

Az intesztinális alkalikus foszfát vizsgálata  
gyermekkori gyulladásoos bélbetegségben  
és cöliákiában

Doktori értekezés

**Dr. Molnár Kriszta**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



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

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

Dr. Lendvai Gábor tudományos munkatárs, Ph.D.

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

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

Budapest  
2012

## TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK .....	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	5
BEVEZETÉS.....	7
IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	8
GYULLADÁSOS BÉLBETEGSÉG.....	8
A bél mikroflórája és a gyulladásos bélbetegség kapcsolata.....	9
A mukózális barrierintegritás és a gyulladásos bélbetegség.....	10
A veleszületett immunitás és a gyulladásos bélbetegség.....	11
Az adaptív immunitás és a gyulladásos bélbetegség .....	14
CÖLIÁKIA.....	15
A cöliákia és a genetika .....	16
A cöliákia és a mukózális barrier.....	17
A glutén és a veleszületett immunitás .....	18
Az intraepiteliális limfociták szerepe .....	19
Az adaptív immunitás elemei cöliákiában .....	19
AZ INTESZTINÁLIS ALKALIKUS FOSZFATÁZ .....	20
Alkalikus foszfatáz izoenzimek.....	20
Az intesztinális alkalikus foszfatáz funkciói .....	21
Az intesztinális alkalikus foszfatáz és a bélgyulladás .....	26
Az intesztinális alkalikus foszfatáz cöliákiában .....	26
CÉLKITŰZÉSEK.....	27
BETEGEK ÉS MÓDSZEREK.....	28
EGÉSZSÉGES ÉS BETEG CSOPORTOK .....	28
Gyulladásos bélbetegségben szenvedő (IBD-s) betegek és kontroll kolonoszkópiás csoport.....	28
Cöliákiás betegek és felső endoszkópián átesett kontrollcsoport .....	31

VALÓS IDEJŰ (REAL-TIME) REVERZ TRANZKRIPCIÓ-POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ (RT-PCR) MÉRÉSEK.....	33
RNS izolálás .....	33
Reverz transzkripció .....	33
Real-time PCR-fluoreszcens rezonancia energia transzfer) GAPDH mérésére .	34
A BrilliantII QPCR alapú real-time PCR iAP mRNS mérésére .....	34
A real-time PCR mérések értékelése .....	34
WESTERN BLOT.....	35
A minták előkészítése .....	35
SDS-PAGE .....	35
Blottolás.....	35
Immunoblotting .....	36
Az immunoreaktív helyek detektálása.....	36
A Western blotok kiértékelése.....	36
IMMUNFLUORESCENS FESTÉS .....	36
STATISZTIKA.....	37
EREDMÉNYEK.....	38
AZ IAP EXPRESSZIÓJÁNAK VIZSGÁLATA GYULLADÁSOS BÉLBETEGSÉGBEN SZENVEDŐ (IBD-S) GYERMEKEK KOLON NYÁLKAHÁRTYÁJÁBAN .....	38
Az iAP mRNS expressziójának változásai gyulladós bélbetegségben szenvedő (IBD-s) gyermekek kolon nyálkahártyájában.....	38
Az iAP proteinszintek változásai gyulladós bélbetegségben szenvedő (IBD-s) gyermekek kolon nyálkahártyájában .....	39
AZ IAP-TLR4 LOKALIZÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA GYULLADÁSOS BÉLBETEGSÉGBEN SZENVEDŐ (IBD) GYERMEKEK KOLON NYÁLKAHÁRTYÁJÁBAN.....	41
AZ IAP EXPRESSZIÓJÁNAK VIZSGÁLATA CÖLIÁKIÁS GYERMEKEK DUODENUM NYÁLKAHÁRTYÁJÁBAN.....	42
Az iAP mRNS expressziójának változásai cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában.....	43
Az iAP proteinszintek változásai cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában.....	44

AZ IAP-TLR4 LOKALIZÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA CÖLIÁKIÁS GYERMEKEK DUODENUM NYÁLKAHÁRTYÁJÁBAN.....	46
EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE, KÖVETKEZTETÉS.....	47
AZ IAP EXPRESSZIÓJÁNAK VÁLTOZÁSA GYULLADÁSOS BÉLBETEGSÉGBEN SZENVEDŐ (IBD-S) GYERMEKEK KOLON NYÁLKAHÁRTYÁJÁBAN.....	48
AZ IAP ÉS TLR4 LOKALIZÁCIÓJA GYULLADÁSOS BÉLBETEGSÉGBEN SZENVEDŐ (IBD-S) GYERMEKEK KOLON NYÁLKAHÁRTYÁJÁBAN .....	51
AZ IAP EXPRESSZIÓJÁNAK VÁLTOZÁSA CÖLIÁKIÁS GYERMEKEK DUODENUM NYÁLKAHÁRTYÁJÁBAN .....	52
AZ IAP ÉS TLR4 LOKALIZÁCIÓJA CÖLIÁKIÁS GYERMEKEK DUODENUM NYÁLKAHÁRTYÁJÁBAN.....	53
EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA .....	56
ÖSSZEFOGLALÁS .....	58
SUMMARY .....	60
IRODALOMJEGYZÉK.....	62
ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE.....	79
PUBLIKÁCIÓK.....	81
DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK.....	82
A DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK .....	83
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	85

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<b>ALP</b>	alkalikus foszfatáz
<b>CFU</b>	kolónia-formáló egység
<b>CD</b>	cöliákia
<b>CFTR</b>	cisztás fibrózis transzmembrán regulátor
<b>CLD</b>	klaudin
<b>DSS</b>	dextrán szódium szulfát
<b>EC</b>	enterocita
<b>ESPGHAN</b>	Európai Gyermek-gastroenterológiai, -hepatológiai és -táplálkozási Társaság
<b>GALT</b>	bél-asszociált limfoid szövet
<b>GFD</b>	gluténmentes étrend
<b>HUPIR</b>	Magyar gyermek IBD regiszter
<b>iAP</b>	intesztinális alkalikus foszfatáz
<b>IBD</b>	gyulladásos bélbetegség
<b>IEL</b>	intraepiteliális limfocita
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	interferon gamma
<b>IL</b>	interleukin
<b>KO</b>	génkiütött
<b>LBP</b>	LPS-kötő fehérje
<b>LPS</b>	lipopoliszacharid
<b>MC</b>	Crohn-betegség
<b>MyD88</b>	myeloid primary response gene 88
<b>NS</b>	nem szignifikáns

<b>PAMP</b>	patogén-asszociált molekuláris mintázat
<b>PCDAI</b>	gyermekkori Crohn-betegség aktivitási index
<b>PRR</b>	mintázatfelismerő receptor
<b>PUCAI</b>	gyermekkori kolitisz ulceróza aktivitási index
<b>SGK-1</b>	szérum és glukokortikoid regulált kináz 1
<b>SLP</b>	szurfaktáns-szerű partikulum
<b>TG</b>	transzglutamináz
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	transzformáló növekedési faktor béta
<b>TJ</b>	tight junction
<b>TLR</b>	toll-like receptor
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	tumor nekrozis faktor-alfa
<b>Treg</b>	regulátoros T sejt
<b>TSNALP</b>	szöveti nem specifikus alkalikus foszfatáz
<b>UC</b>	kolitisz ulceróza
<b>WT</b>	vad-típus

## BEVEZETÉS

A gyermek-gasztroenterológiai kórképeknek jelentős szerepük van mind az alap, mind a specializált gyermekgyógyászati ellátásban, ugyanis ezek a betegségek a gyermekpopuláció jelentős részét érintik. Ezeket a kórképeket három csoportba oszthatjuk kialakulás és életkori sajátosságok alapján: a fejlődési rendellenességgel járó betegségek, felszívódási zavarok illetve a gyulladás talaján kialakult kórképek. Munkacsoportunk kutatásainak fő irányát a bélhez kötött mukózális immunrendszer eltéréseinek vizsgálata képezi immunmediált betegségekben. Gasztroenterológiai kutatásaink többsége a gyulladásos bélbetegségekkel, a cöliákiával valamint az allergiás kórképekkel kapcsolatos. Tanulmányainkban vizsgáltuk a veleszületett és adaptív immunrendszer mukózális és perifériás eltéréseit és a mukózális sejtösszekötő struktúrák változásait az említett kórképekben.

A rutin laboratóriumi diagnosztikában az alkalikus foszfátáz máj és csont izoenzim vizsgálata széles körben elterjedt. Az intesztinális alkalikus foszfátáz (iAP) az alkalikus foszfátázok csoportjának egy speciális, a bélre jellemző izoenzime. Régóta ismert, hogy az iAP a zsírszorpció fontos résztvevője, de újabban leírták a bél mukózális barrierintegritásának fenntartásában betöltött szerepét is.

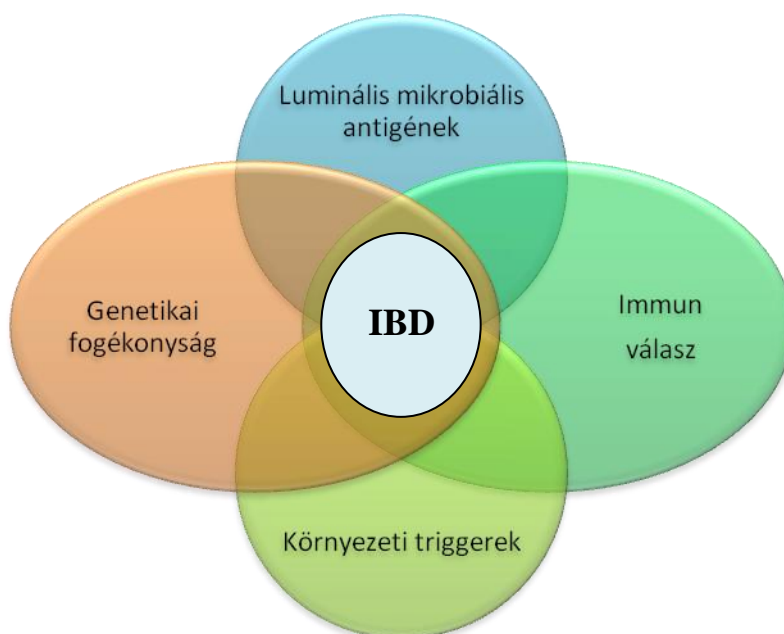
Mivel a gyulladásos bélbetegségben (IBD-ben) és cöliákiában a bélfal integritása fontos, ezért munkám során molekuláris biológiai módszerekkel vizsgáltam az iAP expressziójának változásait, valamint a veleszületett immunrendszer részéről a Toll-like receptor 4 (TLR4) és iAP enzim intesztinális lokalizációját IBD-ben és cöliákiában.

Dolgozatomban a vizsgált kórképekről és az iAP-ról szóló irodalmi áttekintés után a beteganyagot, felhasznált módszereinket ismertetem, majd bemutatom eredményeinket és az azokból levonható következtetéseket.

## IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### I. Gyulladásos bélbetegség

Az IBD két fő megjelenési formája a Crohn-betegség (MC), a kolitisz ulceróza (UC). Az esetek 10-15%-ban a két betegséget nem lehet elkülöníteni, ilyenkor indeterminált kolitiszről beszélünk. Az IBD pontos patomechanizmusa ismeretlen, de genetikailag fogékony egyéneknél a bélnyálkahártya megváltozott barrierfunkciója, a veleszületett és adaptív immunrendszer kóros válasza és különböző környezeti faktorok járulnak hozzá a krónikus bélgyulladás kialakulásához (Lakatos és mtsai 2006), (1. ábra).



**1. ábra: A gyulladásos bélbetegség (IBD) etiopatogenezise.** A krónikus bélgyulladás IBD-ben a rezidens bélflóra változása és a mukóza közötti kölcsönhatás eredményeként jöhet létre. Ezt befolyásolják környezeti és gazdaszervezeti faktorok genetikailag fogékony egyéneknél. A genetikai faktorok hatnak a barrierfunkcióra, a veleszületett és adaptív immunválaszokra (Xavier és mtsai 2007).

