros vs. CD ép: $p < 0,05$). Hasonló tendencia látható a fagyasztott biopsziás minták esetén is, ahol a gyulladt nyálkahártyában CD-s és UC-s betegek miR-146a expressziója magasabb a kontroll csoporthoz képest (CD kóros vs. K: $p < 0,05$, UC vs. K: $p < 0,001$). A fagyasztott minták esetében nem volt különbség az ép és a kóros biopsziák között (17. ábra). Egyik konzerválási mód esetén sem volt különbség az ép és a kontroll csoport miR-146a expressziója között.



17. ábra: A miR-146a expressziója formalinban fixált, paraffinba-ágyazott (A) és fagyasztott (B) CD-s, UC-s és kontroll biopsziás mintákban. A miR-146a expressziója szignifikánsan megnövekedett CD gyermekek biopsziáiban a makroszkóposan ép és kontroll csoportokhoz képest a paraffinba fixált, formalinba ágyazott minták esetén. Fagyasztott biopsziás mintákban a gyulladt területekről származó biopsziákban a miR-146a expressziója az IBD altípusától függetlenül megnövekedett a kontroll csoporthoz képest. (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$ vs. Kontroll, #: $p < 0,05$ vs. CDép)

5.10. A miR-155 expressziója CD-s, UC-s és kontroll gyermekek biopsziás mintáiban

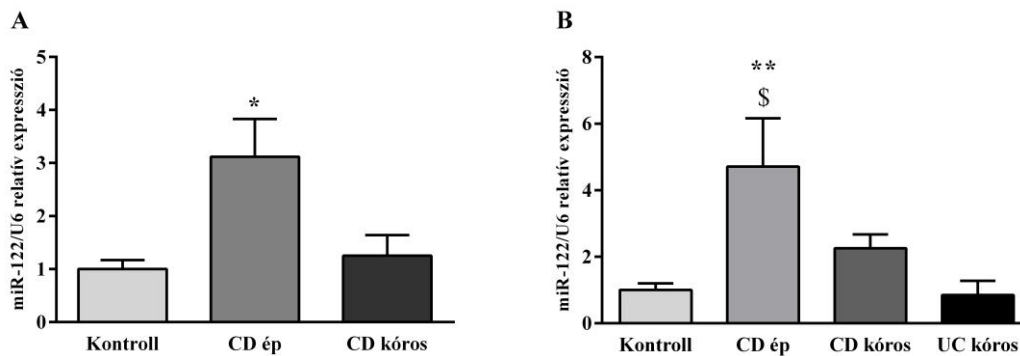
A formalinban-fixált, paraffinba ágyazott biopsziákban a miR-155 expressziója emelkedett a makroszkóposan gyulladt CD-s biopsziákban a makroszkóposan ép és kontroll biopsziákhoz képest (CD kóros vs. K: $p < 0,001$, CD kóros vs. CD ép: $p < 0,05$), az ép és kontroll csoport között nem volt különbség. Hasonló tendencia látható a fagyasztott biopsziás minták esetén is, a miR-155 expressziója emelkedett a gyulladt CD-s biopsziák esetén kontroll csoporthoz képest (CD kóros vs. K: $p < 0,05$), ugyanakkor az ép és kontroll csoport között ezen konzerválási metodika esetében sem volt különbség. Az UC-s biopsziákban emelkedett miR-155 expressziót mértünk a kontroll csoporthoz képest (UC vs. K: $p < 0,05$), UC és CD között azonban nem volt statisztikailag szignifikáns különbség (18. ábra).



18. ábra A miR-155 expressziója formalinban fixált, paraffinba-ágyazott (A) és fagyasztott (B) CD-s, UC-s és kontroll biopsziás mintákban. A miR-155 expressziója szignifikánsan megnövekedett CD gyermekek biopsziáiban a makroszkóposan ép CD-s és kontroll csoportokhoz képest a paraffinba fixált, formalinba ágyazott minták esetén. Fagyasztott biopsziás mintákban a gyulladt területekről származó biopsziákban a miR-155 expressziója az IBD altípusától függetlenül magasabb a kontroll csoporthoz képest. (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$ vs. Kontroll, #: $p < 0,05$ vs. CDép)

5.11. A miR-122 expressziója CD-s, UC-s és kontroll gyermekek biopsziás mintáiban

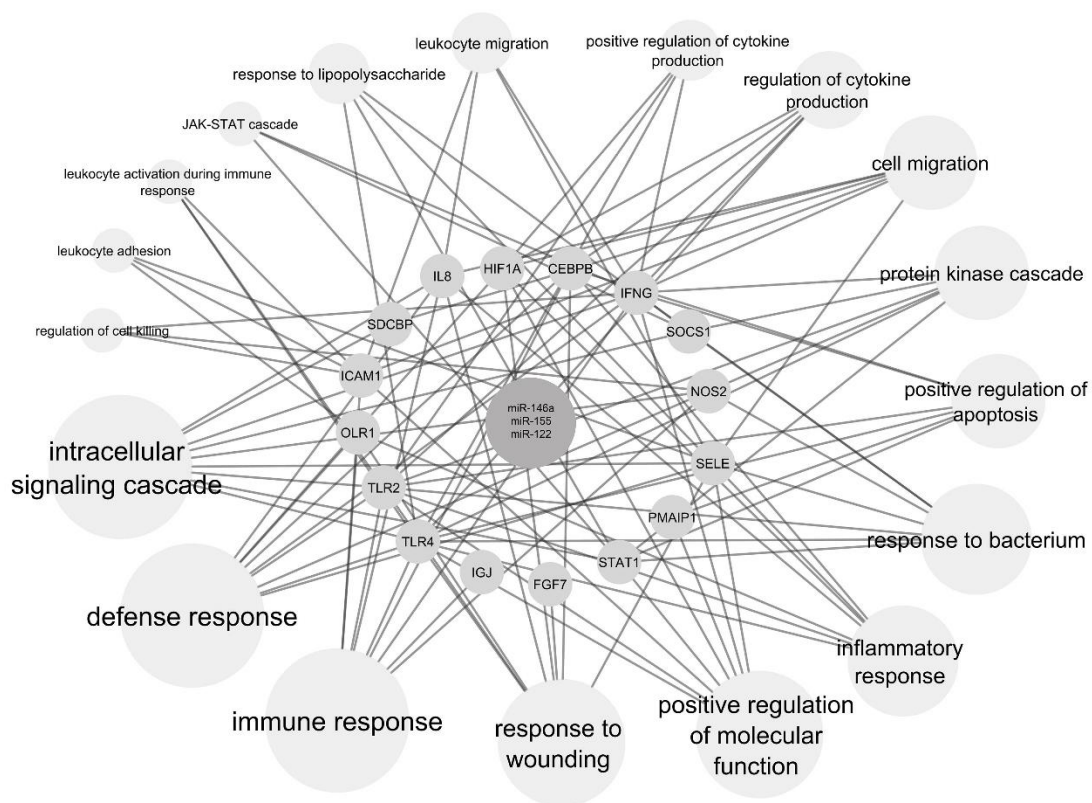
A formalinban-fixált, paraffinba ágyazott biopsziák esetén a miR-122 expressziója magasabb volt a CD gyermekek makroszkóposan ép biopsziás mintáiban a kontroll csoporthoz képest (CD ép vs. K: $p < 0,05$). Ugyanez a tendencia látható a fagyasztott biopsziák esetén is, ahol a miR-122 expressziója a CD-s betegek ép nyálkahártyájában magasabb az UC-s csoporthoz képest is (CD ép vs. K: $p < 0,01$, CD ép vs. UC: $p < 0,05$). Nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a gyulladt CD-s, UC-s és kontroll csoport között (19. ábra).



19. ábra: *A miR-122 expressziója formalinban fixált, paraffinba-ágyazott (A) és fagyasztott (B) CD-s, UC-s és kontroll biopsziás mintákban. A miR-122 expressziója emelkedett a makroszkóposan ép CD-s biopsziákban a kontroll csoporthoz képest a formalinban fixált, paraffinba-ágyazott mintákban. A fagyasztott mintákban a miR-122 expressziója magasabb a makroszkóposan ép mintákban a makroszkóposan kóros UC-s és kontroll csoporthoz képest. (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ vs. Kontroll, \$: $p < 0,05$ vs. UC)*

5.12. A miR-146a, -155 és -122 szabályozási rendszere

A miR-146a, -155 és -122 a MirTarBase adatai és korábbi CD-s gyermekek biopsziáiból végzett teljes transzkriptom szekvenálás (E-GEOD-57945) adatai alapján 16, CD szempontjából is releváns direkt célgénét regulál. Az „enrichment” analízis alapján ezek a célgének 18 GO kategóriába sorolhatók. A legtöbb célgén által szabályozott folyamat az intracelulláris kaszkád, az immun- és védekező rendszer, a gyulladásos folyamatok, az apoptózis és a hegképződés regulálásához köthető (20. ábra).



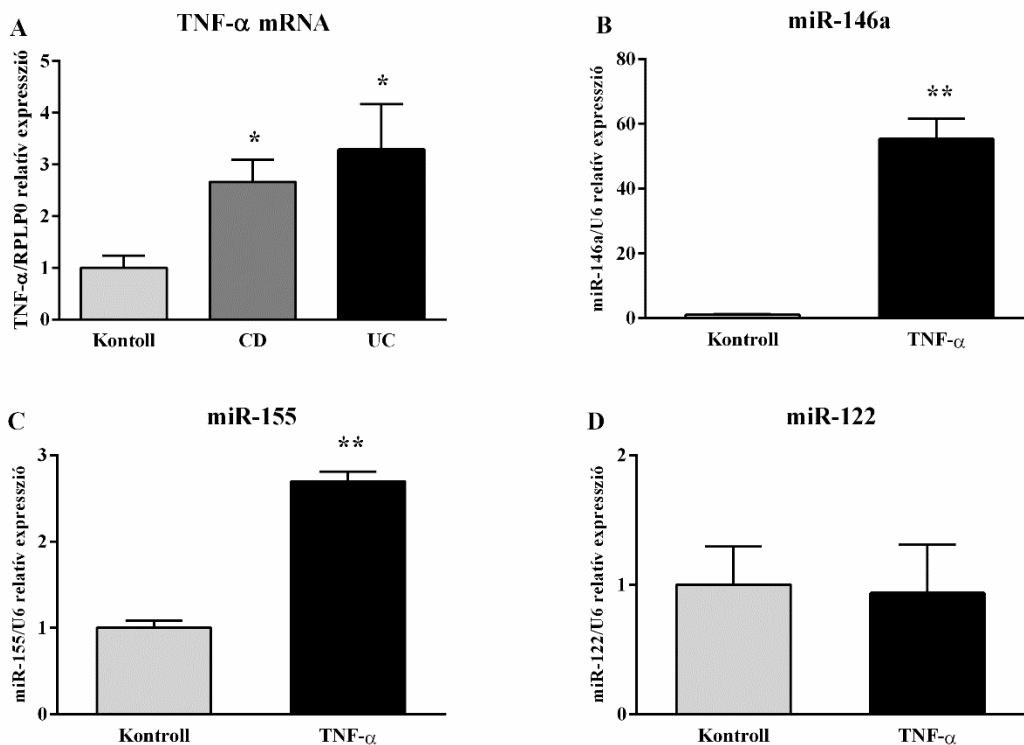
20. ábra: A miR-146a, -155 és -122 és gyermekkori CD szempontjából releváns célgénjeik szabályozása alatt álló biológiai folyamatok. A 3 mikroRNS 16 CD szempontjából releváns célgénnel rendelkezik, amelyek 18 GO csoportba sorolhatók.

5.13. A TNF- α expresszió CD-s, UC-s és kontroll gyermekek vastagbél biopsziás mintáiban

Ahogy korábban már igazolták, a TNF- α mRNS expressziója emelkedett a CD-s és UC-s biopsziákban a kontroll csoporthoz képest (CD, UC vs. K: $p < 0,05$). A CD-s és UC-s minták TNF- α mRNS expressziója között nem volt különbség (21. ábra/A).

5.14. A TNF- α hatása a miR-146a, -155 és -122 expresszióra HT-29 epitél sejteken

HT-29 colon epitél sejtek rekombináns TNF- α kezelése megnövelte a miR-146a és -155 (TNF- α vs. K: $p < 0,01$) expresszióját (21. ábra/B, C), azonban nem befolyásolta a miR-122 szintjét (21. ábra/D).



21. ábra: TNF- α szintje CD-s, UC-s és kontroll biopsziákban (A), valamint a TNF- α kezelés hatása a miR-146a (B), -155(C) és -122 (D) expresszióra HT-29 colon epitél sejteken. A TNF- α expresszió emelkedett a CD-s és UC-s biopsziákban a kontroll csoporthoz képest. HT-29 colon epitél sejteken TNF- α kezelés hatására emelkedett a miR-146a és -155 expressziója. (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ vs. Kontroll)

6. *Megbeszélés*

Az IBD az esetek 15-25%-a gyermekkorban kezdődik, ilyenkor számolhatunk az élethosszig tartó megbetegedés súlyos következményeivel [3, 5-7]. A gyermekkori IBD súlyosabb lefolyást mutat, gyorsabb progressziójú és kiterjedtebb bélérintettséget eredményez, mint a felnőttkorban induló betegség. Gyermekkori megbetegedés kapcsán a növekedés elmaradása, a rosszabb csontsűrűség, és a késői pubertás a legfontosabb következmények. Éppen ezért kiemelt jelentőségű a korai kezdetű, gyermekkori IBD kialakulását elősegítő tényezők azonosítása [19, 184].

A multifaktoriális eredetű IBD pontos patomechanizmusa máig sem tisztázott. A genetikailag fogékony egyéneknél környezeti tényezők hatására a bélnyálkahártya immunsejtjei kórosan aktiválódnak, így egy ellenőrizetlen gyulladási folyamat indul be. A genetikai faktorok szerepével csak részben magyarázható az IBD patogenezise, éppen ezért felmerült a környezeti tényezők lehetséges szerepe. Azonban tudjuk, hogy kora gyermekkorban a genetikai tényezőknek nagyobb szerepe van, mint a környezeti faktoroknak [185]. Éppen ezért az utóbbi években előtérbe kerültek az epigenetikai kutatások, melyek eredményei összekötő kapcsolatot jelenthetnek a genetikai és a környezeti tényezők IBD-ben betöltött szerepe között.

Az epigenetika tárgykörén belül az utóbbi években egyre több közlemény foglalkozik a mikroRNS-ek finomszabályozó szerepével. Ezek a rövid, nem kódoló szakaszok transzkripciós és poszttranszkripciós szabályozó szerepet töltenek be, az mRNS-ek 3' nem-kódoló régiójához kötődve befolyásolják a fehérjeszintézist [11, 12, 36, 186].