Bár a magas incidenciájú országokban, mint Észak-Amerika és Észak-Európa az UC és MC incidenciája és prevalenciája napjainkra stabilizálódni látszik, az alacsony incidenciájú országokban, mint Dél-Európa és Ázsia az előfordulásuk növekszik. Az Egyesült Államokban 1,4 millió, Európában 2,2 millió ember szenved IBD-ben (Jess és



mtsai 2008). Az IBD gyermekkori előfordulása az összes IBD-s betegek 10-15%-t tesz ki (Abramson és mtsai 2010). A kórkép leggyakrabban az élet 2. és 3. évtizedében jelentkezik (Levine és mtsai 2011). A magyarországi gyermek IBD-regiszter (HUPIR) 2008-as adatai alapján 18 éves kor alatti populációban az IBD gyermekkori incidenciája  $6,55/10^5$ , MC-ben  $3,8/10^5$ , UC-ben  $2,2/10^5$  és indeterminált kolitiszben  $0,45/10^5$ . A nemzetközi adatokhoz hasonlóan, Magyarországon a gyermekkori MC incidenciája meghaladja az UC incidenciáját. A magyar és nemzetközi felmérések szerint a nemek aránya UC-ben közel azonos, MC-ben viszont majdnem másfélszer több fiút regisztráltak, mint lányt (Veres és mtsai, 2008).

### I.1. A bél mikroflórája és a gyulladásos bélbetegség kapcsolata

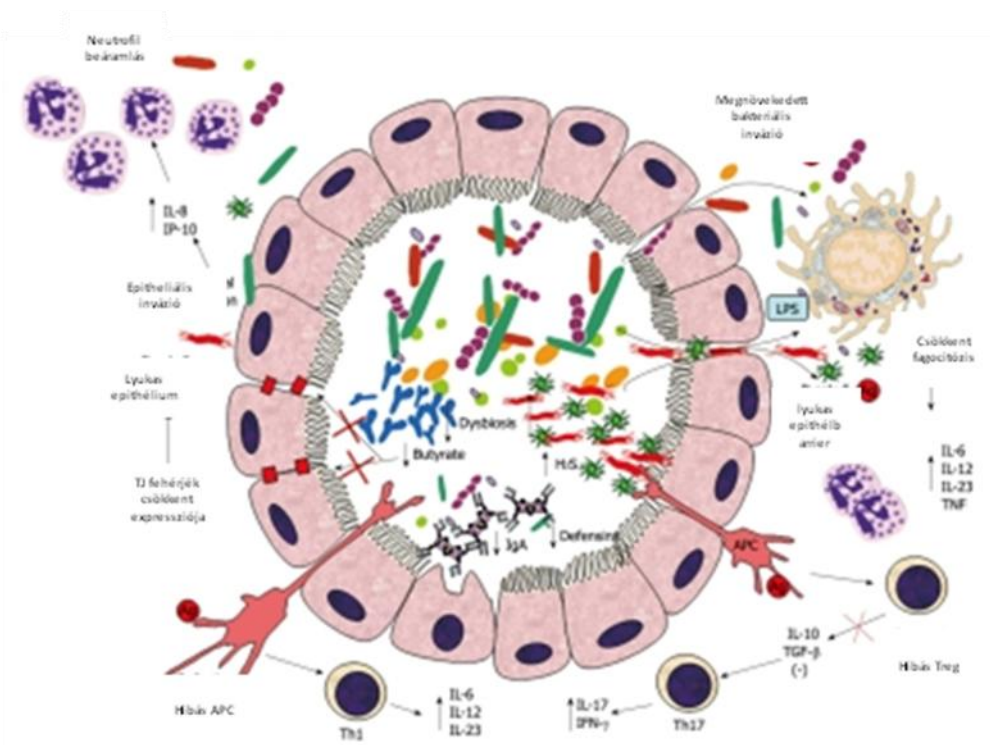
A bél kommenzális flórája és a gazdaszervezet védekező válasza közötti dinamikus egyensúly felborulása hozzájárul az IBD kialakulásához és a gyulladás krónikus fennállásához (Xavier és mtsai 2007). A bélflóra összetétele viszonylag állandó, de az étrend, enterális infekciók, antibiotikum-kezelés, savcsökkentők és immunszuppressziós kezelés befolyásolja (Schiffrin és mtsai 2002). A bél mikroflórája nagyjából 500 különböző baktériumfajból tevődik össze, melynek száma a vékonybél elejétől kezdve folyamatosan nő, a jejunumban  $10^4$ , az ileumban  $10^7$  a baktériumok kolónia-formáló egysége (CFU) grammra számolva (Orlando és mtsai 2012). A vékonybélben zömmel Gram-negatív aerob és obligát anaerob baktériumtörzsek vannak. A vastagbélben főleg az anaerobok dominálnak és a béllumenben  $10^{12}$  a baktériumokra vonatkoztatott CFU. A patogén baktériumok eliminálására két fő kontrollmechanizmus létezik: a gazdaszervezettől független baktérium-baktérium és a gazdaszervezet-baktérium közötti kölcsönhatás (Tomasello és mtsai 2011, Gersemann és mtsai 2011). Ez utóbbi úgy tűnik, komplex módon befolyásolja a bélflóra összetételét, valamint az intesztinális mikroflóra hat a gazdaszervezet veleszületett és adaptív immunrendszerének fejlődésére is. A túlzottan agresszív nem-patogén, kommenzális baktériumokkal szembeni immunválaszok szerepet játszanak az IBD patogenezisében, tüneteiben és szövődményeiben (Hammer és mtsai 2011, Sepehri és mtsai 2011). Az agresszív és protektív baktériumfajok relatív egyensúlya megváltozik a béllumenben krónikus bélgyulladásban. Bizonyított tény, hogy IBD aktív szakaszában az antibiotikum-kezelés csökkenti a bélnyálkahártyán keresztüli bakteriális inváziót, eliminálja az agresszív

baktériumfajokat, globálisan csökkenti a luminalis és mukózális baktériumkoncentrációt (Kaur és mtsai 2011, Sartor és mtsai 2004). A mikrobiális flóra változatossága és komplexitása miatt további metagenomikus vizsgálatokra van szükség az IBD-ben betöltött szerepének tisztázására (Hedin és mtsai 2010).

## I.2. A mukózális barrierintegritás és a gyulladásos bélbetegség

A bélnyálkahártya nem csupán egy fizikai barrier a patogének inváziója ellen, hanem egy érzékeny struktúra, amely a környezeti változásokat érzékeli és reagál rájuk. A gasztrointesztinális rendszer érintkezik a legnagyobb felületen a külső környezettel, mintegy 300 m<sup>2</sup>-en. Az intesztinális homeosztázis fenntartása egy nagyon összetett folyamat (MacDonald és mtsai 2011, Renz és mtsai 2011). A bél-asszociált mukózális immunrendszer (GALT) speciális regulátoros és gyulladásellenes hatással rendelkezik, ugyanis egyszerre kell tolerálnia a nem-veszélyes táplálékantigéneket, a kommenzális mikroorganizmusokat és ezzel egy időben a helyi védekező mechanizmusoknak védelmet kell nyújtania a patogén baktériumtörzsekkel szemben (Tlaskalová-Hogenová és mtsai 2004, Tezuka és mtsai 2010). Ezen egyensúly fenntartásában az intesztinális mikroflóra összetételének, az immunrendszer két karjának: a veleszületett és az adaptív immunrendszernek, valamint az intesztinális barriernek is kiemelt jelentősége van. A bőrrel ellentétben, amely egy szoros, de nem áteresztő hártyát képez (Curtis és mtsai 2012), az egyrétegű bélhámsejt-réteg kiemelt jelentőséggel bír a tápanyag és folyadékcsereben (Moens és mtsai 2012). A sejteket megújító folyamatok mellett, a bélhámsejteknek (EC) fenn kell tartani a gyors mukózális véráramlást, az összefüggő adherens nyálkahártyát és a „repair” mechanizmusokat stimuláló regulációs peptideket (Gilbert és mtsai 2012, Koslowski és mtsai 2010). A bél epitélsejt rétegének sérülése mukózális erózióhoz, majd fekélyesedéshez vezet, és a patogének, valamint kémiai anyagok bélnyálkahártyán való fokozott átjutását eredményezi (Laukoetter és mtsai 2008), (2. ábra). A bélhámsejtek egy polarizált membránt alkotnak, amelyek szoros, intercellularis összekötő struktúrákkal csatlakoznak egymáshoz és a sejtek béllumen felé eső, apikális felszínét glikokalix réteg borítja (Bruewer 2006). Az EC-k képesek a baktériumokat fagocitálni, a toxinokat szekvesztrálni és semlegesíteni, a patogén-asszociált molekuláris mintázatot (PAMP) detektálni, hozzájárulva ezzel a veleszületett

és adaptív immunitás aktiválásához (McGuckin és mtsai 2009). IBD-ben a bélnyálkahártya permeabilitása megnövekszik, ezáltal szabaddá válik az út patogén és oportunistá patogén baktériumok számára, ezáltal a bél falban egy gyulladásos kaszkád indul el (Salim és mtsai 2010, Shen és mtsai 2009).

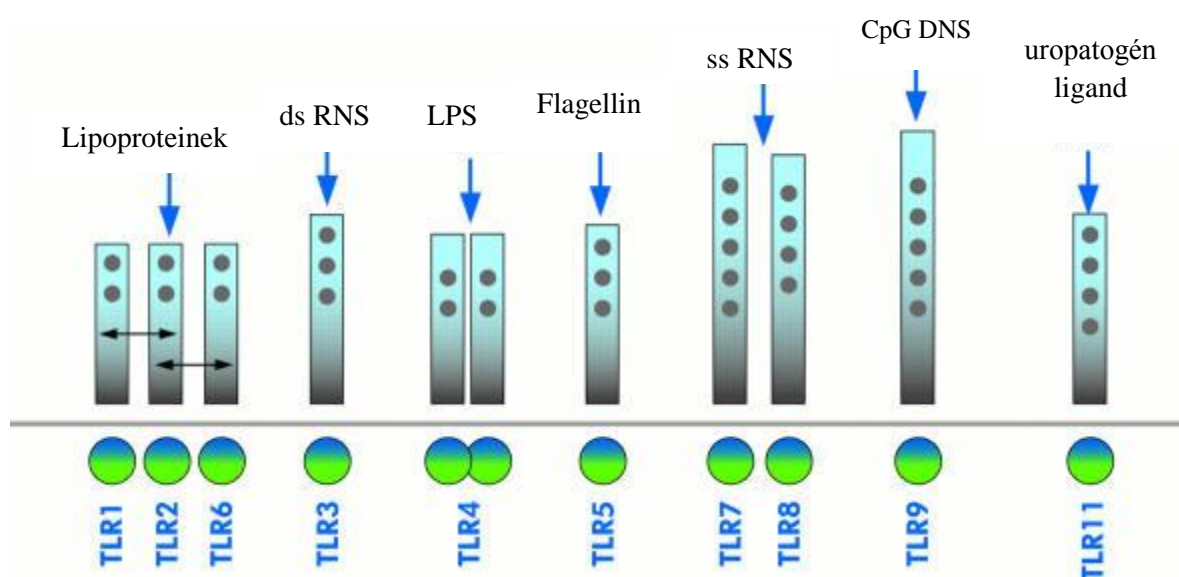


**2. ábra: Az IBD és az intesztinális mikroflóra kapcsolata.** Az IBD-ben jelenlévő diszbiózist a kommenzális flóra baktériumtörzsei és oportunistá patogén baktériumtörzsek okozzák. A mikrobiális egyensúly felbomlása hozzájárul az epithelialis tight junction (TJ) fehérjék expressziójának csökkenéséhez és a bélpermeabilitás növekedéséhez. Az epithelbarrier működési zavara emelkedett bakteriális transzlokációhoz vezet. A baktériumok ölési mechanizmusa szintén zavart. Az ineffektív bakteriális ölömechanizmusok fokozott Toll-like receptor (TLR) stimulációhoz vezetnek, beindítva a veleszületett és T-sejt mediált adaptív immunválaszokat. IL: interleukin, TNF  $\alpha$ : Tumor nekrosis faktor a, TGF  $\beta$ : transzformáló növekedési faktor béta, LPS: lipopoliszacharid (Laukoetter és mtsai 2008).