Az első vizsgálatot, ami felnőttkori IBD-ben vizsgálja a mikroRNS-eket 2008-ban közzétették [81]. Az elmúlt évtizedben számos vizsgálati eredményt publikáltak a felnőtt IBD-szek szérum és colon biopsziás minták mikroRNS mintázatának feltérképezésével kapcsolatban, azonban a mikroRNS-ek gyermekkori IBD-ben betöltött szerepével igen kevés kutatás foglalkozik. Ennek fényében munkacsoportunk célul tűzte ki a gyermekkori IBD lokális mikroRNS mintázatának vizsgálatát új-generációs szekvenálással és RT-PCR-el **(1)**, illetve a releváns mikroRNS-ek célgénjeinek további vizsgálatát bioinformatikai módszerekkel **(2)**, mely közelebb vihet a kórkép kialakulásának pontosabb megértéséhez. Tekintettel arra, hogy a gyakorlatban a

formalinban-fixált, paraffinba ágyazott biopsziák elérhetőbbek a fagyasztott mintákhoz képest, így következő lépésben megvizsgáltam, hogy a konzerválás módja befolyásolja-e a mikroRNS expresszió változását **(3)**. Korábbi tanulmányokból ismert, hogy a TNF- α -indukálta jelátviteli útvonalat a miR-146a, -155 és -122 számos ponton befolyásolhatja. Tekintettel a TNF- α IBD-ben betöltött központi szerepére, elemeztem a miR-146a, -155 és -122 expressziójára kifejtett hatását HT-29 colon epitél sejtekben **(4)**.

(1) MikroRNS mintázat meghatározása gyermekkori IBD-ben

Először új-generációs szekvenálással CD-s gyermekek colon biopsziás mintáinak mikroRNS profilját határoztuk meg, így 170, a kontroll csoporttól eltérően expresszált mikroRNS-t azonosítottunk. A gyulladt CD-s nyálkahártyában 148 mikroRNS expressziója különbözött az ép (makroszkóposan ép CD-s és kontroll) mucosától. A CD-s gyermekek makroszkóposan ép biopsziákban 22 mikroRNS expressziója mutatott eltérést a kontroll csoporthoz képest. Az új-generációs szekvenálás eredményeiből „fold change” érték alapján 18 mikroRNS-t választottunk ki validálásra, melyet nagyobb elemszámon, UC-s gyermekek biopsziás mintáinak bevonásával, valós-idejű polimeráz láncreakcióval végeztünk.

Összehasonlítottam a validálás eredményeit az IBD szubtípusai szempontjából. A miR-31, -125a és -146a expressziója emelkedett, míg a miR-142-3p expressziója csökkent az UC-s gyermekek gyulladt mucosájában a makroszkóposan kóros CD-s gyermekek vastagbél nyálkahártyájához képest. A miR-100, -150 és -185 expressziója a CD-s mintákban nőtt, míg az UC-s gyermekek mintáiban nem mutatott szignifikáns változást a kontroll csoporthoz képest. Továbbá a ROC analízis alapján a miR-142-3p 77,78%-os szenzitivitással és 90,31%-os specificitással, míg a miR-146a 80%-os szenzitivitással és 76,92%-os specificitással képes elkülöníteni a két kórkép között. A miR-31, -100, -125a, -142-3p, -146a, -150, -185 és -223 CD specifikus markerek lehetnek, amik segíthetnek a gyermekkori CD és UC differenciálásában. Mindezek jelentőségét az adja, hogy pancolitis esetén sokszor nehézségekbe ütközik a CD és UC egymástól történő differenciálása. Gyermekkori UC-ban az esetek 55-75%-a kezdődik extenzív colitissel [26, 184, 187], továbbá számos pancolitises esetről számol be az irodalom CD-s gyermekek esetén [188]. A hazai gyermekkori IBD regiszter adatai

alapján (Hungarian Pediatric IBD Registry Group, HUPIR) CD-sek kb. 4-6 %-nál jelentkezik pancolitis, terminalis ileum érintettség és granulomák nélkül, mely megnehezíti a diagnózis felállítását. Mindezeknek terápiás konzekvenciája van, mivel egy UC-s gyermek pancolitise esetén szóba jön a colectomia, míg CD diagnózisánál igyekszünk a műtétet elkerülni. Éppen ezért különösen fontos CD és UC elkülönítését segítő biomarkerek azonosítása.

A miR-18a, -20a, -31, -100, -185, -204, -221 és -223 expressziója emelkedett CD-s gyermekek ép biopsziás mintáiban a kontroll csoporthoz képest, mely segítheti az ép CD nyálkahártyát elkülöníteni az egészségestől. A ROC analízis alapján a miR-185 62,5%-os szenzitivitással és 100%-os specificitással, míg a miR-223 100%-os szenzitivitással és specificitással képes különbséget tenni a makroszkóposan ép CD és kontroll nyálkahártya között. A CD diagnózisa nehezített izolált ileális érintettség esetén, amikor az alsó és felső GI traktus ép, a gasztro-colonoszkópián nem látunk eltérést, a terminális ileumba való bejutás nehézségbe ütközik technikai okból. Éppen ezért fontos lenne olyan biomarkerek azonosítása, amely ép colon nyálkahártya esetén is képes meghatározni a CD diagnózist. Izolált ileális érintettség 0,4-7%-ban fordul elő gyermekkori CD-ben [3, 26, 189]. Továbbá az EUOKIDS regiszter alapján az izolált terminális ileum érintettség (\pm limitált coecum érintettség) a gyermekek 16%-ban fordul elő [190]. Amennyiben a terminális ileum intubációja nem jár sikerrel, ezekben az esetekben a diagnózis felállításához kapszulas endoszkópia, vagy altatásban végezhető MR vizsgálat szükséges [191]. Gyermekkorban kiterjedtebb vékonybél érintettség van, melynek számos következménye van: felszívódási zavarok, növekedési elmaradás, csontdenzitás csökkenés, elmaradott nemi fejlődés [192].

2011-ben Zahm és mtsai. közzölték az első eredményeket, melyben L2 lokalizációjú CD-s, UC-s és kontroll gyermekek rectum biopsziáinak és szérumának mikroRNS mintázatát vizsgálták [145, 146]. Méréseinket összehasonlítva elmondhatjuk, hogy hasonlóan a rectumban kapott eredményekhez a miR-21, -126 és -142-3p szintje emelkedett gyermekkori CD-ben, a miR-21, -126, -146a és -223 a gyermekkori UC-ban emelkedett a kontroll csoporthoz képest. Mindezek arra utalhatnak, hogy az emelkedett miR-21 és -126 szintje az IBD altípusától és a biopszia helyétől független. Zahm és Koukos mtsai. szérumban is végeztek méréseket. A szérumban kapott eredményeket összevetve a saját eredményeinkkel a miR-20a és -21

szintje egyaránt emelkedett CD-s biopsziákban. Ezen felül a szekvenálási adatainkat összehasonlítva Zahm és Koukus adataival a miR-30, -192, -200b, -224, -424 és let-7a szintje diszregulált a vizsgált populációkban, ugyanakkor a miR-124 eltérő expresszióját UC-ban mi nem igazoltuk [125, 145-147]. A korábbi vizsgálatokkal való összevetés különbségei a felhasznált minták (szérum, biopszia), a biopsziák helye (colon, rectum), a betegség altípusa, lokalizációtól, illetve a korábbi kezelésekből adódhatnak. Mintáink jelentőségét az adja, hogy terápia naív gyermekek biopsziás mintáit használtuk fel, tehát a mikroRNS-mintázatot az alkalmazott immunmoduláns, immunmodulátor és gyulladáscsökkentő kezelés nem befolyásolta, vagyis adataink unikális módon a kezdeti epigenetikai folyamatokat a korábbi vizsgálatokhoz képest jobban karakterizálja.

A felnőtt adatokkal is összevetve az eredményeinket szintén számos hasonlóságot és különbséget kapunk. Fasseu és mtsai. emelkedett miR-21, -31, -126 és -146a expressziót igazoltak CD-s betegek gyulladt és nem gyulladt biopsziáiból [138]. Ugyanakkor a miR-185 a CD-s mintákban mutat emelkedett expressziót, míg UC-ban nem. Eredményeinkkel ellentétben a miR-150 a gyulladt és a nem gyulladt felnőtt CD-sek biopsziáiban egyaránt emelkedett expressziót mutatott, míg a miR-223 szintje az ép CD régiókban volt emelkedett, a gyulladtban nem a kontroll csoporttal összehasonlítva. Ugyanakkor a felnőtt adatokkal egyezően a miR-150 és -223 alkalmas lehet a CD és UC differenciálásra, hiszen mind a gyermek, mind a felnőtt adatokban különbség van CD és UC biopsziák expressziójában egymáshoz képest [138].

Mindezek a különbséget segíthetik felfedni a felnőtt és gyermekkori IBD patomechanizmusának különbségeit. Az itt említett mikroRNS-ek, amelyek eltérően expresszálódnak gyermek és felnőtt IBD-s mintákban egyaránt a kontroll csoporthoz képest, számos gyulladáshoz kapcsolódó folyamatban ismert a szerepük. Továbbá az is ismert, hogy a gyulladás fennállásának ideje növeli a tumoros átalakulás valószínűségét [193]. Hasonlóan a gyermekkori IBD-s biopsziákban mért eredményeinkhez eltérő miR-21, -31, -150, -146a és -223 expressziót igazolták colorectális karcinoma miatt operált betegek tumoros szövetében a kontroll csoporthoz képest. A miR-21, -31, -150 és -223 emelkedett expresszióját igazolták a tumoros szövetben, ezeket a mikroRNS-eket onkomikroRNS-eknek tartjuk. Ezekkel ellentétben a miR-146a szintje csökkent a tumoros szövetben, míg CD-s biopsziákban emelkedett a szintje, ez a mikroRNS tumor

szupresszorként ismert [193-195]. Tekintettel arra, hogy a malignus átalakulás rizikója a krónikus gyulladás idejével arányos, fontos, hogy a gyermekkori IBD-ben a tumoros átalakulás megítélésére prognosztikai faktort találjunk, illetve olyan markereket azonosítsunk amelyek képesek non-invazív módon megítélni a tumoros átalakulás jelenlétét [196].

Ezen felül a miR-223 szintje jól korrelált a CD és UC aktivitásával, illetve a CD és UC-re jellemző laboratóriumi paraméterek változásával. A szérumban miR-223 szintje a betegség aktivitással jobban korrelált, mint az eritrocita szedimentációs hányados, vagy a hs-CRP. A szérumban miR-223 szint egy potenciális biomarker lehet, amely segíthet a kórkép monitorizálásában [197].

(2) Gyermekkori IBD-ben releváns mikroRNS-ek célgénjeinek funkcionális analízise

Munkánk során a szekvenálással kapott, IBD-ben érintett mikroRNS-ek célgénjeit összevetettük a nemzetközi adatbázisból elérhető, IBD-s gyermekek biopsziás mintáiból készült teljes transzkriptom szekvenálással kapott génekkel, így számos, IBD-ben ismert szerepet játszó gén került előtérbe - alátámasztva a mikroRNS-ek jelentőségét. Az így kapott IBD-ben releváns génlistához biológiai funkciókat rendeltünk, melyek közül kiemelt jelentőségű a gyulladási folyamatok, a fibrózis, a mikrobiom, az apoptózis és az angiogenezis szabályozása (10. táblázat).

A legtöbb mikroRNS-ekhez köthető gén részt vesz az előbb említett folyamatokban, szerepet játszik a sejtek migrációjában, aktivációjában, citokin termelésében és proliferációjában, külön kiemelve a leukocita migrációt és aktivációt. A gének többségének IBD-ben betöltött szerepe ismert, különböző citokinek (TNF, IFN γ , IL-1b, IL6, IL8), mátrix-metalloproteinázok (MMP7), adhéziónak molekulák (ICAM1), transzkripciós faktorok (HIF-1A, FOXP3, HBEGF, SOX2, STAT1), kemokinek (CCL3, CR1, CXCL2), növekedési faktorok (CTGF, FGF7) kerültek előtérbe [82, 198-203]; azonban kisebb részük (CEBPB, ESR1, BDNF) az IBD patomechanizmusában betöltött funkciója eddig ismeretlen. Ezen gének szerepét a bélrendszerben már vizsgálják, így IBD-ben további vizsgálatok tárgyát képezhetik.

10. táblázat: *A validálás során vizsgált mikroRNS-ek biológiai folyamatai*

Biológiai funkció	MikroRNS
Apoptózis folyamatának regulálása	miR-18a, -21, -146a, -125a, -126, -204, -221, -223
Baktériumokra adott reakció	miR-21, -31, -125a, -126, -146a, -221, -223
Érűjdonképződés	miR-18a, -20a, -21, -31, -99a, -100, -125a, -126, -146a, -150, -204, -221, -223
Gyógyszerekre adott válasz	miR-20a, -21, -126, -146a, -204, -221, -223
Hegesedés	miR-18a, -20a, -21, -31, -99a, -126, -146a, -150, -204, -221, -223
Immunválasz	miR-21, -31, -125a, -146a, -221, -223
Integrin szabályozta sejtadhézió	miR-21, -31, -100, -126, 146a, -221
Sejt migráció	miR-18a, 20a, -21, -31, -125a, -146a, -221, -223
Sejt szignaling	miR-20a, -21, -126, -204, -221, -223
Sejttaktiváció	miR-21, -31, -126, -146a, -204, -221, -223
Sejtproliferáció szabályozása	miR-20a, -21, -31, -125a, -126, -146a, -204, -221, -223

Több olyan általunk vizsgált mikroRNS célgént találtunk amelyeknek szerepe van a fibrózisban. Felnőtt és gyermekkorban egyaránt fontos szerepe van a gasztrointesztinális traktust érintő fibrózisnak IBD-ben [201]. Az IBD-sek nagy része számos műtéten esik át élete során, melynek legfontosabb oka a striktúra képződés, következményes ileusszal. A fibrózis egy komplex mechanizmus, amelyet a gyulladáso folyamatok, immunsejtek indukálnak és a miofibroblasztok által indukált kollagén képződéssel és lerakódással jár [201, 204]. A bioinformatikai analízisünk eredményeként számos fibrózisban és hegeképződésben szerepet játszó gént sikerült azonosítanunk, melyeket az általunk vizsgált IBD-ben releváns mikroRNS-ek szabályoznak, mint például a kollagének, a CTGF, az FGF, a RHOB, az IL1, az IL6, a CCL3 és az IFNG [201, 204-208].

Ismert a mikrobiom IBD patomechanizmusában betöltött szerepe is. Számos olyan IBD-ben releváns gén került előtérbe, melyek szerepe ismert a baktériumokra adott válaszreakcióban (TLR2, -4, IRAK1) és sejtadhézióban (SELE, ICAM1) [75, 209, 210].

Az apoptózis szintén kulcseleme az IBD patomechanizmusának. Megnö az epitél sejtek „turnover”-e, ami hozzájárul a bél barrier funkciójának károsodásához.