### I.3. A veleszületett immunitás és a gyulladásos bélbetegség

Az intesztinális mukózának a lehető leggyorsabban fel kell ismernie a gazdaszervezetet fenyegető patogén törzseket és kontrollált immunválaszokat kell beindítania,

ugyanakkor elvárás, hogy „érzékeny” maradjon a mindenütt jelen lévő kommenzális baktériumokkal szemben. Az ún. mintázatfelismerő receptorok (PRR) nagy szerepet játszanak a veleszületett immunválaszok szabályozásában (Candia és mtsai 2011, Clavel és mtsai 2007), hogy megkülönböztessék a „saját” és a mikrobiális „nem-saját” molekulákat, a nagymértékben konzervált molekuláris mintázatok felismerése alapján. A Toll-like receptorok (TLR), amelyek a PRR-k transzmembrán receptorcsaládjába tartoznak, alapvető fontosságúak a mikrobák felismerésében, az antimikrobiális gének indukciójában és az adaptív immunválaszok kontrolljában (Areal és mtsai 2011, Cario és mtsai 2005, Kawai és mtsai 2011), (3. ábra).



**3. ábra A TLR ligandok diverzitása.** Különböző patogén asszociált molekuláris mintázatok (PAMP) szelektíven aktiválják a Toll-like receptorokat (TLR). Minden TLR a különböző patogének speciális, ún. „molekuláris mintázatát” ismeri fel (Cario és mtsai 2005).

Az emlősökben előforduló TLR-k transzmembrán glikoproteinek (Kurokawa és mtsai 2012, Zhou és mtsai 2012). A TLR-k ún. alarmírozó szignálokat ismernek fel, amelyek mikrobiális (kommenzális vagy patogén) vagy vírus-asszociált és károsodás-asszociált (endogén vagy exogén) molekuláris mintázatok (Smith és mtsai 2011). Az összes TLR, kivéve a TLR3, a MyD88 adapter proteinen keresztül aktiválja a „downstream” jelátviteli utakat, a TLR4 mind MyD88-függő, mind MyD88-független útvonalon is

aktiválódik. A MyD88-on keresztüli kapcsolódás számos jelátviteli utat indít be, ilyen az IRAK, TRAF6 és a TAK1, amelyek a NF $\kappa$ B, AP-1, EIk-1, CREB, STAT és IRF transzkripciós faktorok aktiválódása (Gao és mtsai 2012, Wang és mtsai 2011). Mindezen mechanizmusok arra irányulnak, hogy a gazdaszervezet homeosztázisát fenntartsák a környezeti behatásokkal szemben (Cario és mtsai 2010). Egyes feltevések szerint az IBD a mukózális immunrendszernek a kommenzális flórára adott túlzott immunválaszai miatt alakul ki. Az „egészséges” bélnyálkahártya kis koncentrációban expresszálja a TLR2 és TLR4 receptorokat (Heno-Mejia és mtsai 2012). Aktív IBD-ben, a TLR4 gén variáns alléljai elősegíthetik az LPS receptor működési képtelenségét (Fukata és mtsai 2011, Heimesaat és mtsai 2007). A TLR4 expresszió növekedését okozhatja a ligandja, az LPS, valamint T-sejt termelte citokinek, mint az interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) és tumor nekrozis faktor-alfa (TNF- $\alpha$ ), amelyek az IBD patogenezisében alapvető szerepet töltenek be (Tewari és mtsai 2012, Levin és mtsai 2008). Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy az egészséges kontrollokhoz viszonyítva mind a TLR2 mind a TLR4 mRNS expressziója és fehérje mennyisége is megnövekedik az újonnan diagnosztizált, IBD-s gyermekek gyulladt vastagbél nyálkahártyájában (Szebeni és mtsai 2007). A bél mukózális barrierének sérülése számos kommenzális patogén alkotórészeként jelen lévő TLR ligandum felvételét idézi elő, amelyek lehetséges gyulladásoz válaszokat váltanak ki a bélben. A béllumen homeosztázisának felborulásával a sejtvédő és helyreállító faktorok termelődése is zavart szenved (Rakoff-Nahoum és mtsai 2004, Sziksz és mtsai 2010).

Munkacsoportunk IBD-s gyermekek vastagbél biopsziás mintái mellett, áramlási citométerrel perifériás vérben is vizsgálta a veleszületett immunrendszer részéről a TLR4 expressziót. A TLR4 expresszió megemelkedett az újonnan kórismézett, kezeletlen IBD-s gyermekek perifériás vérében a kontrollhoz viszonyítva. Mind saját, mind irodalmi adatok alapján elmondható, hogy a veleszületett immunválaszok közül a TLR4-LPS jelátviteli utak alapvető jelentőségűek az IBD patogenezisében (Sotolongo és mtsai 2011).

#### I.4. Az adaptív immunitás és a gyulladásos bélbetegség

A veleszületett immunitás mellett, az adaptív immunválaszoknak is kiemelkedő jelentőségük van az IBD patogenezisében. Az adaptív immunrendszer részéről a T-sejt populációnak van a legnagyobb szerepe IBD-ben (Abraham és mtsai 2011). A T-sejtek aktiválódnak, citokineket szecernálnak és ezen keresztül hatnak környezetük sejtjeire - mint dendritikus sejt, makrofág, neutrofil granulociták, epitelsejtek, endotelsejtek (La Scaleia és mtsai 2012, Verdier és mtsai 2012). A humán, és az egér tanulmányok arra utalnak, hogy mind MC-ben, mind UC-ben a különböző T-sejt alpopulációk kórosan aktiválódnak (Monteleone és mtsai 2011, Shahidi és mtsai 2012). Az IBD kialakulásában sokáig kulcsfontosságúnak tartották a regulátoros T-sejt (Treg) szubpopulációt. Ez az egyik sejtcsoport, amely felelős a bélnyálkahártya immunológiai egyensúlyának fenntartásáért (Inaba és mtsai 2010, Hundorfean és mtsai 2012). A CD4+CD25+ Treg-sejtek transzkripciós faktora a FoxP3, melynek hiánya autoimmun endokrin betegséghez, immunhiányhoz, és főleg vékonybelet érintő enteropáthiához vezet (IPEX) (Siegmund és mtsai 2011, Moes és mtsai 2010). Gyulladt bélnyálkahártyában a CD4+CD25+ T-sejtek, a FoxP3-t expresszáló T-sejtek expressziója megemelkedik a nem-gyulladt mukózához képest (Maul és mtsai 2005, Veltkamp és mtsai 2011). Munkacsoportunk vizsgálta a veleszületett immunitás változásait IBD-s betegek perifériás vérében. Az újonnan diagnosztizált MC-s gyermekek perifériás vérében Th1 típusú sejtek voltak túlsúlyban. A memória és aktivált limfociták, valamint a dendritikus sejtek és monociták prevalenciája megemelkedett a kontrollhoz képest. A vastagbél nyálkahártyával pontosan ellentétesen a CD4+ CD25 magas T-sejtek megőrizték szuppresszor aktivitásukat, a CD4+ CD25 magas és FoxP3-t expresszáló Treg-sejtek száma csökkent MC-s gyermekek perifériás vérében a betegség aktív szakában, a kontrollcsoportéhoz viszonyítva (Cseh és mtsai 2010).

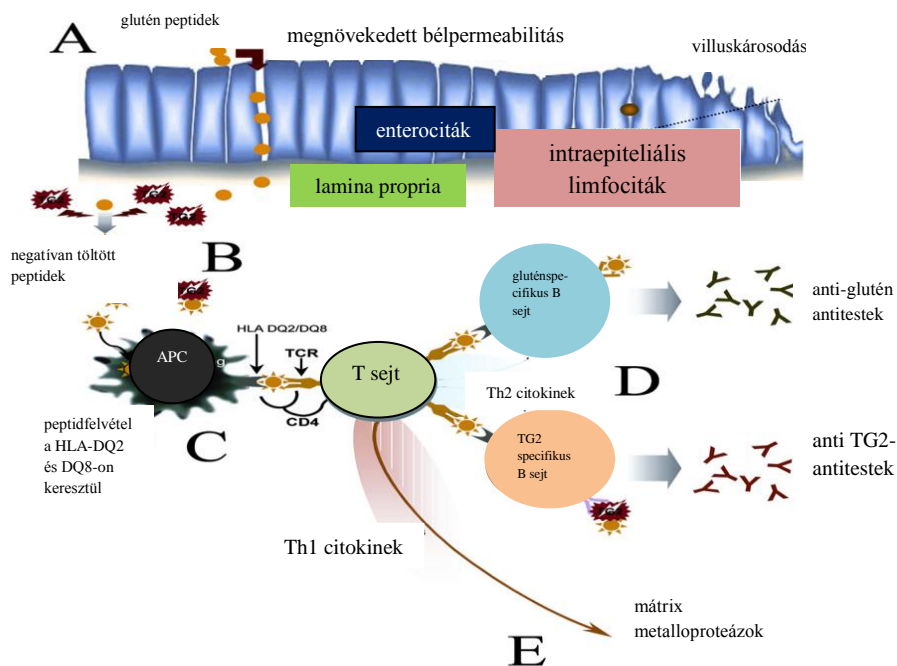
IBD-ben ez az immunregulációs kapocs kiemelten fontos, ugyanis a bélben megjelenő kommenzális baktériumok ligandként szolgálnak a TLR-oknak, ugyanakkor a mukózális barrierintegritás felbomlása hozzájárul a veleszületett és T-sejteken keresztüli adaptív immunválaszok kiváltásához, ezáltal előmozdítva a betegség kialakulását (von Maren és mtsai 2008, Gaboriau-Routhiau és mtsai 2011).

## II. Cöliákia

A cöliákia (CD) egy immun-mediált szisztémás kórkép, melyet a búzában, árpában, rozsban jelen lévő glutén és a kapcsolódó prolaminek váltanak ki genetikailag fogékony egyéneknél (Husby és mtsai 2012). A glutén peptideket HLA-DQ2 és DQ8 molekulák mutatják be genetikailag fogékony egyéneknél az antigén-prezentáló sejteken. A betegségre specifikusan jellemző a glutén-dependens, keringő autoantitestek jelenléte, melyek a transzglutamináz 2-t (TG) célozzák meg (Gierspien és mtsai 2012, Caja és mtsai 2011). Az autoantitestek szűrése és a vékonybél boholykárosodásának megerősítése miatt a CD diagnózisa egyre biztosabb. A betegség prevalenciája az Egyesült Államokban, valamint Nyugat- és Közép-Európában 1:70 és 1:200 közé tehető (Mustalahti és mtsai 2010). Ez az előfordulás a kor előrehaladtával nő, Finnországban az 52 évesnél idősebbek random szűrése 1:47 prevalenciaértéket mutatott (Vilppula és mtsai 2011). Az autoantitest-szűrés kapcsán diagnosztizált betegek kb. 80%-a tünetmentes, vagy enyhe, nem-hasmenés asszociált panaszai voltak (Lindfors és mtsai 2011).

A CD klasszikusan egy krónikus, malabszorpciós kórkép, melyben a vékonybél boholyatrófiája, kriptahiperpláziája és intraepiteliális limfocitózisa számít a diagnózis arany standardjának. A tünetek többsége az anémia, oszteoporózis és általános rossz közérzet, amely átfedést mutathat az extraintesztinális tünetekkel (Goddard és mtsai 2011, Korpimäki és mtsai 2011). Előzetes vizsgálatok kimutatták, hogy glutén-asszociált, extraintesztinális kórképek is megjelenhetnek enyhe vagy hiányzó gasztrointesztinális tünetekkel. Ilyen extraintesztinális tünet az oszteopénia és csonttörések kockázatának megemelkedése, meddőség, transzaminázok káros emelkedése és májelégtelenség, központi idegrendszeri érintettség (cerebelláris ataxia, perifériás neuropátia, szkizofrénia), autizmus, autoimmun miokarditisz, malignus megbetegedések és az autoimmun betegségek megnövekedett kockázata. A legismertebb, glutén által okozott extraintesztinális tünet a dermatitisz herpetiformis (Dühring-kór), amely normális intesztinális morfológia mellett hólyagos elváltozást okoz a bőrön. Az intesztinális és extraintesztinális tünetek már akkor megjelenhetnek, amikor a mukózális morfológia teljesen épnek tűnik (Korponay-Szabó és mtsai 2004, Maynard és mtsai 2011, Heyman és mtsai 2009). A tünetek többsége a gluténmentes

étrend (GFD) hatására javul. A GFD egész életen át tartó, szigorú diéta, melyet nehéz betartani és könnyen szociális elszigeteltséghez vezethet, mivel a modern étrendek többsége gluténtartalmú (Comino és mtsai 2012, Richard-Miceli és mtsai 2012), (4. ábra).