Bioinformatikai elemzésünkkel számos apoptózisban, epitel sejt „turnoverben” szerepet játszó gént igazoltunk (FOS, FSL, FOSB). A gyulladásos sejtek (limfociták, granulociták) ellenállnak az apoptotikus stimulusnak, nekrosis irányába tolják el a folyamatokat, így szövetkárosodáshoz vezetnek. A nekrosis, a nyálkahártya kontrollálatlan sejtpusztulása hozzájárul az IBD-re jellemző fekélyképződéshez [211].

A vizsgálatunkban számos mikroRNS célgénét azonosítottunk, amelyeknek szerepe van az angiogenezisben (HIF1A, IL1B, IL6, ICAM1, MMP13, SELE, SERPINE1) és IBD-ben kutatott [198, 199, 203, 212]. Az intesztinális mikrovaszkulátúra megváltozása fontos az IBD kialakulásában. Az endotélium regulálja a gyulladásos sejtek toborzását, a gyulladásos mediátorok (VEGF, IL17 és TNF- α) termelését [199]. Ebben az összefüggésben érthető, hogy a GO term osztályok között számos kapcsolódik az érújdonképződéshez, érrendszer fejlődéséhez, kollagén metabolizmushoz.

Megvizsgáltuk az UC-s mucosában eltérően expresszált mikroRNS-ek célgénjeit, melyeket összevetettünk UC-s gyermekek colon biopsziás mintáiból készült gén szekvenálási adatokkal. Az UC-s betegek adatait elemezve 5 mikroRNS-t (miR-20a, -126, -141, -142 és -223) és azok UC-ban releváns célgénjeit (ABCG2, ABCB1, PHLPP2, RHOU) kaptuk eredményül. Az ABCG2 és ABCB1 gének kiáramlási transzport fehérjéket kódolnak, fontos szerepet játszanak az intesztinális barrier külső stimulusoktól, például gyógyszerektől való védelmében. Ezek a transzport proteinek felelősek a gyógyszerek elleni rezisztencia kialakulásában. Aktív IBD-sekben mindkét transzporter expressziója csökkent [213, 214]. A miR-142, -181 és -223 expressziója, melyek direkt targetjei ezeknek a transzportereknek, vizsgálatunkban emelkedett szintet mutattak [215-217]. A másik fontos mikroRNS-célgén kapcsolat UC esetén a miR-20 és -141 a PHLPP2 foszfatázhoz való direkt kötődése, mely fontos szerepet tölt be a gyulladás indukálta epiteliális sejt apoptózis és tumor növekedés szuppressziójában [218-220]. A PHLPP2 foszfatáz véd a DSS indukálta colitis esetén, ugyanakkor csökkent szintjét találták a DSS-el kezelt egerek és IBD-s betegek colon mucosájában, ami összefüggést mutat az emelkedett AKT szinttel [219].

(3) Konzerválási módszerek összehasonlítása

A klinikai gyakorlatban a formalinban-fixált, paraffinba ágyazott biopsziás minták könnyebben elérhetőek. Megvizsgáltam, hogy a konzerválás módja befolyásolja-e a mikroRNS expressziót. A miR-146a, -155 és -122 expressziója a formalinban-fixált, paraffinba ágyazott biopsziákban és a fagyasztott mintákban hasonlóképp változott. Eredményeink alapján elmondható, hogy mindkét konzerválási móddal is meghatározható a mikroRNS mintázat.

(4) TNF- α hatása a miR-146a, -155 és -122 expressziójára

A pro-inflammatorikus hatású TNF- α citokin kiemelkedő jelentőségű az IBD patomechanizmusában. A felnőtt betegekben tapasztalt fokozott TNF- α expresszióhoz hasonlóan munkacsoportunk igazolta a TNF- α emelkedett szintjét gyermekkori CD és UC-s betegek nyálkahártyájában is [221]. A gyulladt mucosában felszaporodó T-sejtek által termelt TNF- α számos IBD-ben fontos jelátviteli útvonalat befolyásol, melyek közül az egyik legjelentősebb az NF- κ B-mediált szignalizációs út. Az NF- κ B aktivációja számos IBD-ben releváns gén expresszióját indukálja (IL-1 β , IL-6 és TNF- α). A TNF- α más citokinekkal együtt felelős az immunsejtek toborzásáért és aktivációjáért, valamint az epiteliális barrier funkciójának károsodásáért. A TNF- α szerteágazó hatásai magyarázatot adhatnak az anti-TNF- α terápia hatékonyságára a hagyományos terápiára nem reagáló esetekben is, melyek végül a klinikai remisszió elérése mellett a mucosa gyógyulásához vezetnek [77].

Korábbi tanulmányokból ismert, hogy a TNF- α -indukálta jelátviteli útvonalat a miR-146a, -155 és -122 számos ponton befolyásolhatja [149, 151, 161, 163, 169, 221], azonban nem pontosan tisztázott, hogy a TNF- α milyen módon befolyásolja ezen mikroRNS-ek expresszióját, ezért célul tűztem ki ennek vizsgálatát. Eredményül azt kaptam, hogy colon epitél sejtekben a miR-146a és -155 expressziója megnövekedett rekombináns TNF- α kezelés hatására, míg a miR-122 expressziója nem változott. Mindezek az eredmények tovább igazolják a TNF- α és a miR-146a és -155 szerepét az IBD patomechanizmusában. Jelenleg egy felnőtt vizsgálat van, amely a mikroRNS

expressziót elemzi anti-TNF- α terápia hatására szérumban, azonban jelenleg nincs olyan kutatás, amely a TNF- α elleni kezelés lokális hatását vizsgálná [222].

Az immunrendszer működésében a mikroRNS-ek fontos szerepet töltenek be, így számos immunmediált kórkép patomechanizmusában elemezték jelentőségüket. Több vizsgálat igazolta a mikroRNS-ek szerepét felnőtt IBD-s mintákban, ugyanakkor ezeknek a mikroRNS-eknek a pontos szerepe nem tisztázott. Vizsgálataink igazolták azt, hogy az immunrendszer regulációjában fontos szerepet játszó mikroRNS-ek expressziója változik a CD-s és UC-s gyermekek colon nyálkahártyájában. Ez a megfigyelés alátámasztja ezen mikroRNS-ek jelentőségét az IBD patomechanizmusában. Munkám egyik fontos gyakorlati jelentőségét az adja, hogy a klinikai gyakorlatban könnyebben elérhető formalinban-fixált, paraffinba ágyazott biopsziás minták mikroRNS expressziója hasonló volt a fagyasztott mintákéval, vagyis a konzerválás módja nem befolyásolta a mikroRNS expressziót. Továbbá bizonyítottam, hogy az IBD-ben kulcsfontosságú TNF- α befolyásolja a miR-146a és -155 expresszióját, mely a TNF- α egy eddig ismeretlen hatását tárta fel.

7. Következtetések

Vizsgálataink alapján az alábbi új megállapításokat tehetjük:

1. Új-generációs szekvenálással CD gyermekek biopsziás mintáiban 170 eltérően expresszálódó mikroRNS-t azonosítottunk a kontroll csoporthoz képest, melyek közül 22 mikroRNS a makroszkóposan ép CD és kontroll biopsziák között is eltérést mutatott.
2. A miR-31, -100, -125a, -142-3p, -146a, -150, -185 és -223 CD specifikus markerek lehetnek, amelyek segíthetik a gyermekkori CD és UC differenciálását.
3. A miR-18a, -20a, -31, -100, -185, -204, -221 és -223 expressziója emelkedett CD-s gyermekek ép biopsziás mintáiban a kontroll csoporthoz képest, mely segítheti a makroszkóposan ép nyálkahártya differenciálását.
4. A kapott eredményeinket összevetve a nemzetközi irodalomban megtalálható kutatások alapján elmondhatom, hogy a gyermek és felnőttkori IBD számos hasonlóságot és különbséget mutat. Mindezek az eltérések segíthetik felfedni a felnőtt és gyermekkori IBD patomechanizmusának az eltéréseit.
5. Az új-generációs szekvenálással kapott mikroRNS mintázat célgénjeit tovább elemezve azt kaptuk, hogy a mikroRNS-ek által befolyásolt gének és azok biológiai funkciói kiemelt jelentőségűek a gyulladásos folyamatokban, a fibrózisban, az apoptózis és az angiogenezis szabályozásában, valamint az adott, szituatív mikrobiom kialakításában. Mindezek a biológiai folyamatok részt vesznek az IBD patomechanizmusában, így tovább növelve a mikroRNS-ek szabályozó funkciójának jelentőségét.
6. A konzerválás módja (paraffin vagy fagyasztott minta) nem befolyásolta az általunk vizsgált mikroRNS-ek expressziójának a mértékét (miR-146a, -155 és -122).
7. Az IBD-ben kulcsfontosságú pro-inflammatórikus hatású TNF- α növeli a miR-146a és -155 expresszióját, mely a TNF- α egy eddig ismeretlen hatását tárta fel.

8. Összefoglalás

Az utóbbi évek tudományos közleményei sorra számolnak be a legújabb, rövid, nem-kódoló RNS-ekkel, mikroRNS-ekkel kapcsolatos eredményekről, melyek új kutatási célpontok a gyulladásos bélbetegségek (IBD) patomechanizmusának vizsgálatában. Jelenleg azonban gyermekkori IBD-ben csupán kisszámú vizsgálat foglalkozik a témával. Tekintettel arra, hogy az IBD diagnózisa, progressziójának meghatározása sok esetben nehézségekbe ütközik gyermekkorban, szükség van új biomarkerek felderítésére. IBD patomechanizmusában központi szerepet tölt be a tumor nekrosis faktor (TNF)- α , azonban a TNF- α immunválaszban szerepet játszó mikroRNS-ekre gyakorolt hatása nem pontosan tisztázott.

Célul tűztem ki IBD-s gyermekek biopsziás mintáinak mikroRNS profil meghatározását új-generációs szekvenálással, majd valós idejű polimeráz láncreakcióval (RT-PCR). Ezt követően az érintett mikroRNS-ek célgénjeinek és azok biológiai funkcióinak meghatározását végeztük el. Megvizsgáltam továbbá a TNF- α és az immunválaszban fontos szerepet betöltő mikroRNS-ek (miR-146a, -155 és -122) mennyiségét gyermekkori CD-ben és UC-ban, valamint a TNF- α hatását ezen mikroRNS-ekre colon epitel sejtvonalon.

Munkám során meghatároztuk a CD-s gyermekek colon biopsziás mintáinak mikroRNS mintázatát, ami közelebb vihet a kórkép patomechanizmusának pontosabb megértéséhez, a miR-18a, -20a, -31, -100, -125a, -142-3p, -146a, -150, -185, -204, -221 és -223 potenciális diagnosztikai marker lehet a jövőben. A gyermekkori IBD-ben releváns génlistát tovább elemeztük, biológiai funkciókat rendeltünk hozzájuk. A legfontosabb gyermekkori IBD-hez köthető funkciós csoportok a gyulladásos folyamatok, a fibrózis és az angiogenezis szabályozása.

Mindezek az eredmények tovább növelik az általunk vizsgált mikroRNS-ek jelentőségét a gyermekkori IBD patomechanizmusában, ezáltal potenciális terápiás targetek és differenciál diagnosztikai markerek kerülhetnek előtérbe.

9. Summary

Non-coding small RNAs, called microRNAs (miRs) came recently into focus as promising novel research targets offering new insights into the pathogenesis of inflammatory bowel diseases (IBD), however only a limited number of studies has analyzed the connection between pediatric IBD and miR expression. Since the diagnosis of IBD is often challenging, there is a need to determine new disease biomarkers. Moreover evidences suggest the central role of tumor necrosis factor (TNF)- α in the pathomechanism of IBD, however, its effect on immune-related microRNAs is less known.

The aim of the present study was to characterize a pediatric IBD (pIBD) miR profile, that serves as potential Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) specific diagnostic pattern. My next aim was to further analyze the related target genes and their biological functions of miRs to reveal their complex role in the pathomechanism of IBD. Furthermore, I proposed the comparative investigation of the expression of TNF- α and immune response-related miRs (miR-146a, -155 and -122) in children with CD and UC. The expressions of miR-146a, -155, and -122 were also determined in TNF- α -treated HT-29 colonic epithelial cells.

We demonstrated a pIBD characteristic microRNA pattern by next-generation sequencing and RT-PCR that could facilitate deeper understanding of the pathomechanism of pIBD and miR-18a, -20a, -31, -100, -125a, -142-3p, -146a, -150, -185, -204, -221 és -223 may serve as a diagnostic tool in the future. The target gene screening, annotation, and enrichment analysis of microRNAs identified pIBD-related functional groups and processes including inflammation, fibrosis and angiogenesis.

Thus providing further evidence for the specificity of the miR profile and underlining the potential importance of these regulatory elements in the pathomechanism of pIBD, they could serve as potential differentialdiagnostic markers and therapeutic targets.

10. Irodalomjegyzék

1. Levine A, Koletzko S, Turner D, Escher JC, Cucchiara S, De Ridder L, Kolho KL, Veres G, Russell RK, Paerregaard A, Buderus S, Greer ML, Dias JA, Veereman-Wauters G, Lionetti P, Sladek M, Carpi JM, Staiano A, Ruemmele FM, Wilson DC, (2013) The ESPGHAN Revised Porto Criteria for the Diagnosis of Inflammatory Bowel Disease in Children and Adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 58(6): p. 795-806.
2. Kovács M Fau - Müller KE, Müller Ke Fau - Papp M, Papp M Fau - Lakatos PL, Lakatos Pl Fau - Csöndes M, Csöndes M Fau - Veres G, Veres G, New serological markers in pediatric patients with inflammatory bowel disease. (1007-9327 (Print)).
3. Muller KE, Lakatos PL, Arato A, Kovacs JB, Varkonyi A, Szucs D, Szakos E, Solyom E, Kovacs M, Polgar M, Nemes E, Guthy I, Tokodi I, Toth G, Horvath A, Tarnok A, Csoszanszki N, Balogh M, Vass N, Bodi P, Dezsofi A, Gardos L, Micskey E, Papp M, Cseh A, Szabo D, Voros P, Veres G, (2013) Incidence, Paris Classification, and Follow-up in a Nationwide Incident Cohort of Pediatric Patients With Inflammatory Bowel Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 57(5): p. 576-82.
4. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG, (2012) Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology.* 142(1): p. 46-54 e42; quiz e30.
5. Baldassano RN, Piccoli DA, (1999) Inflammatory bowel disease in pediatric and adolescent patients. *Gastroenterol Clin North Am.* 28(2): p. 445-58.
6. Kim SC, Ferry GD, (2004) Inflammatory bowel diseases in pediatric and adolescent patients: clinical, therapeutic, and psychosocial considerations. *Gastroenterology.* 126(6): p. 1550-60.
7. Perrin JM, Kuhlthau K, Chughtai A, Romm D, Kirschner BS, Ferry GD, Cohen SA, Gold BD, Heyman MB, Baldassano RN, Winter HS, (2008) Measuring quality of

life in pediatric patients with inflammatory bowel disease: psychometric and clinical characteristics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 46(2): p. 164-71.

8. Grover Z, Muir R, Lewindon P, (2014) Exclusive enteral nutrition induces early clinical, mucosal and transmural remission in paediatric Crohn's disease. *J Gastroenterol.* 49(4): p. 638-45.
9. Rigoli L, Caruso RA, (2014) Inflammatory bowel disease in pediatric and adolescent patients: a biomolecular and histopathological review. *World J Gastroenterol.* 20(30): p. 10262-78.
10. Quetglas EG, Mujagic Z, Wigge S, Keszthelyi D, Wachten S, Masclee A, Reinisch W, (2015) Update on pathogenesis and predictors of response of therapeutic strategies used in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology.* 21(44): p. 12519-12543.
11. Iborra M, Bernuzzi F, Correale C, Vetrano S, Fiorino G, Beltran B, Marabita F, Locati M, Spinelli A, Nos P, Invernizzi P, Danese S, (2013) Identification of serum and tissue micro-RNA expression profiles in different stages of inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol.* 173(2): p. 250-8.
12. Ventham NT, Kennedy NA, Nimmo ER, Satsangi J, (2013) Beyond gene discovery in inflammatory bowel disease: the emerging role of epigenetics. *Gastroenterology.* 145(2): p. 293-308.
13. Ye Y, Pang Z, Chen W, Ju S, Zhou C, (2015) The epidemiology and risk factors of inflammatory bowel disease. *Int J Clin Exp Med.* 8(12): p. 22529-42.
14. Burisch J, Pedersen N, Cukovic-Cavka S, Brinar M, Kaimakliotis I, Duricova D, Shonova O, Vind I, Avnstrom S, Thorsgaard N, Andersen V, Krabbe S, Dahlerup JF, Salupere R, Nielsen KR, Olsen J, Manninen P, Collin P, Tsianos EV, Katsanos KH, Ladefoged K, Lakatos L, Bjornsson E, Ragnarsson G, Bailey Y, Odes S, Schwartz D, Martinato M, Lupinacci G, Milla M, De Padova A, D'inca R, Beltrami M, Kupcinkas L, Kiudelis G, Turcan S, Tighineanu O, Mihu I, Magro F, Barros LF, Goldis A, Lazar D, Belousova E, Nikulina I, Hernandez V, Martinez-Ares D, Almer S, Zhulina Y, Halfvarson J, Arebi N, Sebastian S, Lakatos PL, Langholz E, Munkholm P, Epicom G, (2014) East-West gradient in the incidence of inflammatory bowel disease in Europe: the ECCO-EpiCom inception cohort. *Gut.* 63(4): p. 588-97.

15. Müller Ke H, Veres G, (2013) A gyermekkori gyulladásoos bélbetegségek hazai regiszterének (HUPIR) eredményei és az 5 éves nyomonkövetés hatása a diagnosztikai gyakorlatra. *Magyar Belorvosi Archivum*. 66: p. 215-222.
16. Kovacs M, Muller KE, Arato A, Lakatos PL, Kovacs JB, Varkonyi A, Solyom E, Polgar M, Nemes E, Guthy I, Tokodi I, Toth G, Horvath A, Tarnok A, Tomsits E, Csozanszky N, Balogh M, Vass N, Bodi P, Dezsofi A, Gardos L, Micskey E, Papp M, Szucs D, Cseh A, Molnar K, Szabo D, Veres G, Hungarian IBDRG, (2012) Diagnostic yield of upper endoscopy in paediatric patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. Subanalysis of the HUPIR registry. *J Crohns Colitis*. 6(1): p. 86-94.
17. Sawczenko A, Sandhu BK, (2003) Presenting features of inflammatory bowel disease in Great Britain and Ireland. *Arch Dis Child*. 88(11): p. 995-1000.
18. Schwartz DA, Loftus EV, Jr., Tremaine WJ, Panaccione R, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ, (2002) The natural history of fistulizing Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology*. 122(4): p. 875-80.
19. Levine A, Koletzko S, Turner D, Escher JC, Cucchiara S, De Ridder L, Kolho KL, Veres G, Russell RK, Paerregaard A, Buderus S, Greer ML, Dias JA, Veereman-Wauters G, Lionetti P, Sladek M, Martin De Carpi J, Staiano A, Ruemmele FM, Wilson DC, European Society of Pediatric Gastroenterology H, Nutrition, (2014) ESPGHAN revised porto criteria for the diagnosis of inflammatory bowel disease in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 58(6): p. 795-806.
20. Andrisani G, Guidi L, Papa A, Armuzzi A, (2012) Anti-TNF alpha therapy in the management of extraintestinal manifestation of inflammatory bowel disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 16(7): p. 890-901.
21. Ott C, Schölmerich J, (2013) Extraintestinal manifestations and complications in IBD. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 10: p. 585-598.
22. Maggiori L, Panis Y, (2013) Surgical management of IBD-from an open to a laparoscopic approach. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 10(5): p. 297-306.
23. Lakatos L, Kiss LS, David G, Pandur T, Erdelyi Z, Mester G, Balogh M, Szipocs I, Molnar C, Komaromi E, Lakatos PL, (2011) Incidence, Disease Phenotype at Diagnosis, and Early Disease Course in Inflammatory Bowel Diseases in Western Hungary, 2002-2006. *Inflammatory Bowel Diseases*. 17(12): p. 2558-2565.

24. Dignass A, Eliakim R, Magro F, Maaser C, Chowers Y, Geboes K, Mantzaris G, Reinisch W, Colombel JF, Vermeire S, Travis S, Lindsay JO, Van Assche G, Ecco, (2012) Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis Part 1: Definitions and diagnosis. *Journal of Crohns & Colitis*. 6(10): p. 965-990.
25. Lakatos L, Mester G, Erdelyi Z, Balogh M, Szipocs I, Kamaras G, Lakatos PL, (2004) Striking elevation in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in a province of western Hungary between 1977-2001. *World Journal of Gastroenterology*. 10(3): p. 404-409.
26. Van Limbergen J, Russell RK, Drummond HE, Aldhous MC, Round NK, Nimmo ER, Smith L, Gillett PM, McGrogan P, Weaver LT, Bisset WM, Mahdi G, Arnott ID, Satsangi J, Wilson DC, (2008) Definition of phenotypic characteristics of childhood-onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 135(4): p. 1114-22.
27. Levine A, Griffiths A, Markowitz J, Wilson DC, Turner D, Russell RK, Fell J, Ruemmele FM, Walters T, Sherlock M, Dubinsky M, Hyams JS, (2011) Pediatric modification of the Montreal classification for inflammatory bowel disease: the Paris classification. *Inflamm Bowel Dis*. 17(6): p. 1314-21.
28. Hyams JS, Ferry GD, Mandel FS, Gryboski JD, Kibort PM, Kirschner BS, Griffiths AM, Katz AJ, Grand RJ, Boyle JT, Et Al., (1991) Development and validation of a pediatric Crohn's disease activity index. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 12(4): p. 439-47.
29. Turner D, Griffiths AM, Walters TD, Seah T, Markowitz J, Pfefferkorn M, Keljo D, Waxman J, Otley A, Leleiko NS, Mack D, Hyams J, Levine A, (2012) Mathematical weighting of the pediatric Crohn's disease activity index (PCDAI) and comparison with its other short versions. *Inflamm Bowel Dis*. 18(1): p. 55-62.
30. Turner D, Levine A, Escher JC, Griffiths AM, Russell RK, Dignass A, Dias JA, Bronsky J, Braegger CP, Cucchiara S, De Ridder L, Fagerberg UL, Hussey S, Hugot JP, Kolacek S, Kolho KL, Lionetti P, Paerregaard A, Potapov A, Rintala R, Serban DE, Staiano A, Sweeny B, Veerman G, Veres G, Wilson DC, Ruemmele FM, European CS, Colitis O, European Society for Paediatric Gastroenterology H, Nutrition, (2012) Management of pediatric ulcerative colitis: joint ECCO and

- ESPGHAN evidence-based consensus guidelines. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 55(3): p. 340-61.
31. Annese V, Daperno M, Rutter MD, Amiot A, Bossuyt P, East J, Ferrante M, Gotz M, Katsanos KH, Kiesslich R, Ordas I, Repici A, Rosa B, Sebastian S, Kucharzik T, Eliakim R, European CS, Colitis O, (2013) European evidence based consensus for endoscopy in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis.* 7(12): p. 982-1018.
 32. Eliakim R, Magro F, (2014) Imaging techniques in IBD and their role in follow-up and surveillance. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology.* 11(12): p. 722-736.
 33. Flamant M, Trang C, Maillard O, Sacher-Huvelin S, Le Rhun M, Galmiche JP, Bourreille A, (2013) The prevalence and outcome of jejunal lesions visualized by small bowel capsule endoscopy in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 19(7): p. 1390-6.
 34. Muller KE, Lakatos PL, Papp M, Veres G, (2013) [Frequency and characteristics of granulomas in 368 pediatric patients with Crohn's disease]. *Orv Hetil.* 154(43): p. 1702-8.
 35. Ruemmele FM, Veres G, Kolho KL, Griffiths A, Levine A, Escher JC, Amil Dias J, Barabino A, Braegger CP, Bronsky J, Buderus S, Martin-De-Carpi J, De Ridder L, Fagerberg UL, Hugot JP, Kierkus J, Kolacek S, Koletzko S, Lionetti P, Miele E, Navas Lopez VM, Paerregaard A, Russell RK, Serban DE, Shaoul R, Van Rheenen P, Veereman G, Weiss B, Wilson D, Dignass A, Eliakim A, Winter H, Turner D, Ecco/Espghan, (2014) Consensus guidelines of ECCO/ESPGHAN on the medical management of pediatric Crohn's disease. *J Crohns Colitis.* 8(10): p. 1179-207.
 36. Brant SR, Shugart YY, (2004) Inflammatory bowel disease gene hunting by linkage analysis: rationale, methodology, and present status of the field. *Inflamm Bowel Dis.* 10(3): p. 300-11.
 37. Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, Lappalainen M, Farkkila M, Kontula K, (2006) Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 12(23): p. 3668-72.

38. Satsangi J, Jewell DP, Fau - Bell JI, Bell JI, The genetics of inflammatory bowel disease. (0017-5749 (Print)).
39. Orchard TR, Satsangi J, Van Heel D, Jewell DP, (2000) Genetics of inflammatory bowel disease: A reappraisal. *Scandinavian Journal of Immunology*. 51(1): p. 10-17.
40. Liu JZ, Van Sommeren S, Huang H, Ng SC, Alberts R, Takahashi A, Ripke S, Lee JC, Jostins L, Shah T, Abedian S, Cheon JH, Cho J, Daryani NE, Franke L, Fuyuno Y, Hart A, Juyal RC, Juyal G, Kim WH, Morris AP, Poustchi H, Newman WG, Midha V, Orchard TR, Vahedi H, Sood A, Sung JJ, Malekzadeh R, Westra HJ, Yamazaki K, Yang SK, International Multiple Sclerosis Genetics C, International IBDGC, Barrett JC, Franke A, Alizadeh BZ, Parkes M, B KT, Daly MJ, Kubo M, Anderson CA, Weersma RK, (2015) Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet*. 47(9): p. 979-86.
41. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, Lee JC, Schumm LP, Sharma Y, Anderson CA, Essers J, Mitrovic M, Ning K, Cleynen I, Theatre E, Spain SL, Raychaudhuri S, Goyette P, Wei Z, Abraham C, Achkar JP, Ahmad T, Amininejad L, Ananthakrishnan AN, Andersen V, Andrews JM, Baidoo L, Balschun T, Bampton PA, Bitton A, Boucher G, Brand S, Buning C, Cohain A, Cichon S, D'amato M, De Jong D, Devaney KL, Dubinsky M, Edwards C, Ellinghaus D, Ferguson LR, Franchimont D, Fransen K, Gearry R, Georges M, Gieger C, Glas J, Haritunians T, Hart A, Hawkey C, Hedl M, Hu XL, Karlsen TH, Kupcinskis L, Kugathasan S, Latiano A, Laukens D, Lawrance IC, Lees CW, Louis E, Mahy G, Mansfield J, Morgan AR, Mowat C, Newman W, Palmieri O, Ponsioen CY, Potocnik U, Prescott NJ, Regueiro M, Rotter JJ, Russell RK, Sanderson JD, Sans M, Satsangi J, Schreiber S, Simms LA, Sventoraityte J, Targan SR, Taylor KD, Tremelling M, Verspaget HW, De Vos M, Wijmenga C, Wilson DC, Winkelmann J, Xavier RJ, Zeissig S, Zhang B, Zhang CK, Zhao HY, Silverberg MS, Annese V, Hakonarson H, Brant SR, Radford-Smith G, Mathew CG, Rioux JD, Schadt EE, Daly MJ, Franke A, Parkes M, Vermeire S, Barrett JC, Cho JH, IIBDGC IIGC, (2012) Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. 491(7422): p. 119-124.

42. Brand S, (2009) Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut*. 58(8): p. 1152-1167.
43. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'amato M, Taylor KD, Lee JC, Goyette P, Imielinski M, Latiano A, Lagace C, Scott R, Amininejad L, Bumpstead S, Baidoo L, Baldassano RN, Barclay M, Bayless TM, Brand S, Buning C, Colombel JF, Denson LA, De Vos M, Dubinsky M, Edwards C, Ellinghaus D, Fehrmann RS, Floyd JA, Florin T, Franchimont D, Franke L, Georges M, Glas J, Glazer NL, Guthery SL, Haritunians T, Hayward NK, Hugot JP, Jobin G, Laukens D, Lawrance I, Lemann M, Levine A, Libioulle C, Louis E, McGovern DP, Milla M, Montgomery GW, Morley KI, Mowat C, Ng A, Newman W, Ophoff RA, Papi L, Palmieri O, Peyrin-Biroulet L, Panes J, Phillips A, Prescott NJ, Proctor DD, Roberts R, Russell R, Rutgeerts P, Sanderson J, Sans M, Schumm P, Seibold F, Sharma Y, Simms LA, Seielstad M, Steinhardt AH, Targan SR, Van Den Berg LH, Vatn M, Verspaget H, Walters T, Wijmenga C, Wilson DC, Westra HJ, Xavier RJ, Zhao ZZ, Ponsioen CY, Andersen V, Torkvist L, Gazouli M, Anagnou NP, Karlsen TH, Kupcinskis L, Sventoraityte J, Mansfield JC, Kugathasan S, Silverberg MS, Halfvarson J, Rotter JI, Mathew CG, Griffiths AM, Gearry R, Ahmad T, Brant SR, Chamaillard M, Satsangi J, Cho JH, Schreiber S, Daly MJ, Barrett JC, Parkes M, Annesse V, Hakonarson H, Radford-Smith G, Duerr RH, Vermeire S, Weersma RK, Rioux JD, (2011) Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet*. 43(3): p. 246-52.
44. Chen Y, Wang C, Liu Y, Tang L, Zheng M, Xu C, Song J, Meng X, (2013) miR-122 targets NOD2 to decrease intestinal epithelial cell injury in Crohn's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 438(1): p. 133-9.
45. Lakatos PL, Lakatos L, Szalay F, Willheim-Polli C, Osterreicher C, Tulassay Z, Molnar T, Reinisch W, Papp J, Mozsik G, Ferenci P, Hungarian IBDSG, (2005) Toll-like receptor 4 and NOD2/CARD15 mutations in Hungarian patients with Crohn's disease: phenotype-genotype correlations. *World J Gastroenterol*. 11(10): p. 1489-95.
46. Brand S, (2013) Moving the genetics of inflammatory bowel diseases from bench to bedside: first steps towards personalised medicine. *Gut*. 62(11): p. 1531-3.