**4. ábra: A humorális és sejt-mediált immunválaszok és későbbi mukózális sérülés sematikus ábrája cöliákiában.** A) Az emésztőenzimekre rezisztens glutén peptidek az epitélbarrieren átvándorolnak, növelve ezzel a bélfal permeabilitását. B) A glutén peptideket a TG2 deamidálja, ezáltal immunstimuláló epitópokat képez. A glutén peptidek kovalensen kötődnek a TG2-höz. C) A deamidált peptideket antigénprezentáló sejtek (APC), mint dendritikus sejtek (DC), makrofágok vagy B-sejtek mutatják be. D) A glutén-specifikus T-sejtek TG2 specifikus B-sejtek fokozott proliferációjához, valamint glutén-ellenes antitestek felszabadulásához vezetnek. A TG2-specifikus B-sejteket glutén-specifikus T-sejtek is képesek aktiválni. E) Az aktivált T-sejtek által termelt proinflammatorikus citokinek fokozzák a mátrix metalloproteázok szintézisét, hozzájárulva az epitélium károsodásához és a szöveti átalakuláshoz (Briani és mtsai 2008).

## II.1. A cöliákia és genetika

A CD patogenezisében alapvető a genetikai fogékonyság. Virtuálisan minden CD-s beteg HLA II osztályba tartozó HLA-DQ2 vagy HLA-DQ8 heterodimer génekkel



rendelkezik. A glutén peptideket ezek a CD-asszociált HLA II osztályba tartozó molekulák prezentálják. Bár a HLA-DQ2 vagy HLA-DQ8 a CD-re hajlamos populáció 30-35%-ban előfordul, de mindössze a hordozók 2-5%-nál alakul ki a betegség (Dezsőfi és mtsai 2008, Biagi és mtsai 2012). Ez egyben azt is jelentheti, hogy a környezeti faktorok hozzájárulnak a CD létrejöttéhez (Caccamo és mtsai 2010, Schumann és mtsai 2008, Sollid és mtsai 2012).

## II.2. A cöliákia és a mukózális barrier

Munkacsoportunk több szempontból vizsgálta a mukózális barrier felbomlásának jelentőségét CD-ben. A TJ-k komplex struktúrák, melyek legalább 50-féle fehérjéből tevődnek össze, biztosítják a sejt-sejt adhéziót és fenntartják a paracelluláris teret. A TJ-k számos transzmembrán fehérjéből állnak, melyek aktin filamentumok horgonyoznak ki a citoskeletális elemekhez. A bélhámsejteket összekötő struktúrák gerincét az okkludinok mellett a klaudinok (CLD) adják, melyeket a junkcionális adhéziós molekulák építőkövei. Élettani körülmények között a bélben a CLD-1, -3, -4, -5 és -8 csökkenti a paracelluláris permeabilitást, a CLD-2 töltésszelektív paracelluláris pórusokat képez (Ulluwishewa és mtsai 2011, Scanlon és mtsai 2011). Harminchárom CD-s gyermek proximális és disztális duodenum szakaszából vett biopsziás mintában vizsgáltuk a CLD-2, -3, -4 expresszióját immunhisztokémiai módszerrel. A CLD-2 és -3 expressziója szignifikánsan növekedett a súlyos, szubtotális boholyatrófiával diagnosztizált CD-ben, a kontrollokkal összehasonlítva. A CLD-4 expressziója nem változott a vizsgált csoportokban. A CLD-2 és -3 megnövekedett expressziója a TJ strukturális változásaira utalhat CD-ben, amely akár felelőssé tehető a CD-re jellemző fokozott permeabilitásért és sejtproliferációért (Nagy Szakál és mtsai 2010). Továbbá vizsgáltuk a mukózális barrierintegritásban szerepet játszó hipoxia-indukálta faktor  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ) és hozzá kapcsolódó jelátviteli útvonalait CD-ben.

Vizsgálatainkban a HIF- $1\alpha$  mRNS expresszió és fehérjeszint megnőtt az újonnan diagnosztizált CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájában a kontrollhoz és GFD-

csoporthoz képest, hozzájárulva a mukózális nyálkahártya épségének visszaállításához és az EC apoptózis csökkentéséhez (Vannay és mtsai 2010, Sziksz és mtsai 2010).

### II.3. A glutén és a veleszületett immunitás

Bár az adaptív immunrendszer gluténra adott válaszai jobban ismertek, a búza, árpa, rozs fehérjéi, ellentétben más gabonából (pl. kukorica, rizs) származó nem toxikus gabonafehérjékkel, képesek veleszületett immunválaszokat kiváltani a „professzionális” antigénprezentáló sejtek (monociták, makrofágok, dendritikus sejtek) segítségével. Az antigén bemutatása aktiválja az intraepiteliális limfocitákat (IEL) és az intesztinális epitélisejteket (Di Sabatino és mtsai 2012, Rescigno és mtsai 2009). Ez az immunválasz azonnal jelentkezik és általában egységes mikrobiális antigének ellen irányul, de CD-ben bizonyos gabonafehérjék ellen is fellép. CD-ben a veleszületett immunrendszer válaszai előmozdítják a glutén ellen irányuló adaptív immunválaszokat a HLA-DQ2 és HLA-DQ8 genetikai fogékonyságú egyéneknél. (Barone és mtsai 2011). Az intesztinális mikroflóra összetétele és megváltozása is hozzájárulhat a CD kialakulásához (Tjellström és mtsai 2005). A veleszületett immunrendszer részéről a Toll-like receptorok, különösen a MyD88-függő és független jelátviteli útvonalon keresztül aktiválódó TLR4, vezető szerepet töltenek be a CD patogenezisében (Kalliomäki és mtsai 2011, Di Simone és mtsai 2010). Munkacsoportunk előzetesen vizsgálta a TLR2 és TLR4 mukózális mRNS expresszióját és fehérje szintjét 16 újonnan diagnosztizált CD-s, 9 GFD-t tartó CD-s betegben, 10 egészséges kontrollhoz viszonyítva. Mind a TLR2, mind a TLR4 mRNS expressziós szintje szignifikánsan megemelkedett a CD-ben a kontroll csoporthoz képest, a legmagasabb TLR2 és TLR4 mRNS expresszió a GFD-s csoportban volt. A TLR2 és TLR4 fehérjeszintje szignifikánsan emelkedett a CD-s duodenum nyálkahártyájában a kontrollhoz képest, ez a paraméter GFD-ben még magasabb volt (Szebeni és mtsai 2007). A TLR4 egy funkcionális LPS-felismerő komplexet képez az MD-2, CD14 és LPS-kötő fehérjével (LBP) (Laparra Llopis és mtsai 2010). Fiziológiai körülmények között a TLR részt vesz az intesztinális epiteliális barrier és az orális tolerancia fenntartásában, ezáltal az intesztinális homeosztázis fenntartásában. A TLR2 és TLR4 fokozott mRNS és fehérjeexpressziója az érintett CD-s nyálkahártyájában egy kóros TLR jelátvitelre utalhat,

amely szöveti károsodást és barrierdestrukciót okoz a túlzott citokin és kemokintermelés, valamint a kommenzális baktériumok mediálta vastagbélnyálkahártya progenitorjainak elvesztése révén (Cario és mtsai 2000, Pellegrino és mtsai 2011). Munkacsoportunk CD-s gyermekek perifériás vérében is vizsgálta a veleszületett immunitás sejtjeit. A még nem diétázó CD-s csoportban az APC-k TLR2 és TLR4 expressziója fokozottabb volt a kontrollhoz képest. A TLR2 és TLR4 emelkedett expressziója az APC-k folyamatos aktiválódását jelentheti, amely az adaptív immunválasz fokozott működéséhez vezethet az aktivált CD4+ sejtek emelkedett prevalenciája révén. Figyelemre méltó azonban, hogy a veleszületett immunrendszer részéről sem a bélmukózában, sem a perifériás vérben nem normalizálódott a TLR2 és TLR4 expresszió a GFD-n tartott CD-s betegekben. Klinikailag a tünetek megszűntek, a TG2-ellenes autoantitest titer fiziológiás tartományba csökkent, de a veleszületett immunrendszer dinamikája, normalizálódása eltérő módon változhat (Cseh és mtsai 2011). Egyrészt számos patológiai tanulmány bizonyítja, hogy a mukóza helyreállítása több időt vesz igénybe a klinikai tünetek elmúlásához képest, bár a magas IEL szubpopulációk aránya és a kóros Th1 citokinek mennyisége is normalizálódik (Walker és mtsai 2011). A CD3 $\gamma$ T-sejtek magas prevalenciája diétától független, azaz a GFD bevezetése után sem változott (Calleja S és mtsai 2011). A veleszületett immunrendszer részéről a TLR-k és a  $\gamma$ T-sejtszám megemelkedése kiemelt szereppel bírhatnak a CD kialakulásában. Ezek alapján feltételezhető, hogy a gliadin és egyéb káros peptid tartós változásokat okoznak a veleszületett immunválaszok egyes elemeiben (Saurer és mtsai 2009, Savilahti és mtsai 1990).

#### II.4. Az intraepiteliális limfociták szerepe

Munkacsoportunk vizsgálta a szérum- és glukokortikoid-regulált kináz-1-et (SGK-1), amely egy szerin/treonin protein kináz és gátolja az apoptózist, és így kompenzálja az enterociták túlzott pusztulását. Vizsgálataink azt mutatták, hogy mRNS és fehérje szinten is megnőtt a SGK-1 expressziója újonnan diagnosztizált CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájában. Az eredmények felvetik, hogy a SGK-1 esetlegesen hozzájárul CD-ben az EC-k túléléséhez (Szebeni és mtsai 2010).

## II.5. Az adaptív immunitás elemei cöliákiában

A CD patogenezisével foglalkozó kutatások többsége az adaptív immunitás zavarát írják le. CD-s biopsziás mintákban a T-sejtek prevalenciája nőtt, az aktivált T-sejtek száma pedig mind a bélnyálkahártyából származó biopsziás, mind a perifériás vérmintákban megemelkedett (Tjon és mtsai 2010, Lindfors és mtsai 2012). A gasztrointesztinális traktus gyulladással hoz létre, amely a natív glutén peptidek felé irányuló tolerancia elvesztésével és a szöveti károsodás mellett a TG2 fokozott deamidálása zajlik le (Schappi és mtsai 2012). Kutatócsoportunk vizsgálta az adaptív immunrendszer sejtjeit CD-s gyermekek perifériás vérében. Frissen diagnosztizált CD-s betegekben alacsonyabb volt az 1-es típusú segítőkész T-sejtek (Th1) és a természetes ölősejtek előfordulási gyakorisága, míg az aktivált CD4+ T-sejtek prevalenciája megemelkedett a kontrollhoz viszonyítva. GFD-s betegek perifériás vérében az adaptív immunitás sejtjeinek prevalenciája normalizálódott (Cseh és mtsai 2011).

## **III. Az intesztinális alkalikus foszfatáz**

### III.1. Alkalikus foszfatáz izoenzimek

Az alkalikus foszfatáz (ALP) az egyik leginkább vizsgált enzim a rutin laboratóriumi vizsgálatokban és a leggyakrabban használt biokémiai marker az oszteoblasztos csontformációkban. Az ALP egy glikoprotein, amely glikozil-foszfátidil-inozitol karral kapcsolódik a sejtmembrán külső részéhez. In vivo az ALP oldékony homodimerként kering a vérben. Az oldékony, keringő formából sejtmembránhoz horgonyzott forma alakulhat ki, melyet az endogén GPI-specifikus foszfolipáz D szabályoz (Dziedziejko és mtsai 2005).