47. Zheng CQ, Hu GZ, Zeng ZS, Lin LJ, Gu GG, (2003) Progress in searching for susceptibility gene for inflammatory bowel disease by positional cloning. *World J Gastroenterol.* 9(8): p. 1646-56.
48. Jurgens M, Brand S, Laubender RP, Seiderer J, Glas J, Wetzke M, Wagner J, Pfennig S, Tillack C, Beigel F, Weidinger M, Schnitzler F, Kreis ME, Goke B, Lohse P, Herrmann K, Ochsenkuhn T, (2010) The presence of fistulas and NOD2 homozygosity strongly predict intestinal stenosis in Crohn's disease independent of the IL23R genotype. *J Gastroenterol.* 45(7): p. 721-31.
49. Bianco AM, Girardelli M, Tommasini A, (2015) Genetics of inflammatory bowel disease from multifactorial to monogenic forms. *World J Gastroenterol.* 21(43): p. 12296-310.
50. Rufini S, Ciccacci C, Di Fusco D, Ruffa A, Pallone F, Novelli G, Biancone L, Borgiani P, (2015) Autophagy and inflammatory bowel disease: Association between variants of the autophagy-related IRGM gene and susceptibility to Crohn's disease. *Digestive and Liver Disease.* 47(9): p. 744-750.
51. Kammermeier J, Dziubak R, Pescarin M, Drury S, Godwin H, Reeve K, Chadokufa S, Huggett B, Sider S, James C, Acton N, Cernat E, Gasparetto M, Noble-Jamieson G, Kiparissi F, Elawad M, Beales PL, Sebire NJ, Gilmour K, Uhlig HH, Bacchelli C, Shah N, Phenotypic and genotypic characterisation of inflammatory bowel disease presenting before the age of two years. *LID - jjw118 [pii].* (1876-4479 (Electronic)).
52. Beser OF, Conde CD, Serwas NK, Cokugras FC, Kutlu T, Boztug K, Erkan T, (2015) Clinical Features of Interleukin 10 Receptor Gene Mutations in Children With Very Early-Onset Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.* 60(3): p. 332-338.
53. Parkes GC, Whelan K, Lindsay JO, (2014) Smoking in inflammatory bowel disease: Impact on disease course and insights into the aetiology of its effect. *Journal of Crohns & Colitis.* 8(8): p. 717-725.
54. Strisciuglio C, Giugliano FP, Martinelli M, Cenni S, Greco L, Staiano A, Miele E, (2016) Impact of Environmental and Familial Factors in a Cohort of Pediatric Patients with Inflammatory Bowel Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* (1536-4801 (Electronic)).

55. Koloski Na Fau - Bret L, Bret L Fau - Radford-Smith G, Radford-Smith G, Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: a critical review of the literature. (1007-9327 (Print)).
56. Chassaing B, Koren O, Goodrich JK, Poole AC, Srinivasan S, Ley RE, Gewirtz AT, (2015) Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature*. 519(7541): p. 92-6.
57. Devkota S, Chang EB, (2015) Interactions between Diet, Bile Acid Metabolism, Gut Microbiota, and Inflammatory Bowel Diseases. *Digestive Diseases*. 33(3): p. 351-356.
58. Hugot JP, Alberti C, Berrebi D, Bingen E, Cezard JP, (2003) Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Lancet*. 362(9400): p. 2012-5.
59. Rautava S, (2016) Early microbial contact, the breast milk microbiome and child health. *J Dev Orig Health Dis*. 7(1): p. 5-14.
60. Parigi SM, Eldh M, Larssen P, Gabrielsson S, Villablanca EJ, (2015) Breast Milk and Solid Food Shaping Intestinal Immunity. *Front Immunol*. 6(1664-3224 (Electronic)): p. 415.
61. Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN, (2010) Association Between the Use of Antibiotics in the First Year of Life and Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *American Journal of Gastroenterology*. 105(12): p. 2687-2692.
62. Sheehan D, Moran C, Shanahan F, (2015) The microbiota in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. 50(5): p. 495-507.
63. Yassour M, Vatanen T, Siljander H, Hamalainen AM, Harkonen T, Ryhanen SJ, Franzosa EA, Vlamakis H, Huttenhower C, Gevers D, Lander ES, Knip M, Group DS, Xavier RJ, (2016) Natural history of the infant gut microbiome and impact of antibiotic treatment on bacterial strain diversity and stability. *Sci Transl Med*. 8(343): p. 343ra81.
64. Duggan AE, Usmani I, Neal KR, Logan RF, (1998) Appendectomy, childhood hygiene, *Helicobacter pylori* status, and risk of inflammatory bowel disease: a case control study. *Gut*. 43(4): p. 494-8.
65. Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, Bonazzi V, Mcewen JE, Wetterstrand KA, Deal C, Baker CC, Di Francesco V, Howcroft TK, Karp RW, Lunsford RD, Wellington CR, Belachew T, Wright M, Giblin C, David H,

- Mills M, Salomon R, Mullins C, Akolkar B, Begg L, Davis C, Grandison L, Humble M, Khalsa J, Little AR, Peavy H, Pontzer C, Portnoy M, Sayre MH, Starke-Reed P, Zakhari S, Read J, Watson B, Guyer M, (2009) The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* 19(12): p. 2317-23.
66. Wu GD, Lewis JD, (2013) Analysis of the human gut microbiome and association with disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 11(7): p. 774-7.
67. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin AS, Varma Y, Fischbach MA, Biddinger SB, Dutton RJ, Turnbaugh PJ, (2014) Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature.* 505(7484): p. 559-63.
68. Hold GL, Smith M, Grange C, Watt ER, El-Omar EM, Mukhopadhyaya I, (2014) Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: what have we learnt in the past 10 years? *World J Gastroenterol.* 20(5): p. 1192-210.
69. Béres N SE, Arató A., Veres G. , (2015) A széklettranszplantáció jelentősége a gasztroenterológiában. *Gyermekgyógyászat.* 66(4): p. 241-246.
70. Brandt LJ, Aroniadis OC, (2013) An overview of fecal microbiota transplantation: techniques, indications, and outcomes. *Gastrointestinal Endoscopy.* 78(2): p. 240-9.
71. Brandt LJ, Aroniadis OC, Mellow M, Kanatzar A, Kelly C, Park T, Stollman N, Rohlke F, Surawicz C, (2012) Long-term follow-up of colonoscopic fecal microbiota transplant for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Am J Gastroenterol.* 107(7): p. 1079-87.
72. Peterson LW, Artis D, (2014) Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 14(3): p. 141-53.
73. Duerkop BA, Vaishnava S, Hooper LV, (2009) Immune Responses to the Microbiota at the Intestinal Mucosal Surface. *Immunity.* 31(3): p. 368-376.
74. Runtsch MC, Round JL, O'connell RM, (2014) MicroRNAs and the regulation of intestinal homeostasis. *Front Genet.* 5(1664-8021 (Electronic)): p. 347.
75. Szebeni B, Veres G, Dezsofi A, Rusai K, Vannay A, Mraz M, Majorova E, Arato A, (2008) Increased expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol.* 151(1): p. 34-41.

76. Murch SH, Braegger CP, Walker-Smith JA, Macdonald TT, (1993) Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut*. 34(12): p. 1705-9.
77. Mouzaoui S, Djerdjouri B, Makhezer N, Kroviarski Y, El-Benna J, Dang PM, (2014) Tumor necrosis factor-alpha-induced colitis increases NADPH oxidase 1 expression, oxidative stress, and neutrophil recruitment in the colon: preventive effect of apocynin. *Mediators Inflamm*. 2014: p. 312484.
78. Komatsu M, Kobayashi D, Saito K, Furuya D, Yagihashi A, Araake H, Tsuji N, Sakamaki S, Niitsu Y, Watanabe N, (2001) Tumor necrosis factor-alpha in serum of patients with inflammatory bowel disease as measured by a highly sensitive immuno-PCR. *Clin Chem*. 47(7): p. 1297-301.
79. Dionne S, Hiscott J, D'agata I, Duhaime A, Seidman EG, (1997) Quantitative PCR analysis of TNF-alpha and IL-1 beta mRNA levels in pediatric IBD mucosal biopsies. *Dig Dis Sci*. 42(7): p. 1557-66.
80. Pak S, Holland N, Garnett EA, Mileti E, Mahadevan U, Beckert R, Kanwar B, Heyman MB, (2012) Cytokine profiles in peripheral blood of children and adults with Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 54(6): p. 769-75.
81. Wu F, Zikusoka M, Trindade A, Dassopoulos T, Harris ML, Bayless TM, Brant SR, Chakravarti S, Kwon JH, (2008) MicroRNAs are differentially expressed in ulcerative colitis and alter expression of macrophage inflammatory peptide-2 alpha. *Gastroenterology*. 135(5): p. 1624-1635 e24.
82. Neurath MF, (2014) Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 14(5): p. 329-42.
83. Dunne A, O'Neill LA, (2005) Adaptor usage and Toll-like receptor signaling specificity. *FEBS Lett*. 579(15): p. 3330-5.
84. Rebane A, Akdis CA, (2013) MicroRNAs: Essential players in the regulation of inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 132(1): p. 15-26.
85. Montagner S, Orlandi EM, Merante S, Monticelli S, (2013) The role of miRNAs in mast cells and other innate immune cells. *Immunol Rev*. 253(1): p. 12-24.
86. Feagins LA, (2010) Role of transforming growth factor-beta in inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. *Inflamm Bowel Dis*. 16(11): p. 1963-8.

87. Chong SY, Vickaryous N, Ashe A, Zamudio N, Youngson N, Hemley S, Stopka T, Skoultchi A, Matthews J, Scott HS, De Kretser D, O'bryan M, Blewitt M, Whitelaw E, (2007) Modifiers of epigenetic reprogramming show paternal effects in the mouse. *Nature Genetics*. 39(5): p. 614-622.
88. Mattick JS, Makunin IV, (2006) Non-coding RNA. *Hum Mol Genet*. 15 Spec No 1(0964-6906 (Print)): p. R17-29.
89. Bhartiya D, Scaria V, Genomic variations in non-coding RNAs: Structure, function and regulation. LID - S0888-7543(16)30005-2 [pii] LID - 10.1016/j.ygeno.2016.01.005 [doi]. (1089-8646 (Electronic)).
90. Chapman CG, Pekow J, (2015) The emerging role of miRNAs in inflammatory bowel disease: a review. *Therap Adv Gastroenterol*. 8(1): p. 4-22.
91. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75(5): p. 843-54.
92. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N, (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*. 9(2): p. 102-14.
93. Lu LF, Liston A, (2009) MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system. *Immunology*. 127(3): p. 291-8.
94. Sevignani C, Calin GA, Siracusa LD, Croce CM, (2006) Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression. *Mamm Genome*. 17(3): p. 189-202.
95. Dai R, Ahmed SA, (2011) MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. *Transl Res*. 157(4): p. 163-79.
96. Van Der Ree MH, Van Der Meer AJ, Van Nuenen AC, De Bruijne J, Ottosen S, Janssen HL, Kootstra NA, Reesink HW, Miravirsen dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma. (1365-2036 (Electronic)).
97. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D, (2006) NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(33): p. 12481-6.

98. Quinn EM, Wang Jh Fau - O'callaghan G, O'callaghan G Fau - Redmond HP, Redmond HP, MicroRNA-146a is upregulated by and negatively regulates TLR2 signaling. (1932-6203 (Electronic)).
99. Boldin MP, Taganov KD, Rao DS, Yang L, Zhao JL, Kalwani M, Garcia-Flores Y, Luong M, Devrekanli A, Xu J, Sun G, Tay J, Linsley PS, Baltimore D, (2011) miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *J Exp Med.* 208(6): p. 1189-201.
100. Ceribelli A, Satoh M, Chan EK, (2012) MicroRNAs and autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 24(6): p. 686-91.
101. Chassin C, Kocur M, Pott J, Duerr CU, Gutle D, Lotz M, Hornef MW, (2010) miR-146a mediates protective innate immune tolerance in the neonate intestine. *Cell Host Microbe.* 8(4): p. 358-68.
102. Perry MM, Moschos SA, Williams AE, Shepherd NJ, Larner-Svensson HM, Lindsay MA, (2008) Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *J Immunol.* 180(8): p. 5689-98.
103. O'connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng GH, Baltimore D, (2007) MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 104(5): p. 1604-1609.
104. Tili E, Michaille JJ, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, Adair B, Fabbri M, Alder H, Liu CG, Calin GA, Croce CM, (2007) Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *Journal of Immunology.* 179(8): p. 5082-5089.
105. O'connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Boldin MP, Taganov KD, Nicoll J, Paquette RL, Baltimore D, (2008) Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J Exp Med.* 205(3): p. 585-94.
106. Raisch J, Darfeuille-Michaud A, Nguyen HT, (2013) Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer. *World J Gastroenterol.* 19(20): p. 2985-96.

107. Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, Van Dongen S, Grocock RJ, Das PP, Miska EA, Vetrie D, Okkenhaug K, Enright AJ, Dougan G, Turner M, Bradley A, (2007) Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science*. 316(5824): p. 608-11.
108. Sheedy FJ, Palsson-Mcdermott E, Hennessy EJ, Martin C, O'leary JJ, Ruan Q, Johnson DS, Chen Y, O'Neill LA, (2010) Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat Immunol*. 11(2): p. 141-7.
109. Bazzoni F, Rossato M, Fabbri M, Gaudiosi D, Mirolo M, Mori L, Tamassia N, Mantovani A, Cassatella MA, Locati M, (2009) Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(13): p. 5282-7.
110. Liu G, Friggeri A, Yang YP, Park YJ, Tsuruta Y, Abraham E, (2009) miR-147, a microRNA that is induced upon Toll-like receptor stimulation, regulates murine macrophage inflammatory responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106(37): p. 15819-15824.
111. O'Neill LA, Sheedy FJ, Mccoy CE, (2011) MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 11(3): p. 163-75.
112. Merkerova M, Belickova M, Bruchova H, (2008) Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages. *Eur J Haematol*. 81(4): p. 304-10.
113. Haneklaus M, Gerlic M, O'Neill LA, Masters SL, (2013) miR-223: infection, inflammation and cancer. *J Intern Med*. 274(3): p. 215-26.
114. Wu H, Neilson JR, Kumar P, Manocha M, Shankar P, Sharp PA, Manjunath N, (2007) miRNA profiling of naive, effector and memory CD8 T cells. *PLoS One*. 2(10): p. e1020.
115. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D, (2007) MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(5): p. 1604-9.
116. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D, (2010) Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 10(2): p. 111-22.