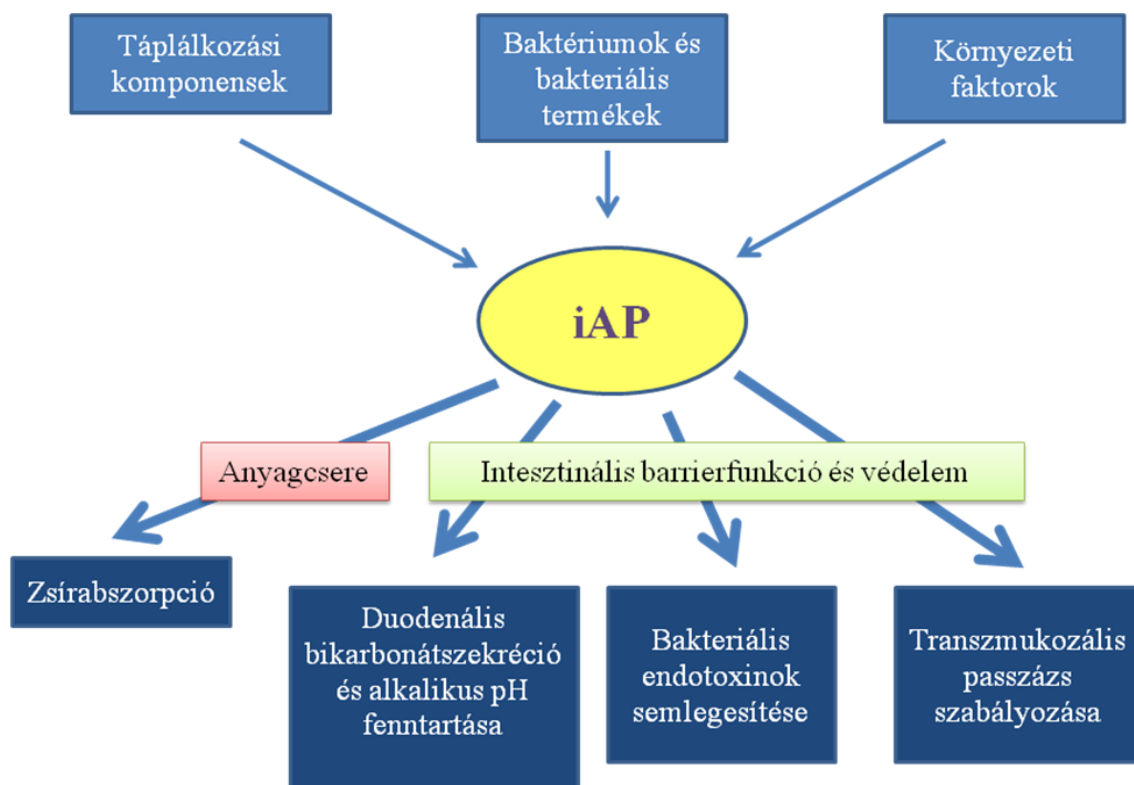
Az ALP molekula számos szövetben előfordul, melyek szerkezetben, kinetikus tulajdonságokban, molekulaméretben és izoelektromos pontban különböznek egymástól. Ismerünk bél-, máj-csont-vese-, placenta és placenta-szerű (here és csecsemőmirigy termeli) eredetű ALP-eket. Az ALP különböző formáit gélelektroforézissel választják el egymástól, a laboratóriumi normálértéke 20 és 140 IU/l között van (Veerappan és mtsai 2011). A rutinvizsgálatok során diagnosztizált

hiperfoszfatázémiának számos oka lehet, melyek döntően máj vagy csont eredetűek. Ilyen kórképek máj eredetű betegségekben az epepangás, kolecisztitisz, kolangitisz, cirrózis, hepatitisz, zsírmáj, májtumor, májmetasztázis és gyógyszerintoxikáció. Csont eredetű emelkedett ALP szintek előfordulnak Paget-kórban, oszteoszarkómában, csontmetasztázisban, csonttöréskor, mieloma multiplexben, oszteomaláciában, vesebetegségben szekunder hiperparatiroidizmus révén, policitémia verában, hormonális fogamzásgátló tabletták szedésekor és terhességben. Az ALP csökkent szintje jelentkezhethet malnutricióban, magnéziumhiányban, mellékpajzsmirigy alulműködéskor, akondropláziában, súlyos enteritisz után, anémia perniciozában, aplasztikus anémiában, krónikus mieloid leukémiában és Wilson-kórban (Chong és mtsai 2011). A humán szérumban a csont és máj izoenzimek dominálnak. A csont izoforma más enzimekkel is kapcsolatban van, beleértve a plazma sejtmembrán glikoprotein-1-et és a PHOSPHO1-et, amelyek a gyermekgyógyászatban kiemelt jelentőségűek a csontnövekedés és a csont ásványianyag-tartalmának meghatározása miatt (Delmas és mtsai 1993). Az ALP gén a 1p36-p84 lókuszon kódolja a humán nem-szövet-specifikus ALP-t (TNSALP), amelyből a csont, máj és vese izoformák származnak. A TNSALP-ből származó izoformák különbözőségét a poszttranszlációsan hozzáadott glikánmolekulák adják. Az ALPI gén a 2q34-q37 lókuszon a humán intesztinális ALP (iAP) izoenzimet kódolja. Az újonnan keletkező enzimfehérje glikozilációja az edoplazmás retikulumban zajlik, majd a Golgi-apparátuson keresztül a sejtmembránba kerül. A sejt felszínén az ALP oldalirányban meglehetősen mozgékony és csomókba csoportosul (Fishman és mtsai 1990).

### III.2. Az intesztinális alkalikus foszfatáz funkciói

Az iAP enzim az érett EC-k mikrovillus felszínéhez kihorgonyzott fehérje, amely az EC-n belül, valamint bazolaterálisan is megjelenhet. Az iAP kitűnő markere az EC differenciálódásának is (Olsen és mtsai 2005). A duodenum kefeszegélye fiziológiásan alkalikus pH-t biztosít, melyet aktív  $\text{HCO}_3^-$  szekrécióval ér el és ez a mikroklíma biztosítja a mukózális borítás stabil működését. Az iAP nevéből is adódóan, alkalikus pH-n működik a legjobban és aktivitása a duodenum kezdeti szakaszán a legnagyobb. A  $\text{HCO}_3^-$ -t expresszáló szervek, mint a duodenum, epevezeték, hasnyálmirigy vezeték és a

légutak egyszerre expresszálják ALP-t és cisztás fibrózis transzmembrán regulátort (CFTR). Az ALP aktivitása összefügg a CFTR-dependens elektrogén  $\text{HCO}_3^-$  szekrécióval, az apikális P2Y purinerg receptorok jelenlétével (Goldberg és mtsai 2008). Az iAP regulálja a zsírszorbpciót és a szerves foszfátok hidrolizálását (Akiba és mtsai 2007). Az iAP aktivitása zsírban gazdag élelmiszer fogyasztása után megemelkedik mind a szérumban, mind a béllumenben (5. ábra).



5. ábra: Az intesztinális alkalikus foszfátáz (iAP) alapvető funkciói fiziológias állapotban (Lallés 2010).

Az iAP szekréciója szurfaktáns-szerű partikulumokon (SLP) keresztül valósul meg. A SLP-k az EC-k olyan lipoprotein típusú szekréciós termékei, melyek iAP-ban, foszfatidil-kolinban gazdagok és a tüdő szurfaktánsal sok tulajdonságukban megegyeznek. A hosszú-láncú zsírsavak a vékonybél kefeszegély iAP molekuláihoz kötődnek és ezek az iAP-pal borított zsírpartikulumok a bélepitéliumon keresztül a lamina propria interstíciumába, majd a centrális nyirokérbe kerülnek (Kaur és mtsai 2007).

Az iAP nem rendelkezik terminális szíálsavval a szénhidrát láncán, így egyértelműen a hepatocitákba jut a nyirokkeringéssel. A májsejtek a deszializált glikoproteineket veszik fel és ez az iAP komplex már L-homoarginin gátlásán ment keresztül (Zhang és mtsai 1996). A membrán-kötött iAP lehetséges inhibitorai a fenilin-1,3-difoszfónát, a 2,6-dinitrofenilfoszfónát és a foszfono-acetaldehid (Shirazi és mtsai 1981). Az iAP expressziója éhezéskor lecsökken (Martins és mtsai 1998), amely összefügg a bél mukózális barrierkárosodásával is. A kefeszegélyhez kötött iAP aktivitása disznóbélben végzett kinetikus mérések alapján a duodenumban a legmagasabb, a jejunumban közepes és az ileumban már alacsony. Az enzim affinitása a jejunumban négyszer magasabb, mint a duodenumban és az ileumban. A vastagbél iAP aktivitásának felmérésére nem történtek vizsgálatok (Fan és mtsai 1999).

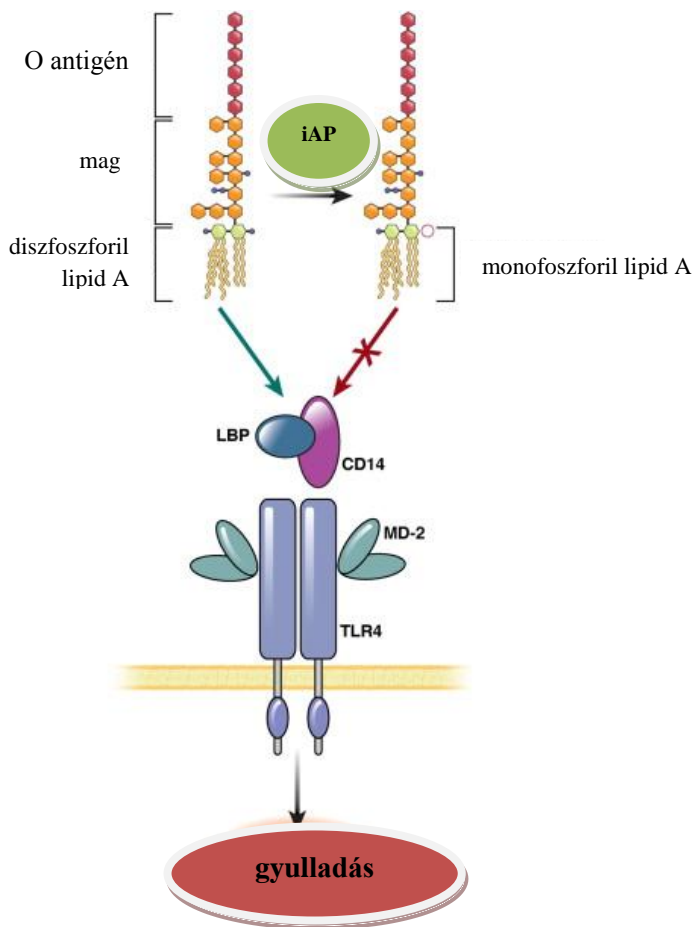
Az iAP-ot, a zsírszorbpció aktivitása mellett (Lynes és mtsai 2011), a bél mukózális védelmi faktoraként tartják számon. Az iAP detoxifikálni képes a Gram-negatív baktériumok külső membránjának alkotórészét, az LPS-t, amely a TLR4 ligandja. Az első fejezetben részletesen elemeztem az intesztinális barrier fenntartásának jelentőségét. Az intesztinális epitélium baktériumok millióival találkozik, melyek a kommenzális flóra tagjai és segítenek az emésztési folyamatokban is. Ezek a fiziológiás körülmények között ártatlan baktériumok bizonyos körülmények között opportunistá fertőzéseket, krónikus gyulladást és szeptikus sokkot eredményezhetnek (Lu és mtsai 2010). Az intesztinális epitélium felszíne és a bakteriális flóra között egy finom egyensúly van, amely megelőzi a fertőzéseket és a gyulladást. Az iAP esszenciális tényező a bélhomeosztázis fenntartása szempontjából. A 300 m<sup>2</sup>-es intesztinális epitélium integritásának fenntartásában a TJ-k, a veleszületett immunitás sejtjei és antimikrobiális peptidok vesznek részt. A környezeti és genetikai faktorok képesek megváltoztatni az intesztinális homeosztázist és egyéneket fogékonyá tenni a krónikus bélgyulladás iránt. Éhezés, krónikus betegségek, sebészeti beavatkozás szintén megbonthatja az intesztinális epiteliális barrier, ezáltal a nyálkahártya „lyukassá” válik, lehetővé téve ezzel a baktériumoknak a szabad átjárást, mely fertőzéshez és esetleges szepszishez vezet (Martins és mtsai 1998, Sakiyama és mtsai 2009).

Az LPS a baktériumok külső membránjának legfőbb alkotóeleme és nagymértékben felelőssé tehető a szeptikus sokk, a kardiovaszkuláris rendszer összeomlása és a

hemodinamikai instabilitás mediálásáért (Lorne és mtsai 2010). A TLR4 központi szerepet játszik a baktériumok felismerésében és a megfelelő immunválaszok kiváltásában, de aktiválása nagymértékben szabályozott a kontrollálhatatlan gyulladással járó reakciók kivédése miatt. Fiziológiai körülmények között a szervezet nem válaszol az intesztinális lumenben nagy koncentrációban megjelenő LPS-re. A TLR4 detektálja az LPS-t és a szeptikus sokk kialakulásáért felelős proinflammatorikus citokinek transzkripcióját indítja be. Kiemelésre érdemes, hogy a TLR4 expressziója térben is szabályozott, ugyanis az EC-k apikális felszínén nincs jelen, megakadályozva ezzel a TLR4-LPS interakciót. A TLR4 aktivációt enyhíteni lehet az LPS enzimatisz módosításával. Ezt a feladatot végzi az iAP. Az iAP az LPS-t hidrolízis révén detoxifikálja, így a TLR-függő gyulladással járó válaszok nem aktiválódnak (Goldberg és mtsai 2008, Richter és mtsai 2011).

Az LPS egy „lipid A” részhez kapcsolódó poliszacharid magból és O-specifikus poliszacharid régióból áll. A lipid A régió tehető felelőssé az LPS toxikus hatásáért. Az iAP defoszforilálja a difoszforilált „lipid A” részt, ezáltal egy nem toxikus, monofoszforilált LPS-származék keletkezik. Ez a folyamat megakadályozza, hogy a LBP-hez, valamint a CD14 receptorhoz és MD-2 molekulához kötődjön az LPS és így nem jön létre a TLR4-LPS interakció és a MyD88-függő jelátviteli utak sem aktiválódnak (Geddes és mtsai 2008). A LBP egy olyan szérumfehérje, amely gyorsan katalizálja a membrán-kötött vagy oldékony CD14 és LPS transzferét. Bár a CD14-et LPS receptorként tartják számon, ez egy glikozil-foszfatidil-inozitol-kötött fehérje, amelynek hiányoznak a transzmembrán és az intracelluláris doménjei. A mechanizmus, mellyel a CD14 transzmembrán szignálokat vált ki, máig ismeretlen, de az LPS-CD14 komplex LPS-indukált sejtaktivációhoz vezet. A TLR4-nek szüksége van egy járulékos molekulára, a MD-2-re, amely a TLR4 extracelluláris doménjével komplexet képez a hatékonyabb LPS-felismerés érdekében. Az LPS a CD14-hez kötődik, majd a TLR4-MD-2 komplexhez szállítódik (6. ábra).





**6. ábra: Az intesztinális alkalikus foszfatáz (iAP) lipopoliszacharidot (LPS) detoxifikáló folyamata.**

Az LPS egy poliszacharid magból, hozzá kapcsolódó O-antigén csoportból és lipid A részből áll. A lipid A rész felelős az LPS toxikus hatásáért a TLR4-en keresztüli aktivációja révén, miután hozzá kötődött az LPS kötő fehérjéhez (LBP), a CD14 és MD-2 koreceptorokhoz. A TLR4 kontrollálatlan aktivációja súlyos gyulladáshoz vezethet. A gyulladást az iAP képes megfékezni, amely az LPS „lipid A” részét defoszforilálja és egy inaktív monofoszforilált lipid A részt hoz létre. A monofoszforilált A forma nem képes a LBP, CD14 és MD-2 koreceptorok kötéséhez, ezáltal a TLR-4 dependens gyulladástól megvédi a szervezetet (Geddes és mtsai 2008).

A fentiekén kívül 4 heterogén receptorkomplex képes az LPS kötésére. Ezek a hősokk-fehérje 70 és 90, valamint a kemokin receptor 4 és a növekedési differenciálódási faktor 5. AZ LPS TNF- $\alpha$  szekréció indukálására is képes, ezzel beindíthatja az adaptív immunválaszokat is. A különböző szupramolekuláris elrendeződések adhatnak magyarázatot arra, hogy ezek a nagymértékben konzervált LPS-CD14 molekulák hogyan tudnak ennyire gyorsan a patogén környezettel és a gazdaszervezettel

együttműködni, beindítva ezzel további jelátviteli útvonalakat (Triantafilou és mtsai 2002, Mencarelli és mtsai 2011, Larrosa és mtsai 2011).

Az LPS felismerése kapcsán a TLR4 oligomerizálódik és Toll-interleukin-1 receptor (TIR) doménnel alkalmazkodó molekulákat gyűjt. Ilyen adapter molekulák MyD88, a TIRAP, TRIF és a SARM. A TLR4 a már említett MyD88 dependens és independens útvonalon is képes jelátviteli utakat beindítani. MyD88-deficiens egér rezisztens volt az LPS-indukálta sokkal szemben és a MyD88 deficiens makrofágok nem termeltek proinflammatorikus citokineket LPS stimuláció kapcsán (Luo és mtsai 2008).

### III.3. Az intesztinális alkalikus foszfát és a bélgyulladás

Az iAP bélgyulladásra gyakorolt hatását először zebrahalban vizsgálták. Az iAP aktivitása megnőtt a zebrahal intesztinális kolinizációja kapcsán, az iAP védő hatású az LPS toxicitásával szemben, ugyanis a defoszforilált LPS kevésbé gyulladáskeltő és toxikus a zebrahalban. Bélgyulladást indukálva az iAP egy negatív, bélhomeosztázist fenntartó választ váltott ki, megelőzve ezzel a TNF- $\alpha$  jelátviteli utakat és a bélgyulladást elindító folyamatokat. Feltételezhető, hogy a MyD88-függő veleszületett immunválaszok gátlása indirekt módon a bélgyulladás csökkenéséhez vezethet (Bates és mtsai 2007, Taniguchi és mtsai 2009), ehhez az iAP a TLR4/MyD88 és TNF- $\alpha$ /TNF-receptor-1 jelátviteli utak gátlásához járul hozzá-az LPS detoxifikálásával (Lallés 2010). Az iAP bélgyulladásban betöltött jótékony szerepét számos állatmodellben kimutatták. A bélgyulladás tüneteit az iAP tablettá csökkentette dextrán-szódium szulfát (DSS)-indukálta kolitiszes egérmodellben. Eddig összesen egy tanulmány jelent meg, amely felnőtt, kezelt IBD-sekben vizsgálta az iAP szerepét (Tuin és mtsai 2009).

### III.4. Az intesztinális alkalikus foszfát cöliákiában

CD-s gyermekek duodenum biopsziás mintájában vizsgálták az iAP enzimaktivitást. Az iAP aktivitása összefüggött a mukózális lézió mértékével, enyhébb lézióban nem volt jelentős iAP aktivitásváltozás, de a közepes és súlyos nyálkahártya-elváltozásokban szignifikáns iAP csökkenést tapasztaltak (Prasad és mtsai 2008). CD-s felnőttek széklet iAP-aktivitása 20%-kal csökkent a kontrollcsoport értékéhez képest (Lehmann és mtsai 1980).

## CÉLKITŰZÉSEK

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

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

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

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

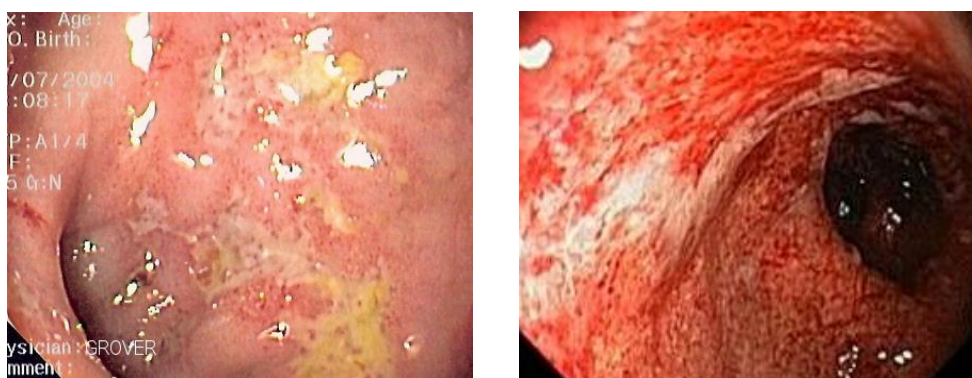
1. Hogyan változik az iAP mRNA expressziója és fehérjeszintje cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában nem cöliákiás kontrollokhoz viszonyítva?
2. Megfigyelhető-e különbség az újonnan diagnosztizált és gluténmentes diétát tartó, kezelt cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájának iAP mRNA és fehérjeexpressziójában?
3. Megfigyelhető-e különbség az iAP és a TLR4 lokalizációjában újonnan diagnosztizált, valamint gluténmentes diétát tartó cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában a kontrollcsoportéhoz képest?

## BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

### I. Egészséges és beteg csoportok

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

Tíz gyermeket (7 fiú, 3 lány; medián kor: 10,5 év, életkor: 1,5-15 év) újonnan diagnosztizált MC-vel, 5 gyermeket (3 fiú, 2 lány; medián kor: 11 év, életkor: 6-17 év) újonnan diagnosztizált UC-vel és 10 kontroll gyermeket (5 fiú, 5 lány; medián kor: 9,5 év, életkor: 1,5-16 év) vontam be a vizsgálatokba (1. táblázat). Az IBD diagnózisának felállítása a Porto-kritériumok szerint történt (Porto 2005, deBie és mtsai 2011). Az MC-ben megjelenő tünetek a következők voltak: perianális fisztula, véres széklet vagy véres hasmenés, hasi fájdalom, fogyás és anémia. Az összes UC-s betegnél hematokézia (véres széklet) volt a vezető tünet, valamint hasi fájdalom és fogyás is jelentkezett. A kolonoszkópia során nyert biopsziás mintavétel a makroszkóposan gyulladt és nem-gyulladt vastagbél nyálkahártyából történt. Minden UC-s gyermek pánkolitiszben szenvedett, azaz a vastagbél legalább a rektumtól a flexura hepaticáig gyulladt volt (7. ábra).



**7. ábra: A Crohn-betegség (MC), (bal) és kolitisz ulcerosa (UC), (jobb) makroszkópos, kolonoszkópia során látható képe (Dr. Veres Gábor anyagából). MC-ben a gyulladás az egész bélfalra kiterjedő, ödémás, megvastagodott. Gyakoriak mély fekélyek és utcakő-szerű rajzolat. UC-ben a fekély felületes, könnyen „letörölhető”, de vérzékeny; a kolon redőzöttsége elsimult.**

A betegségek aktivitási indexének számítása a gyermekkori Crohn-betegség aktivitási index (PCDAI) és gyermekkori kolitisz ulceróza aktivitási index (PUCAI) alapján történt (Turner és mtsai 2010, Oliva-Hemker és mtsai 2002). A PCDAI értéke a hasi fájdalom, napi székletszám, általános állapot, laboreredmények, súly, hasi és perianális vizsgálat, extraintesztinális érintettség és növekedési sebesség pontrendszerén alapul (Turner és mtsai 2012). A PUCAI kiszámításához nem szükséges a laborértékek ismerete (Turner és mtsai 2009). A betegek átlag PCDAI értéke 37,5, az átlag PUCAI értéke 35 volt. Ez azt jelenti, hogy mindkét csoport a közepesen súlyos, illetve a súlyos csoportba tartozott (1. táblázat).

beteg	IBD formája (MC vagy UC)	nem (F:fiú, L: lány)	kor (év)	vezető tünet	aktivitási index PCDAI/PUCAI	időtartam (tünetek megjelenése óta)
1	MC	L	15	perianális fisztula	25	1 hónap
2	MC	F	4	véres széklet	20	3 hónap
3	MC	F	11	hasfájás, hasmenés	45	2 hónap
4	MC	L	9	véres hasmenés	25	2 hónap
5	MC	L	4	hasmenés, anémia	30	3 hónap
6	MC	F	14	véres széklet	50	6 hónap
7	MC	L	1.5	véres hasmenés	35	1,5 hónap
8	MC	F	11	véres hasmenés	20	2 hónap

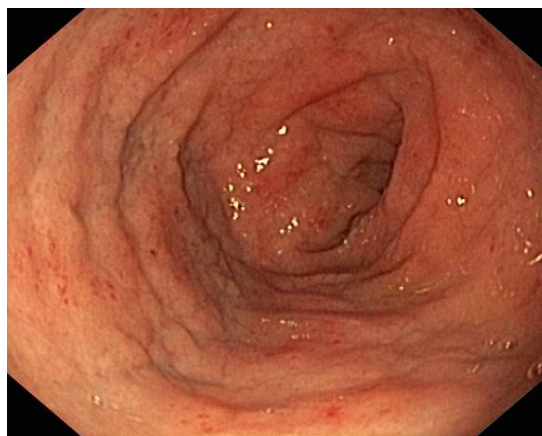
<b>9</b>	MC	F	12	hasmenés, anémia	35	3 hónap
<b>10</b>	MC	F	10	fogyás, hasmenés	52.5	1,5 hónap
<b>11</b>	UC	L	12	véres széklet, hasfájás	20	4 hónap
<b>12</b>	UC	L	9	véres széklet, anémia	35	1 hónap
<b>13</b>	UC	F	17	véres széklet, hasfájás	25	7 hónap
<b>14</b>	UC	L	12	véres széklet, fogyás	55	4 hónap
<b>15</b>	UC	F	6	véres széklet	40	2,5 hónap

**1. táblázat: Az újonnan diagnosztizált Crohn-beteg (MC) és kolitisz ulcerózás (UC) betegek klinikai jellemzői.** Az aktivitási indexet a PCDAI (gyermekkori Crohn-betegség aktivitási index) és PUCAI (gyermekkori kolitisz ulceróza aktivitási index) alapján lehet kiszámolni. F: fiú, L: lány.