117. Zhou B, Wang S, Fau - Mayr C, Mayr C, Fau - Bartel DP, Bartel DP, Fau - Lodish HF, Lodish HF, miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. (0027-8424 (Print)).
118. Xiao C, Calado DP, Galler G, Thai TH, Patterson HC, Wang J, Rajewsky N, Bender TP, Rajewsky K, (2007) MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell*. 131(1): p. 146-59.
119. Li QJ, Chau J, Ebert PJR, Sylvester G, Min H, Liu G, Braich R, Manoharan M, Soutschek J, Skare P, Klein LO, Davis MM, Chen CZ, (2007) miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell*. 129(1): p. 147-161.
120. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP, (2004) MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*. 303(5654): p. 83-6.
121. Xiao C, Srinivasan L, Calado DP, Patterson HC, Zhang B, Wang J, Henderson JM, Kutok JL, Rajewsky K, (2008) Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol*. 9(4): p. 405-14.
122. Rao DS, O'connell RM, Chaudhuri AA, Garcia-Flores Y, Geiger TL, Baltimore D, (2010) MicroRNA-34a perturbs B lymphocyte development by repressing the forkhead box transcription factor Foxp1. *Immunity*. 33(1): p. 48-59.
123. Wu F, Zhang S, Dassopoulos T, Harris ML, Bayless TM, Meltzer SJ, Brant SR, Kwon JH, (2010) Identification of microRNAs associated with ileal and colonic Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 16(10): p. 1729-38.
124. Takahashi H, Kanno T, Nakayama S, Hirahara K, Sciume G, Muljo SA, Kuchen S, Casellas R, Wei L, Kanno Y, O'shea JJ, (2012) TGF-beta and retinoic acid induce the microRNA miR-10a, which targets Bcl-6 and constrains the plasticity of helper T cells. *Nature Immunology*. 13(6): p. 587-+.
125. Koukos G, Polytarchou C, Kaplan JL, Morley-Fletcher A, Gras-Miralles B, Kokkotou E, Baril-Dore M, Pothoulakis C, Winter HS, Iliopoulos D, (2013) MicroRNA-124 Regulates STAT3 Expression and Is Down-regulated in Colon Tissues of Pediatric Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*. 145(4): p. 842-+.
126. Ye D, Guo S, Al-Sadi R, Ma TY, (2011) MicroRNA regulation of intestinal epithelial tight junction permeability. *Gastroenterology*. 141(4): p. 1323-33.

127. Yang YZ, Ma YL, Shi CZ, Chen HQ, Zhang HZ, Chen NW, Zhang P, Wang F, Yang J, Yang JJ, Zhu QC, Liang Y, Wu W, Gao RY, Yang Z, Zou Y, Qin HL, (2013) Overexpression of miR-21 in patients with ulcerative colitis impairs intestinal epithelial barrier function through targeting the Rho GTPase RhoB. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 434(4): p. 746-752.
128. Shi CZ, Liang Y, Yang J, Xia Y, Chen HQ, Han HZ, Yang YZ, Wu W, Gao RY, Qin HL, (2013) MicroRNA-21 Knockout Improve the Survival Rate in DSS Induced Fatal Colitis through Protecting against Inflammation and Tissue Injury. *Plos One*. 8(6).
129. Huang Z, Shi T, Zhou Q, Shi S, Zhao R, Shi H, Dong L, Zhang C, Zeng K, Chen J, Zhang J, (2014) miR-141 Regulates colonic leukocytic trafficking by targeting CXCL12beta during murine colitis and human Crohn's disease. *Gut*. 63(8): p. 1247-57.
130. Das LM, Torres-Castillo MD, Gill T, Levine AD, (2013) TGF-beta conditions intestinal T cells to express increased levels of miR-155, associated with down-regulation of IL-2 and itk mRNA. *Mucosal Immunol*. 6(1): p. 167-76.
131. Brain O, Owens BM, Pichulik T, Allan P, Khatamzas E, Leslie A, Steevels T, Sharma S, Mayer A, Catuneanu AM, Morton V, Sun MY, Jewell D, Coccia M, Harrison O, Maloy K, Schonefeldt S, Bornschein S, Liston A, Simmons A, (2013) The intracellular sensor NOD2 induces microRNA-29 expression in human dendritic cells to limit IL-23 release. *Immunity*. 39(3): p. 521-36.
132. Ghorpade DS, Sinha AY, Holla S, Singh V, Balaji KN, (2013) NOD2-nitric oxide-responsive microRNA-146a activates Sonic hedgehog signaling to orchestrate inflammatory responses in murine model of inflammatory bowel disease. *J Biol Chem*. 288(46): p. 33037-48.
133. Chivukula RR, Shi G, Acharya A, Mills EW, Zeitels LR, Anandam JL, Abdelnaby AA, Balch GC, Mansour JC, Yopp AC, Maitra A, Mendell JT, (2014) An essential mesenchymal function for miR-143/145 in intestinal epithelial regeneration. *Cell*. 157(5): p. 1104-16.
134. Homer CR, Richmond AL, Rebert NA, Achkar JP, Mcdonald C, (2010) ATG16L1 and NOD2 interact in an autophagy-dependent antibacterial pathway

- implicated in Crohn's disease pathogenesis. *Gastroenterology*. 139(5): p. 1630-41, 1641 e1-2.
135. Brest P, Lapaquette P, Souidi M, Lebrigand K, Cesaro A, Vouret-Craviari V, Mari B, Barbry P, Mosnier JF, Hebuterne X, Harel-Bellan A, Mograbi B, Darfeuille-Michaud A, Hofman P, (2011) A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat Genet*. 43(3): p. 242-5.
136. Lu C, Chen J, Xu HG, Zhou X, He Q, Li YL, Jiang G, Shan Y, Xue B, Zhao RX, Wang Y, Werle KD, Cui R, Liang J, Xu ZX, (2014) MIR106B and MIR93 prevent removal of bacteria from epithelial cells by disrupting ATG16L1-mediated autophagy. *Gastroenterology*. 146(1): p. 188-99.
137. Schaefer JS, Attumi T, Opekun AR, Abraham B, Hou J, Shelby H, Graham DY, Streckfus C, Klein JR, (2015) MicroRNA signatures differentiate Crohn's disease from ulcerative colitis. *BMC Immunol*. 16(5): p. 5.
138. Fasseu M, Treton X, Guichard C, Pedruzzi E, Cazals-Hatem D, Richard C, Aparicio T, Daniel F, Soule JC, Moreau R, Bouhnik Y, Laburthe M, Groyer A, Ogier-Denis E, (2010) Identification of restricted subsets of mature microRNA abnormally expressed in inactive colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *PLoS One*. 5(10).
139. Lin J, Welker NC, Zhao Z, Li Y, Zhang J, Reuss SA, Zhang X, Lee H, Liu Y, Bronner MP, (2014) Novel specific microRNA biomarkers in idiopathic inflammatory bowel disease unrelated to disease activity. *Mod Pathol*. 27(4): p. 602-8.
140. Takagi T, Naito Y, Mizushima K, Hirata I, Yagi N, Tomatsuri N, Ando T, Oyamada Y, Isozaki Y, Hongo H, Uchiyama K, Handa O, Kokura S, Ichikawa H, Yoshikawa T, (2010) Increased expression of microRNA in the inflamed colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 25 Suppl 1: p. S129-33.
141. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M, (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers

- for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105(30): p. 10513-10518.
142. Wu F, Guo NJ, Tian H, Marohn M, Gearhart S, Bayless TM, Brant SR, Kwon JH, (2011) Peripheral blood microRNAs distinguish active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 17(1): p. 241-50.
143. Paraskevi A, Theodoropoulos G, Papaconstantinou I, Mantzaris G, Nikiteas N, Gazouli M, (2012) Circulating MicroRNA in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 6(9): p. 900-4.
144. Chen G, Cao S, Liu F, Liu Y, (2015) miR-195 plays a role in steroid resistance of ulcerative colitis by targeting Smad7. *Biochem J*. 471(3): p. 357-67.
145. Zahm AM, Thayu M, Hand NJ, Horner A, Leonard MB, Friedman JR, (2011) Circulating microRNA is a biomarker of pediatric Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 53(1): p. 26-33.
146. Zahm AM, Hand NJ, Tsoucas DM, Le Guen CL, Baldassano RN, Friedman JR, (2014) Rectal microRNAs are perturbed in pediatric inflammatory bowel disease of the colon. *J Crohns Colitis*. 8(9): p. 1108-17.
147. Koukos G, Polytarchou C, Kaplan JL, Oikonomopoulos A, Ziring D, Hommes DW, Wahed R, Kokkotou E, Pothoulakis C, Winter HS, Iliopoulos D, (2015) A microRNA signature in pediatric ulcerative colitis: deregulation of the miR-4284/CXCL5 pathway in the intestinal epithelium. *Inflamm Bowel Dis*. 21(5): p. 996-1005.
148. Bao JL, Lin L, (2014) MiR-155 and miR-148a reduce cardiac injury by inhibiting NF-kappaB pathway during acute viral myocarditis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 18(16): p. 2349-56.
149. Chen YJ, Chang LS, (2013) Hydroquinone-induced miR-122 down-regulation elicits ADAM17 up-regulation, leading to increased soluble TNF-alpha production in human leukemia cells with expressed Bcr/Abl. *Biochem Pharmacol*. 86(5): p. 620-31.
150. Cheng HS, Sivachandran N, Lau A, Boudreau E, Zhao JL, Baltimore D, Delgado-Olguin P, Cybulsky MI, Fish JE, (2013) MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting pro-inflammatory pathways. *EMBO Mol Med*. 5(7): p. 949-66.

151. Curtale G, Citarella F, Carissimi C, Goldoni M, Carucci N, Fulci V, Franceschini D, Meloni F, Barnaba V, Macino G, (2010) An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes. *Blood*. 115(2): p. 265-273.
152. Gerloff D, Grundler R, Wurm AA, Brauer-Hartmann D, Katzerke C, Hartmann JU, Madan V, Muller-Tidow C, Duyster J, Tenen DG, Niederwieser D, Behre G, (2015) NF-kappaB/STAT5/miR-155 network targets PU.1 in FLT3-ITD-driven acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 29(3): p. 535-47.
153. Huang X, Huang F, Yang D, Dong F, Shi X, Wang H, Zhou X, Wang S, Dai S, (2012) Expression of microRNA-122 contributes to apoptosis in H9C2 myocytes. *J Cell Mol Med*. 16(11): p. 2637-46.
154. Larner-Svensson HM, Williams AE, Tsitsiou E, Perry MM, Jiang X, Chung KF, Lindsay MA, (2010) Pharmacological studies of the mechanism and function of interleukin-1beta-induced miRNA-146a expression in primary human airway smooth muscle. *Respir Res*. 11(1465-993X (Electronic)): p. 68.
155. Lin CJ, Gong HY, Tseng HC, Wang WL, Wu JL, (2008) miR-122 targets an anti-apoptotic gene, Bcl-w, in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 375(3): p. 315-20.
156. Liu J, Van Mil A, Vrijssen K, Zhao J, Gao L, Metz CH, Goumans MJ, Doevendans PA, Sluijter JP, (2011) MicroRNA-155 prevents necrotic cell death in human cardiomyocyte progenitor cells via targeting RIP1. *J Cell Mol Med*. 15(7): p. 1474-82.
157. Miyata R, Kakuki T, Nomura K, Ohkuni T, Ogasawara N, Takano KI, Konno T, Kohno T, Sawada N, Himi T, Kojima T, Poly(I:C) induced microRNA-146a regulates epithelial barrier and secretion of proinflammatory cytokines in human nasal epithelial cells. LID - S0014-2999(15)00375-1 [pii] LID - 10.1016/j.ejphar.2015.04.031 [doi]. (1879-0712 (Electronic)).
158. Palma Ca Fau - Al Sheikha D, Al Sheikha D Fau - Lim TK, Lim Tk Fau - Bryant A, Bryant a Fau - Vu TT, Vu Tt Fau - Jayaswal V, Jayaswal V Fau - Ma DDF, Ma DD, MicroRNA-155 as an inducer of apoptosis and cell differentiation in Acute Myeloid Leukaemia. (1476-4598 (Electronic)).

159. Park H, Huang X, Lu C, Cairo MS, Zhou X, (2015) MicroRNA-146a and microRNA-146b regulate human dendritic cell apoptosis and cytokine production by targeting TRAF6 and IRAK1 proteins. *J Biol Chem.* 290(5): p. 2831-41.
160. Rouquette-Jazdanian AK, Kortum RL, Li W, Merrill RK, Nguyen PH, Samelson LE, Sommers CL, (2015) miR-155 Controls Lymphoproliferation in LAT Mutant Mice by Restraining T-Cell Apoptosis via SHIP-1/mTOR and PAK1/FOXO3/BIM Pathways. *PLoS One.* 10(6): p. e0131823.
161. Sandhu R, Rein J, D'arcy M, Herschkowitz JI, Hoadley KA, Troester MA, (2014) Overexpression of miR-146a in basal-like breast cancer cells confers enhanced tumorigenic potential in association with altered p53 status. *Carcinogenesis.* 35(11): p. 2567-75.
162. Subedi A, Park PH, (2013) Autocrine and paracrine modulation of microRNA-155 expression by globular adiponectin in RAW 264.7 macrophages: involvement of MAPK/NF-kappaB pathway. *Cytokine.* 64(3): p. 638-41.
163. Tanic M, Zajac M, Gomez-Lopez G, Benitez J, Martinez-Delgado B, (2012) Integration of BRCA1-mediated miRNA and mRNA profiles reveals microRNA regulation of TRAF2 and NFkappaB pathway. *Breast Cancer Res Treat.* 134(1): p. 41-51.
164. Wang SC, Lin XL, Li J, Zhang TT, Wang HY, Shi JW, Yang S, Zhao WT, Xie RY, Wei F, Qin YJ, Chen L, Yang J, Yao KT, Xiao D, (2014) MicroRNA-122 triggers mesenchymal-epithelial transition and suppresses hepatocellular carcinoma cell motility and invasion by targeting RhoA. *PLoS One.* 9(7): p. e101330.
165. Wang XY, Wu Mh Fau - Liu F, Liu F Fau - Li Y, Li Y Fau - Li N, Li N Fau - Li G-Y, Li Gy Fau - Shen S-R, Shen SR, Differential miRNA expression and their target genes between NGX6-positive and negative colon cancer cells. (1573-4919 (Electronic)).
166. Wu T, Xie M, Wang X, Jiang X, Li J, Huang H, (2012) miR-155 modulates TNF-alpha-inhibited osteogenic differentiation by targeting SOCS1 expression. *Bone.* 51(3): p. 498-505.
167. Xiao B, Liu Z, Li BS, Tang B, Li W, Guo G, Shi Y, Wang F, Wu Y, Tong WD, Guo H, Mao XH, Zou QM, (2009) Induction of microRNA-155 during *Helicobacter*

- pylori infection and its negative regulatory role in the inflammatory response. *J Infect Dis.* 200(6): p. 916-25.
168. Yin Q, Wang X Fau - McBride J, McBride J Fau - Fewell C, Fewell C Fau - Flemington E, Flemington E, B-cell receptor activation induces BIC/miR-155 expression through a conserved AP-1 element. (0021-9258 (Print)).
169. Wang HQ, Yu XD, Liu ZH, Cheng X, Samartzis D, Jia LT, Wu SX, Huang J, Chen J, Luo ZJ, (2011) Deregulated miR-155 promotes Fas-mediated apoptosis in human intervertebral disc degeneration by targeting FADD and caspase-3. *J Pathol.* 225(2): p. 232-42.
170. Xiao B, Zhu ED, Li N, Lu DS, Li W, Li BS, Zhao YL, Mao XH, Guo G, Yu PW, Zou QM, (2012) Increased miR-146a in gastric cancer directly targets SMAD4 and is involved in modulating cell proliferation and apoptosis. *Oncology Reports.* 27(2): p. 559-566.
171. Ottosen S, Parsley TB, Yang L, Zeh K, Van Doorn LJ, Van Der Veer E, Raney AK, Hodges MR, Patick AK, (2015) In vitro antiviral activity and preclinical and clinical resistance profile of miravirsen, a novel anti-hepatitis C virus therapeutic targeting the human factor miR-122. *Antimicrob Agents Chemother.* 59(1): p. 599-608.
172. Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliansky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JT, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S, (2008) MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature.* 456(7224): p. 980-4.
173. Babar IA, Cheng CJ, Booth CJ, Liang X, Weidhaas JB, Saltzman WM, Slack FJ, (2012) Nanoparticle-based therapy in an in vivo microRNA-155 (miR-155)-dependent mouse model of lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(26): p. E1695-704.
174. Abba ML, Patil N, Leupold JH, Moniuszko M, Utikal J, Niklinski J, Allgayer H, MicroRNAs as novel targets and tools in cancer therapy. LID - S0304-3835(16)30204-X [pii] LID - 10.1016/j.canlet.2016.03.043 [doi]. (1872-7980 (Electronic)).
175. Deiliulis JA, (2016) MicroRNAs as regulators of metabolic disease: pathophysiologic significance and emerging role as biomarkers and therapeutics. *International Journal of Obesity.* 40(1): p. 88-101.

176. Metzker ML, (2010) Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 11(1): p. 31-46.
177. Hsu SD, Tseng YT, Shrestha S, Lin YL, Khaleel A, Chou CH, Chu CF, Huang HY, Lin CM, Ho SY, Jian TY, Lin FM, Chang TH, Weng SL, Liao KW, Liao IE, Liu CC, Huang HD, (2014) miRTarBase update 2014: an information resource for experimentally validated miRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* 42(Database issue): p. D78-85.
178. Haberman Y Fau - Tickle TL, Tickle Tl Fau - Dexheimer PJ, Dexheimer Pj Fau - Kim M-O, Kim Mo Fau - Tang D, Tang D Fau - Karns R, Karns R Fau - Baldassano RN, Baldassano Rn Fau - Noe JD, Noe Jd Fau - Rosh J, Rosh J Fau - Markowitz J, Markowitz J Fau - Heyman MB, Heyman Mb Fau - Griffiths AM, Griffiths Am Fau - Crandall WV, Crandall Wv Fau - Mack DR, Mack Dr Fau - Baker SS, Baker Ss Fau - Huttenhower C, Huttenhower C Fau - Keljo DJ, Keljo Dj Fau - Hyams JS, Hyams Js Fau - Kugathasan S, Kugathasan S Fau - Walters TD, Walters Td Fau - Aronow B, Aronow B Fau - Xavier RJ, Xavier Rj Fau - Gevers D, Gevers D Fau - Denson LA, Denson LA, Pediatric Crohn disease patients exhibit specific ileal transcriptome and microbiome signature. (1558-8238 (Electronic)).
179. Kugathasan S, Baldassano RN, Bradfield JP, Sleiman PM, Imielinski M, Guthery SL, Cucchiara S, Kim CE, Frackelton EC, Annaiah K, Glessner JT, Santa E, Willson T, Eckert AW, Bonkowski E, Shaner JL, Smith RM, Otieno FG, Peterson N, Abrams DJ, Chiavacci RM, Grundmeier R, Mamula P, Tomer G, Piccoli DA, Monos DS, Annese V, Denson LA, Grant SF, Hakonarson H, (2008) Loci on 20q13 and 21q22 are associated with pediatric-onset inflammatory bowel disease. *Nat Genet.* 40(10): p. 1211-5.
180. Huang Da W, Sherman BT, Lempicki RA, (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 4(1): p. 44-57.
181. (2015) Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic Acids Res.* 43(Database issue): p. D1049-56.
182. Supek F, Bosnjak M, Skunca N, Smuc T, (2011) REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One.* 6(7): p. e21800.

183. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T, (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13(11): p. 2498-504.
184. Muller KE, Lakatos PL, Kovacs JB, Arato A, Varkonyi A, Nemes E, Tarnok A, Toth G, Papp M, Solyom E, Horvath A, Guthy I, Kovacs M, Veres G, Hungarian Pediatric IBDRG, (2016) Baseline Characteristics and Disease Phenotype in Inflammatory Bowel Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 62(1): p. 50-5.
185. Bousvaros A, Sylvester F, Kugathasan S, Szigethy E, Fiocchi C, Colletti R, Otley A, Amre D, Ferry G, Czinn SJ, Splawski JB, Oliva-Hemker M, Hyams JS, Faubion WA, Kirschner BS, Dubinsky MC, (2006) Challenges in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 12(9): p. 885-913.
186. Iborra M, Bernuzzi F, Invernizzi P, Danese S, (2012) MicroRNAs in autoimmunity and inflammatory bowel disease: crucial regulators in immune response. *Autoimmun Rev.* 11(5): p. 305-14.
187. Levine A, De Bie CI, Turner D, Cucchiara S, Sladek M, Murphy MS, Escher JC, Espghan EPIWGO, (2013) Atypical disease phenotypes in pediatric ulcerative colitis: 5-year analyses of the EUROKIDS Registry. *Inflamm Bowel Dis.* 19(2): p. 370-7.
188. Lemberg DA, Clarkson CM, Bohane TD, Day AS, (2005) Role of esophagogastroduodenoscopy in the initial assessment of children with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 20(11): p. 1696-700.
189. Meinzer U, Idstrom M, Alberti C, Peuchmaur M, Belarbi N, Bellaiche M, Mougnot JF, Cezard JP, Finkel Y, Hugot JP, (2005) Ileal involvement is age dependent in pediatric Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases.* 11(7): p. 639-644.
190. De Bie CI, Paerregaard a Fau - Kolacek S, Kolacek S Fau - Ruemmele FM, Ruemmele Fm Fau - Koletzko S, Koletzko S Fau - Fell JME, Fell Jm Fau - Escher JC, Escher JC, Disease phenotype at diagnosis in pediatric Crohn's disease: 5-year analyses of the EUROKIDS Registry. (1536-4844 (Electronic)).
191. Aloï M, Di Nardo G, Romano G, Casciani E, Civitelli F, Oliva S, Viola F, Maccioni F, Gualdi G, Cucchiara S, (2015) Magnetic resonance enterography, small-intestine contrast US, and capsule endoscopy to evaluate the small bowel in pediatric

- Crohn's disease: a prospective, blinded, comparison study. *Gastrointest Endosc.* 81(2): p. 420-7.
192. Cuffari C, Dubinsky M, Darbari A, Sena L, Baldassano R, (2005) Crohn's jejunoileitis: the pediatrician's perspective on diagnosis and management. *Inflamm Bowel Dis.* 11(7): p. 696-704.
193. Oлару AV, Selaru FM, Mori Y, Vazquez C, David S, Paun B, Cheng Y, Jin Z, Yang J, Agarwal R, Abraham JM, Dassopoulos T, Harris M, Bayless TM, Kwon J, Harpaz N, Livak F, Meltzer SJ, (2011) Dynamic changes in the expression of MicroRNA-31 during inflammatory bowel disease-associated neoplastic transformation. *Inflamm Bowel Dis.* 17(1): p. 221-31.
194. Zeng C, Huang L, Zheng Y, Huang H, Chen L, Chi L, (2014) [Expression of miR-146a in colon cancer and its significance]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 34(3): p. 396-400.
195. Ogata-Kawata H, Izumiya M, Kurioka D, Honma Y, Yamada Y, Furuta K, Gunji T, Ohta H, Okamoto H, Sonoda H, Watanabe M, Nakagama H, Yokota J, Kohno T, Tsuchiya N, (2014) Circulating Exosomal microRNAs as Biomarkers of Colon Cancer. *Plos One.* 9(4).
196. Kanaan Z, Rai SN, Eichenberger MR, Barnes C, Dworkin AM, Weller C, Cohen E, Roberts H, Keskey B, Petras RE, Crawford NP, Galandiuk S, (2012) Differential microRNA expression tracks neoplastic progression in inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer. *Hum Mutat.* 33(3): p. 551-60.
197. Wang HL, Zhang SH, Yu Q, Yang G, Guo J, Li MY, Zeng ZR, He Y, Chen BL, Chen MH, (2016) Circulating MicroRNA223 is a New Biomarker for Inflammatory Bowel Disease. *Medicine.* 95(5).
198. Giatromanolaki A, Sivridis E, Maltezos E, Papazoglou D, Simopoulos C, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI, (2003) Hypoxia inducible factor 1alpha and 2alpha overexpression in inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol.* 56(3): p. 209-13.
199. Cromer WE, Mathis JM, Granger DN, Chaitanya GV, Alexander JS, (2011) Role of the endothelium in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol.* 17(5): p. 578-93.

200. Lord JD, Shows DM, Chen J, Thirlby RC, (2015) Human Blood and Mucosal Regulatory T Cells Express Activation Markers and Inhibitory Receptors in Inflammatory Bowel Disease. *PLoS One*. 10(8): p. e0136485.
201. Sziksz E, Pap D, Lippai R, Beres NJ, Fekete A, Szabo AJ, Vannay A, (2015) Fibrosis Related Inflammatory Mediators: Role of the IL-10 Cytokine Family. *Mediators Inflamm*. 2015(1466-1861 (Electronic)): p. 764641.
202. Wallace KL, Zheng LB, Kanazawa Y, Shih DQ, (2014) Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 20(1): p. 6-21.
203. Carey R, Jurickova I, Ballard E, Bonkowski E, Han X, Xu H, Denson LA, (2008) Activation of an IL-6:STAT3-dependent transcriptome in pediatric-onset inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 14(4): p. 446-57.
204. Rieder F, Fiocchi C, Intestinal fibrosis in inflammatory bowel disease: progress in basic and clinical science. (1531-7056 (Electronic)).
205. Zhang X, Liu H, Hock T, Thannickal VJ, Sanders YY, (2013) Histone deacetylase inhibition downregulates collagen 3A1 in fibrotic lung fibroblasts. *Int J Mol Sci*. 14(10): p. 19605-17.
206. Zanotti S, Gibertini S, Curcio M, Savadori P, Pasanisi B, Morandi L, Cornelio F, Mantegazza R, Mora M, (2015) Opposing roles of miR-21 and miR-29 in the progression of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta*. 1852(7): p. 1451-64.
207. Rieder F, Brenmoehl J Fau - Leeb S, Leeb S Fau - Scholmerich J, Scholmerich J Fau - Rogler G, Rogler G, Wound healing and fibrosis in intestinal disease. (0017-5749 (Print)).
208. Bourgier C, Haydont V, Milliat F, Francois A, Holler V, Lasser P, Bourhis J, Mathe D, Vozenin-Brotans MC, (2005) Inhibition of Rho kinase modulates radiation induced fibrogenic phenotype in intestinal smooth muscle cells through alteration of the cytoskeleton and connective tissue growth factor expression. *Gut*. 54(3): p. 336-343.
209. Sipos F, Furi I, Constantinovits M, Tulassay Z, Muzes G, (2014) Contribution of TLR signaling to the pathogenesis of colitis-associated cancer in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 20(36): p. 12713-21.

210. Molnar K, Vannay A, Szebeni B, Banki NF, Sziksz E, Cseh A, Gyorffy H, Lakatos PL, Papp M, Arato A, Veres G, (2012) Intestinal alkaline phosphatase in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 18(25): p. 3254-9.
211. Eder P, Lykowska-Szuber L, Stawczyk-Eder K, Krela-Kazmierczak I, Linke K, Alterations in programmed cell death mechanism and their role in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. (1895-5770 (Print)).
212. Gillberg L, Varsanyi M, Sjostrom M, Lordal M, Lindholm J, Hellstrom PM, (2012) Nitric oxide pathway-related gene alterations in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 47(11): p. 1283-97.
213. Deuring JJ, Peppelenbosch MP, Kuipers EJ, Van Der Woude CJ, De Haar C, (2011) Impeded protein folding and function in active inflammatory bowel disease. *Biochem Soc Trans.* 39(4): p. 1107-11.
214. Englund G, Jacobson A, Rorsman F, Artursson P, Kindmark A, Ronnblom A, (2007) Efflux transporters in ulcerative colitis: decreased expression of BCRP (ABCG2) and Pgp (ABCB1). *Inflamm Bowel Dis.* 13(3): p. 291-7.
215. Yang T, Zheng ZM, Li XN, Li ZF, Wang Y, Geng YF, Bai L, Zhang XB, (2013) MiR-223 modulates multidrug resistance via downregulation of ABCB1 in hepatocellular carcinoma cells. *Exp Biol Med (Maywood).* 238(9): p. 1024-32.
216. Jiao X, Zhao L, Ma M, Bai X, He M, Yan Y, Wang Y, Chen Q, Zhao X, Zhou M, Cui Z, Zheng Z, Wang E, Wei M, (2013) MiR-181a enhances drug sensitivity in mitoxantone-resistant breast cancer cells by targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Breast Cancer Res Treat.* 139(3): p. 717-30.
217. Shen WW, Zeng Z, Zhu WX, Fu GH, (2013) MiR-142-3p functions as a tumor suppressor by targeting CD133, ABCG2, and Lgr5 in colon cancer cells. *Journal of Molecular Medicine-Jmm.* 91(8): p. 989-1000.
218. Mei ZF, He YC, Feng JJ, Shi JD, Du Y, Qian L, Huang QH, Jie ZJ, (2014) MicroRNA-141 promotes the proliferation of non-small cell lung cancer cells by regulating expression of PHLPP1 and PHLPP2. *Febs Letters.* 588(17): p. 3055-3061.
219. Wen YA, Li X, Goretsky T, Weiss HL, Barrett TA, Gao T, (2015) Loss of PHLPP protects against colitis by inhibiting intestinal epithelial cell apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 1852(10 Pt A): p. 2013-23.