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

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

Tíz újonnan diagnosztizált CD-s gyermek (2 fiú, 8 lány; median kor: 4 év, életkor: 2-12 év), 5 GFD-n tartott CD-s gyermek (2 fiú, 3 lány; median kor: 12 év, életkor: 6-13 év) és 10 kontroll gyermek (5 fiú, 5 lány; median kor: 9,5 év, életkor: 2-16 év) bevonása történt a vizsgálatba. A CD kórismézése az Európai Gyermek-gasztroenterológiai, -hepatológiai és -táplálási Társaság (ESPGHAN) kritériumrendszere alapján történt (Ribes-Koninckx és mtsai 2011). A CD szűrése IgA szöveti TG teszttel készült (Gorgun és mtsai 2009). Minden újonnan kórismézett CD-s gyermek TG szintje magas volt és a hisztológiai vizsgálat villusatrófiát mutatott (8. ábra).



**8. ábra:** Újonnan diagnosztizált cöliákiás gyermek duodenum nyálkahártyája felső endoszkópia során (Dr. Veres Gábor anyagából). A duodenum nyálkahártya makroszkópos képe atrófiát mutat a duodenum proximális részén.

A GFD-n tartott CD-s gyermekek teljes klinikai és szövettani remisszióba kerültek, melyet a szöveti TG normál tartományba kerülése is jelzett. Az első és második biopsziás mintavétel között eltelt idő átlagosan 1,5 év volt (0,5-2,5 év között) a GFD-s gyermekeknél. A gyermekek antropometriai paraméterei minden csoportban összevethetőnek bizonyultak (2. táblázat).

<b>beteg</b>	<b>újjonnan diagnosztizált cöliákia (CD)/  gluténmentes étrendet tartó CD (GFD)</b>	<b>nem</b>	<b>kor (év)</b>	<b>vezető tünet</b>	<b>IEL/100</b>	<b>Marsh klasszifikáció</b>
<b>1</b>	CD	L	3	súlyvesztés	80	3b
<b>2</b>	CD	L	3	súlyvesztés	72-85	3b-3c
<b>3</b>	CD	L	2	súlyvesztés , hasmenés	80-90	3c
<b>4</b>	CD	L	7	vashiány	50-60	3b-3c
<b>5</b>	CD	F	12	cöliákia szűrés	55-70	2
<b>6</b>	CD	L	5	cöliákia szűrés	40-50	2
<b>7</b>	CD	L	3	vashiány	85	3b
<b>8</b>	CD	L	10	növekedési elmaradás	65	3b
<b>9</b>	CD	F	2	vashiány	50	3c
<b>10</b>	CD	L	5	cöliákia szűrés	72-80	3b
<b>11</b>	GFD	L	12	krónikus hasi fájdalom	20-25	0
<b>12</b>	GFD	F	6	-	10-15	0
<b>13</b>	GFD	F	7	-	3-4	0
<b>14</b>	GFD	L	13	-	10	0
<b>15</b>	GFD	L	16	-	6	0



**2. táblázat: Az újonnan diagnosztizált cöliákiás (CD), gluténmentes étrendet tartó cöliákiás (GFD) gyermekek klinikai jellemzői;** F:fiú, L:lány. A duodenalis intraepiteliális limfociták határértéke a villus tetején, 100 enterocitára vonatkoztatva (IEL/100).

A kontrollcsoportba tartozó gyermekek kivizsgálása idült hasi fájdalom vagy krónikus hasmenés miatt történt a Semmelweis Egyetem I. sz. Gyermekklinikájának gasztroenterológiai osztályán. Az endoszkópiás vizsgálatot az esetleges organikus ok kizárására végeztük. Valamennyi esetben a szöveti TG szintek a normál tartományban voltak és szövettanilag semmilyen kóros elváltozást nem mutatott a vékonybél nyálkahártya a vizsgált gyermekekben.

A szükséges etikai engedéllyel és írásos szülői beleegyező nyilatkozattal mindegyik vizsgálat kapcsán rendelkezünk. A biopsziás mintavételre a Semmelweis Egyetem I.sz. Gyermekklinikáján diagnosztikus céllal történő endoszkópia kapcsán került sor, ami külön megterhelést a pácienseknek nem jelentett.

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

### II.1. RNS izolálás

A gyermekek vékony-, illetve vastagbél nyálkahártyájából származó biopsziás minták egy részét a feldolgozásig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltam. Az RNS-t a Qiagen protokollja alapján az RNeasy™ Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) segítségével izoláltam. A kinyert RNS mennyiségét és minőségét fotometrálassal határoztam meg. Ezt követően az RNS mintákat komplementer DNS-sé írtam át.

### II.2. Reverz transzkripció

A reverz transzkripció során  $1\ \mu\text{g}$  RNS-t konvertáltam komplementer DNS-sé (cDNS)  $20\ \mu\text{l}$  reakció-végtérfogatban,  $200$  egység (U) SuperScript II™ RNase H- reverz transzkriptáz,  $40$  U RNaseOUT™ inhibitor és  $0,5\ \mu\text{g}$  oligo-(dT)12-18 primer jelenlétében (Gibco/BRL, Eggenstein, Németország). A reakcióelegyet  $20^{\circ}\text{C}$ -on  $10$  percig, majd  $42^{\circ}\text{C}$ -on  $45$  percig és végül  $99^{\circ}\text{C}$ -on  $5$  percig inkubáltam, ezután  $4^{\circ}\text{C}$ -ra lehűtöttem és felhasználásig  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltam.

### II.3. Real-time PCR-fluoreszcens rezonancia energia transzfer GAPDH mérésére

A gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) mRNS expresszióját real-time PCR-rel határoztam meg, Brilliant II Fast SYBR Green QPCR Master Mix-et (Stratagene, Cedar Creek, TX, USA), primerenként 500 nmol/l-t (Invitrogen, CA, USA) és 1 µl cDNS-t tartalmazó reakcióelegyben, a Light Cycler 480-as rendszer (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) segítségével. A következő GAPDH primereket használtam: szensz primer: 5-CAC CAC CAT GGA GAA GGC TG-3', antiszensz primer: 5-GTG ATG GCA TGG ACT GTG-3', a termék hossza 240 bp-nyi volt. A kezdeti 2 perces, 95°C-n végzett denaturáció után, 50 ciklusig [95°C, 20 mp (denaturáció), 60°C, 40 mp (anelláció és extenzió)] szaporítottam fel a cDNS templátokat.

### II.4. A BrilliantII QPCR alapú real-time PCR iAP mRNS mérésére

Az iAP mRNS expressziót real-time PCR-rel határoztam meg Light Cycler480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) készüléken. A real-time PCR-t 20 µl végtérfogatú reakcióelegyben végeztem, amely 1 µl gyári primert (RealTime ready Catalog Assays, katalógusszám: 05532957001, Roche Diagnostics, Mannheim, Németország), 10 µl BrilliantII QPCR Master Mixet (Stratagene, Cedar Creek, TX, USA), 1 µl cDNS-t és 8 µl DNS-mentes vizet tartalmazott. A kezdeti 10 perces, 95°C-on végzett denaturáció után a cDNS templátokat 50 ciklusig [95°C, 20 mp (denaturáció) és 60°C, 1 perc (anelláció és extenzió)] keresztül szaporítottam fel. A PCR-eket pozitív és negatív kontrollok felhasználásával ellenőriztem.

### II.5. A real-time PCR mérések értékelése

A real-time PCR-ek eredményeit a Light cycler szoftver 480-as verziójával (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) értékeltem ki. Az iAP mRNS expresszióját ugyanabból a mintából vett GAPDH expressziójával vettem össze.

### III. Western blot

#### III.1. A minták előkészítése

A vizsgált biopsziás mintákat lizáló pufferben (10 mg/ml leupeptin, 10 mg/ml aprotinin, 1% Triton-X 100, 0,1 M Tris-HCl (pH=8), 1mM EGTA, 5 mM NaF, 1 mM PMSF, és 10 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) homogenizáltam (Fast Prep FP120, Qiogene Inc, Cedex, Franciaország), majd a homogenizátumot centrifugáltam (10000g, 10 perc, 4 °C). A felülúszó fehérje koncentrációját Dc Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) felhasználásával, spektrofotometriás módszerrel határoztam meg. A mintákat felhasználásig -80 °C-on tároltam.

#### III.2. SDS-PAGE

A mintákat, a treatment puffer (30% glicerol, 0,7 M SDS, 20% merkapto-etanol, 0,25 M Tris-HCl; pH=6,8) hozzáadása után 100 °C-on 3 percig denaturáltam.

A 10%-os PreCast gél (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) zsebeiben iAP mérése esetén 0,5 µg összfehérjének megfelelő mennyiségű fehérjét vittem fel. A minták mellé molekulasúlyt jelölő, kétszínű markert (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) tettem. Az elektroforézist hűtött rendszerben (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), 90 percen keresztül, 120 V-on, 40 mA-rel végeztem, futtató puffer felhasználásával (192 mM glicin, 25 mM Tris, 0,1% SDS).

#### III.3. Blottolás

A molekulaméret alapján szétválasztott fehérjéket a poliakrilamid gélről nitrocellulóz membránra (Hybond<sup>TM</sup> ECL<sup>TM</sup>, GE Healthcare, Little Chalfont, Egyesült Királyság) blottoltam. A blottolást hűtött rendszerben (MiniTank<sup>TM</sup> Electrobloetter, Owl, NH, USA), 2 órán keresztül, 70V-on, 220 mA-rel transzfer pufferben (25 mM Tris, 170 mM glicin, 20%-os metanol tartalmú puffer) végeztem. 1% Ponceau S (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) és 25% ecetsav (Reanal, Budapest, Magyarország) tartalmú festékkel ellenőriztem a blottolás sikerességét.

#### III.4. Immunoblotting

A nitrocellulóz membránokat szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül, folyamatos rázás mellett blokkoltam (5% sovány tejpor, 10% PBS puffer), a membránok és az antitest fehérjék között kialakuló nem specifikus kölcsönhatások gátlására. A blotmembránokat blokkolás után az iAP-ra specifikus ellenanyaggal (AbCam, Cambridge, Egyesült Királyság) 1 µg/ml koncentrációban, 1 órán keresztül szobahőmérsékleten, mosó oldatban (1% sovány tejpor, 0,1% Tween<sup>TM</sup>20 detergens, 10% PBS puffer) inkubáltam. A membránok mosását folyamatos rázás mellett végeztem, 3-szor 10 percre tejporos mosóoldattal (1% sovány tejpor, 0,1% Tween<sup>TM</sup>20 detergens, 10% PBS puffer). Előhívást követően a membránokat strippeltem (1,5% glicin, 0,1% SDS, 0,1% Tween<sup>TM</sup>20 detergens, 10% PBS puffer) így alkalmassá vált annak ellenőrzésére, hogy a poliakrilamid gélek zsebeibe egyforma mennyiség került-e az egyes mintákból. Ezért β-aktinra specifikus, elsődleges ellenanyaggal 1 µg/ml koncentrációban inkubáltam a membránokat (Santa Cruz, CA, USA), a leírt körülmények között. Mosások után, szekunder ellenanyagként tormaperoxidáz konjugált antitesteket használtam (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), melyekkel 30 percre óvatos rázással inkubáltam. Ezután további mosásokkal (3x20 perc) távolítottam el az ellenanyag felesleget a membránokról.