220. Rao E, Jiang C Fau - Ji M, Ji M Fau - Huang X, Huang X Fau - Iqbal J, Iqbal J Fau - Lenz G, Lenz G Fau - Wright G, Wright G Fau - Staudt LM, Staudt Lm Fau - Zhao Y, Zhao Y Fau - Mckeithan TW, Mckeithan Tw Fau - Chan WC, Chan Wc Fau - Fu K, Fu K, The miRNA-17 approximately 92 cluster mediates chemoresistance and enhances tumor growth in mantle cell lymphoma via PI3K/AKT pathway activation. (1476-5551 (Electronic)).
221. Beres NJ, Szabo D, Kocsis D, Szucs D, Kiss Z, Muller KE, Lendvai G, Kiss A, Arato A, Sziksz E, Vannay A, Szabo AJ, Veres G, (2016) Role of Altered Expression of miR-146a, miR-155, and miR-122 in Pediatric Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 22(2): p. 327-35.
222. Fujioka S, Nakamichi I, Esaki M, Asano K, Matsumoto T, Kitazono T, (2014) Serum microRNA levels in patients with Crohn's disease during induction therapy by infliximab. *J Gastroenterol Hepatol.* 29(6): p. 1207-14.

11. Saját publikációk jegyzéke

Kapcsolódó publikációk

- 1. Nóra Judit Béres***, Zoltán Kiss*, Zsófia Sztupinszki, Gábor Lendvai, András Arató, Erna Sziksz, Ádám Vannay, Attila J Szabó, Katalin Eszter Müller, Áron Cseh, Kriszta Boros, Gábor Veres (2017) Altered mucosal expression of microRNAs in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Digestive and Liver Disease*. 49(4):378-387. Nóra Judit Béres and Zoltán Kiss are equally contributed first authors.
IF: 2,719
- 2. Nóra Judit Béres**, Dolóresz Szabó, Dorottya Kocsis, Dániel Szűcs, Zoltán Kiss, Katalin Eszter Müller, Gábor Lendvai, András Kiss, András Arató, Erna Sziksz, Ádám Vannay, Attila J. Szabó, Gábor Veres (2016) Role of altered expression of miR-146a, miR-155 and miR-122 in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Disease*. 22(2):327-35.
IF: 4,358
- 3. Dániel Szűcs, Nóra Judit Béres**, Réka Rokonay, Kriszta Boros, Katalin Borka, Zoltán Kiss, András Arató, Attila J. Szabó, Ádám Vannay, Erna Sziksz, Csaba Berecki and Gábor Veres (2016) Increased duodenal expression of miR-146a and -155 in pediatric Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology*. 22(26): 6027-6035
IF: 2,787
- 4. Béres Nóra Judit**, Kiss Zoltán, Sziksz Erna, Vannay Ádám, Veres Gábor (2016) A tumor nekrosis faktor- α hatása a gyulladásos bélbetegségekben releváns mikroRNS-ek expressziójára. *Gyermekgyógyászat*. 67:215-220.
- 5. Béres Nóra Judit.**, Szabó Dolóresz, Arató András, Müller Katalin Eszter, Veres Gábor (2013) Micro-RNS potenciális szerepe a kutatásban és a klinikumban. *Gyermekgyógyászat*. 64(4):165-166.

6. Szűcs Dániel, Várkonyi Ágnes, **Béres Nóra Judit**, Szabó Dolóresz, Boros Kriszta Katinka, Arató András, Veres Gábor (2014) Mikro-RNS-ek diagnosztikai jelentősége gyulladássos bélbetegségben, Gyermekgyógyászat. 65(3): 160-165.
7. Szabó Dolóresz, Arató András, **Béres Nóra Judit**, Veres Gábor (2013) Epigenetika: a géneken túli öröklődés. Micro RNS, hiszton modifikáció és DNS metiláció. Gyermekgyógyászat. 64:112-113.

Egyéb publikációk

1. **Nóra Judit Béres**, Erna Sziksz, Ádám Vannay, Dolóresz Szabó, Domonkos Pap, Apor Veres-Székely, András Arató, Attila J. Szabó, Gábor Veres (2014) Role of the Microbiom in Celiac Disease. *International Journal of Celiac Disease*. 2(4):150-153
2. Kiss Zoltán, **Beres Nóra Judit**, Sziksz Erna, Tel Bálint, Borka Katalin, Arato András, Szabo Attila J. , Veres Gábor (2017) Specific MicroRNA Pattern in Colon Tissue of Young Children with Eosinophilic Colitis. *International Journal of Molecular Sciences*. 18:(5)1050-63.

IF: 3,257

3. **Béres Nóra Judit**, Sziksz Erna, Arató András, Veres Gábor (2015) Széklettranszplantáció a felnőtt- és gyermekgyógyászatban. *Gyermekgyógyászat*. 66. évf., 4. szám, 239-244
4. Sziksz Erna, Pap Domonkos, Lippai Rira, **Béres Nóra Judit**, Fekete Andrea, Szabó Attila J, Vannay Ádám, (2015) Fibrosis Related Inflammatory Mediators: Role of the IL-10 Cytokine Family. *Mediators of Inflammation*. 764641, 15p.

IF: 3,418

5. Szabó D., Hosszú É, Arató A, Müller KE, **Béres N**, Lakatos PL, Papp M, Dezsőfi A, Szabó AJ, Szűcs D, Veres G. (2015) Seasonal variability of vitamin D and bone metabolism in infliximab-treated paediatric Crohn's disease. *Digestive and Liver disease*. 47(8):652-7.

IF: 2,719

6. Dorottya Kocsis, Nóra Judit Béres, Gábor Veres, Dolóresz Szabó, Katalin Eszter Müller, András Arató, Márk Juhász (2014) A coeliakia genetikai és epigenetikai vonatkozásai. *Orvosi hetilap*. 1;155(3):83-8
7. **Béres Nóra Judit**, Szabó Attila, Veres Gábor (2014) A gastrointestinalis traktus mikrobiom meghatározása. *Gyermekgyógyászat*. 65(5):317-318

8. Kiss Zoltán, **Béres Nóra Judit**, Müller Katalin Eszter, Cseh Áron, Merkely Petra, Arató András, Veres Gábor (2015) Az eosinophil sejtek szerepe a gastrointestinalis kórképekben I.: Általános jellemzők és terápiás lehetőségek. Gyermekgyógyászat. 66(6):363-368.
9. Tél Bálint, Kiss Zoltán , **Béres Nóra** , Boros Kriszta Katinka , Borka Katalin , Veres Gábor (2017) Az eosinophil sejtek szerepe a gastrointestinalis kórképekben III.: Eosinophil colitis. Gyermekgyógyászat. 68(3):154-159.
10. **Béres Nóra**, Müller Katalin Eszter, Veres Gábor (2013) A csecsemőkori Crohn-betegség diagnosztikus nehézségei - esetismertetés és irodalmi áttekintés Gyermekgyógyászati Továbbképző Szemle. 18(5):215-216
11. Benkő Rita, Masszi Gabriella, Csibi Noémi, Horvath Eszter Mária, Tokes Annamária, **Béres Nóra Judit**, Tarszabo Róbert, Buday Anna, Repas Csaba, Bekesi Gabor, Patocs Attila, Nadasy György László, Hamar Péter, Benyó Zoltán, Varbiro Szabolcs (2013) Endothelial relaxation mechanisms and nitrosative stress is partly restored by Vitamin D₃ therapy in a rat model of polycystic ovary syndrome. Life Sci. 6;93(4):133-8.

IF: 2,296
12. Müller Katalin, Szabó Dolóresz, **Béres Nóra**, Boros Krisztina, Veres Gábor (2013) A csecsemőkori haematochezia; Gyermekgyógyászati Továbbképző Szemle, 18. 33-35

12. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Szabó Attila Professzor úrnak és Dr. Tulassay Tivadar Professzor úrnak, az I. Sz. Gyermekklinika jelenlegi és korábbi igazgatójának, hogy lehetőséget kaptam, hogy az I. sz. Gyermekklinika Kutatólaboratóriumában kezdhettem meg PhD tanulmányaimat.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Veres Gábornak, hogy pályámon elindított. Hálás vagyok, hogy munkámat, szakmai fejlődésemet mindvégig barátian, tanácsokkal látta el.

Köszönöm Horváth Eszternek a tudományos diákkörös munkám elejétől mindmáig nyújtott segítségét, útmutatásait és legfőképpen barátságát. Példaként szolgált számomra magatartásával és gondolkodásmódjával.

Hálás vagyok Dr. Vannay Ádámnak és Dr. Sziksz Ernának, akik önzetlenül segítettek az adatok feldolgozásában és észrevételeikkel, tanácsaikkal segítettek a kapott eredmények értelmezésében.

Köszönettel tartozom Kiss Zoltánnak, akivel az elmúlt három évben szorosan együtt dolgozhattam, türelemmel segítette a közös munkánkat és gondolkodásom fejlődését.

Köszönöm Prof. Dr. Arató Andrásnak és Dr. Lendvai Gábornak, hogy tudományos munkámat nyomon követte és segítette.

Köszönöm Dr. Müller Katalin Eszternek barátságát és szakmai útmutatását, illetve Dr. Cseh Áronnak azt a klinikai szemléletmódot, amivel segítette a munkámat.

Köszönettel tartozom a Kutatólabor minden munkatársának barátságukért és támogatásukért: Dr. Fekete Andrea, Dr. Szabó Dolóresz, Bernáth Mária, Veres-Székely Apor, Pap Domonkos, Dr. Rokonay Réka, Dr. Lippai Rita, Balogh Dóra, Lénárt Lilla, Hosszú Ádám, Szkibinszkij Edgár, Kőszegi Sándor.

Végül, de mindenekelőtt hálásan köszönöm Családom támogatását és biztos hátterét, mely nélkül e munka nem jöhetett volna létre.

13. Ábrajegyzék

1. ábra: <i>IBD etiopatogenezise</i>	19
2. ábra: <i>A főbb IBD-ben releváns hajlamosító gének</i>	22
3. ábra: <i>A pro- és anti-inflammatorikus citokinek egyensúlya az IBD patomechanizmusában</i>	27
4. ábra: <i>A fenotípus kialakulását szabályozó tényezők</i>	30
5. ábra: <i>A miR-146a, -155 és -122 szerepe</i>	46
6. ábra: <i>A miR-146a, -155 és -122 szerepe a TNF-α jelátviteli útvonalban</i>	48
7. ábra: <i>A Sanger-féle szekvenálás folyamatábrája</i>	51
8. ábra: <i>Az mRNS és a mikroRNS expresszió mérés</i>	59
9. ábra: <i>A bioinformatikai analízis folyamata</i>	61
10. ábra: <i>A miR-18a, -20a, -21, -31, -99a és -99b expressziója CD, UC és kontroll vastagbél biopsziákban</i>	65
11. ábra: <i>A miR-100, -125a, -126, -141, -142-3p és -142-5p expressziója CD, UC és kontroll vastagbél biopsziákban</i>	66
12. ábra: <i>A miR-146a, -150, -185, -204, -221 és -223 szintje CD, UC és kontroll vastagbél biopsziákban</i>	67
13. ábra: <i>Validált mikroRNS-ek CD-s mintákkal átfedő célgénjei</i>	68
14. ábra: <i>A miR-142-3p, -146a, -185 és -223 „receiver operating characteristic” ROC analízisének eredménye</i>	69
15. ábra: <i>Az új-generációs szekvenálással sziknifikáns eltérést mutató mikroRNS-ek CD-ben releváns célgénjeinek biológiai funkciója</i>	71
16. ábra: <i>A validálásra kiválasztott mikroRNS-ek CD-ben releváns célgénjeinek biológiai funkciója</i>	72
17. ábra: <i>A miR-146a expressziója formalinban fixált, paraffinba-ágyazott (A) és fagyasztott (B) CD-s, UC-s és kontroll biopsziás mintákban</i>	73
18. ábra: <i>A miR-155 expressziója formalinban fixált, paraffinba-ágyazott (A) és fagyasztott (B) CD-s, UC-s és kontroll biopsziás mintákban</i>	74
19. ábra: <i>A miR-122 expressziója formalinban fixált, paraffinba-ágyazott (A) és fagyasztott (B) CD-s, UC-s és kontroll biopsziás mintákban</i>	75
20. ábra: <i>A miR-146a, -155 és -122 és gyermekkori CD szempontjából releváns célgénjeik szabályozása alatt álló biológiai folyamatok</i>	76
21. ábra: <i>TNF-α szintje CD-s, UC-s és kontroll biopsziákban (A), valamint a TNF-α kezelés hatása a miR-146a (B), -155(C) és -122 (D) expresszióra HT-29 colon epitél sejtekben</i>	77

14. Táblázatjegyzék

1. táblázat: <i>Intesztinális mikroRNS (miR)-ek gyulladásoos bélbetegségekben (IBD)</i>	42
2. táblázat: <i>Szérum mikroRNS (miR)-ek gyulladásoos bélbetegségekben (IBD)</i>	44
3. táblázat: <i>Mikro-RNS-ek gyermekkori gyulladásoos bélbetegségekben (IBD)</i>	45
4. táblázat: <i>Klinikai jellemzői és laboratóriumi paraméterei a szekvenálásba (A) és PCR validálásba (B) bevont csoportoknak</i>	54
5. táblázat: <i>A formalinban fixált, paraffinba ágyazott (A) és a fagyasztott (B) biopsziás csoportok klinikai jellemzői és laboratóriumi paraméterei</i>	55
6. táblázat: <i>Az általunk vizsgált mikroRNS-ek és a hozzájuk rendelt Assay azonosítók (ID)</i>	58
7. táblázat: <i>Az mRNS mérés során használt primerek szekvenciája és karakterisztikája</i>	58
8. táblázat: <i>Az új-generációs szekvenálással kapott mikroRNS-ek száma</i>	62
9. táblázat: <i>A szekvenálás alapján kiválasztott mikroRNS-ek „fold change” értékei</i>	63
10. táblázat: <i>A validálás során vizsgált mikroRNS-ek biológiai folyamatai</i>	83