#### III.5. Az immunoreaktív helyek detektálása

Az immunoreaktív helyek kemilumineszcens szignálját ECL reagens (Amersham ECL<sup>TM</sup> Prime Western blot detektáló reagens, GE Healthcare) segítségével detektáltuk VersaDoc 5000MP képalkotó rendszer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) segítségével. Eredményeinket Quantity One szoftver segítségével (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) értékeltük.

#### **IV. Immunfluoreszcens festés**

A duodenumból, terminális ileumból és kolonból származó biopsziás mintákat közvetlenül mintavétel után folyékony nitrogénben fagyasztottam le, majd Shandon kriomátrixba (ThermoElectron Co., Waltham, USA) ágyaztam és 3-4 µm vastagságú

metszeteket készítettem. A metszeteket 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten TLR4-re specifikus poliklonális kecske ellenanyaggal és iAP-ra specifikus nyúl poliklonális ellenanyaggal (Abcam Plc, Cambridge, UK) inkubáltam. A másodlagos antitestek Alexa Fluor 488-jelölt csirkében termelt, kecskére specifikus (Invitrogen, Eugen, OR, USA) és Alexa Fluor 568 kecskében termelt, nyúlra specifikus (Invitrogen, Eugen, OR, USA) ellenanyagok voltak, melyekben szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltam a metszeteket. A magok kimutatására Hoechst 33258 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) festéket használtam 10 percen keresztül. A szövetek festődését Zeiss LSM 510 Meta konfokális lézer szkennig mikroszkóppal (Carl Zeiss, Jena, Németország) vizsgáltam.

## **V. Statisztika**

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

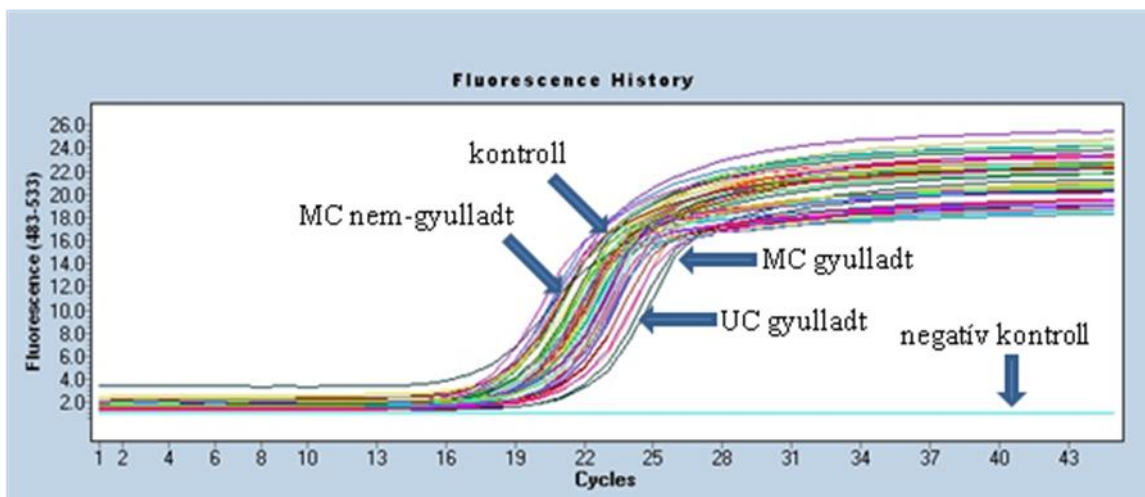
## EREDMÉNYEK

### I. Az iAP expressziójának vizsgálata gyulladásos bélbetegségben szenvedő (IBD-s) gyermekek kolon nyálkahártyájában

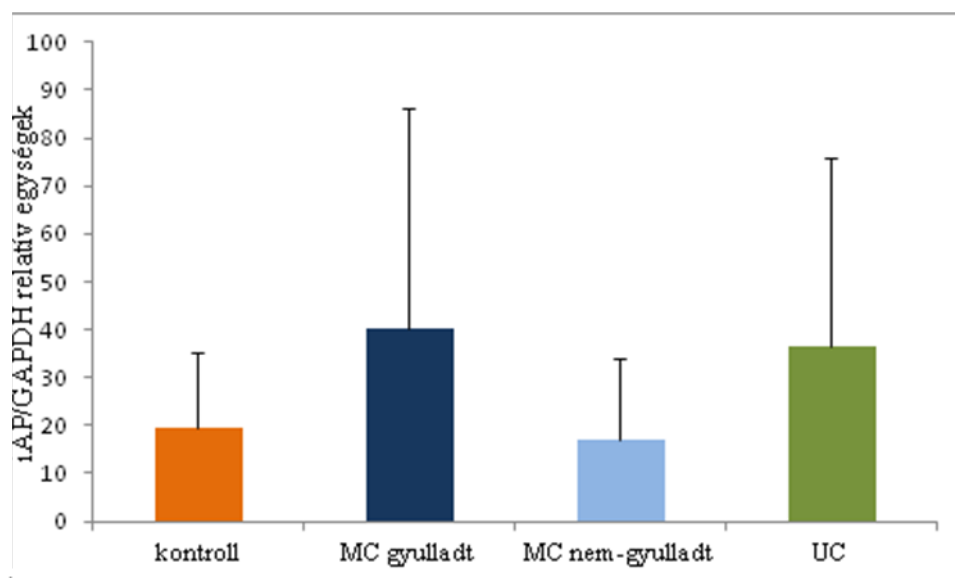
#### I.1. Az iAP mRNS expressziójának változásai gyulladásos bélbetegségben szenvedő (IBD-s) gyermekek vastagbél nyálkahártyájában

Az iAP mRNS expresszióját SYBR Green alapú real time RT-PCR segítségével határoztam meg az újonnan diagnosztizált MC-s gyermekek gyulladt és nem-gyulladt, UC-s gyermekek gyulladt kolon nyálkahártyájában, kontroll gyermekek vastagbélből származó biopsziás mintájával összehasonlítva.

Az iAP mRNS expressziója nem különbözött szignifikánsan az MC-s és UC-s gyermekek gyulladt kolon nyálkahártyájában az egészséges kontrollhoz, valamint az MC-s gyermekek nem-gyulladt vastagbél mintáihoz viszonyítva, de szignifikáns eltérés nem volt tapasztalható ( $p = ns$ ). A kontroll csoport és az MC-s gyermekek nem-gyulladt bélnyálkahártyájának expressziója között nem volt különbség (9., 10. ábra)



9. ábra: Az iAP mRNS expresszió BrilliantII QPCR alapú real-time RT-PCR-rel történő kimutatásának reprezentatív képe gyulladásos bélbetegségben szenvedő (IBD) gyermekek kolon nyálkahártyájában. A kontroll és Crohn-beteg (MC) gyermekek nem-gyulladt területeiről vett kolon biopsziás mintájából izolált cDNS minták átlagosan a 17.-19. ciklusok között, a MC-s gyermekek és kolitisz ulcerózás (UC) mintájából izolált cDNS-ek átlagosan a 36-40. ciklusok között léptek az amplifikáció exponenciális fázisába.

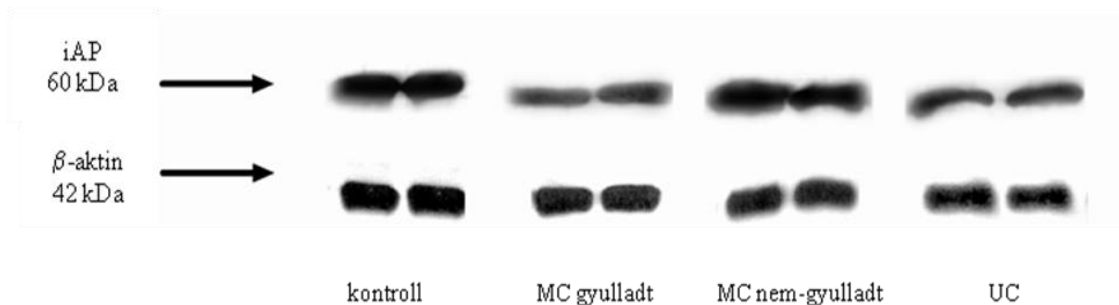


**10. ábra:** Az iAP mRNS expressziós változása kontrollok, Crohn-beteg (MC) gyermekek gyulladt és nem-gyulladt, valamint kolitisz ulcerózások (UC) kolon nyálkahártyájában (real time-PCR). Az iAP mRNS expresszió nem mutatott szignifikáns eltérést a vizsgált csoportokban ( $p=NS$ ).

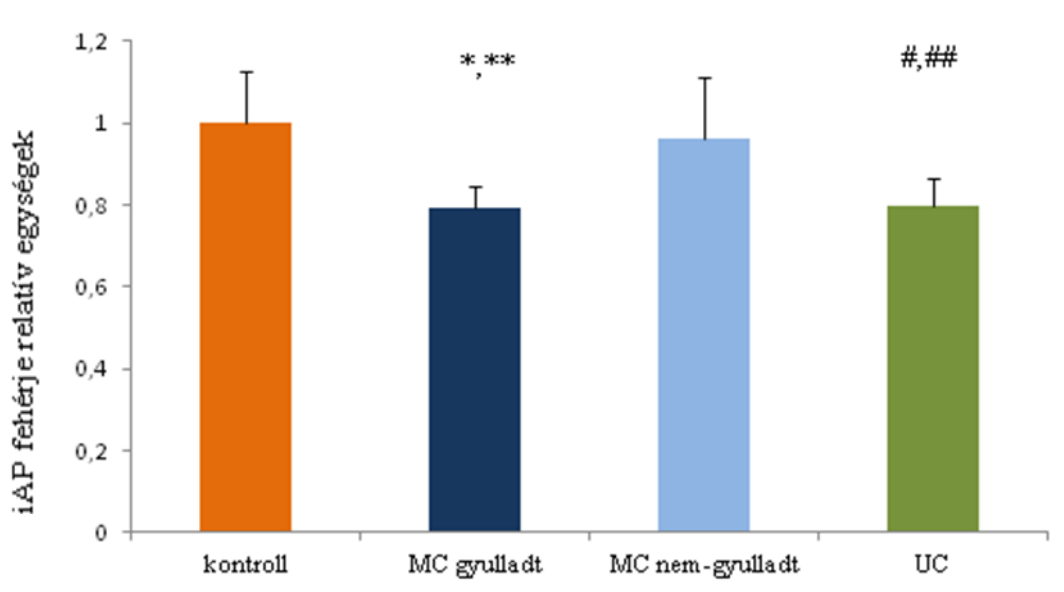
## I.2. Az iAP proteinszintek változásai gyulladással járó bélbetegségben szenvedő (IBD-s) gyermekek kolon nyálkahártyájában

Az újonnan diagnosztizált MC-s gyulladt és nem-gyulladt, UC-s gyulladt vastagbél szakaszából származó biopsziás mintáinak és kontroll gyermekek vastagbél biopsziás mintáinak Western blot analízise során 60 kDa-nál az iAP, 43 kDa-nál  $\beta$ -aktin jelet detektáltam (9. ábra).

Az iAP fehérjeszintek az MC-s gyermekek gyulladt vastagbéljében és az UC-s gyermekek gyulladt bélszakaszában szignifikáns csökkenést ( $*p<0,05$ ), ( $^{\#}p<0,01$ ) mutattak a kontrollhoz viszonyítva. Az MC-s és az UC-s gyermekek gyulladt bélnyálkahártyájában szignifikáns volt a csökkenés a MC-s gyermekek nem-gyulladt bélszakaszához képest ( $**p<0,05$ ), ( $^{\#\#}p<0,01$ ). Az iAP fehérjeszint nem különbözött szignifikánsan a MC-s gyermekek nem-gyulladt vastagbél nyálkahártyájában a kontrollokhoz képest ( $p = NS$ ) (11., 12. ábra).



**11. ábra:** Az iAP fehérjeszintek reprezentatív eredményei a kontrollok, Crohn-beteg (MC) gyulladt és nem-gyulladt, valamint kolitisz ulcerózási (UC) gyermekek gyulladt kolon nyálkahártyájában (Western blot). Az iAP fehérjeszintek az MC-s gyulladt és UC-s gyulladt nyálkahártyában lecsökkentek a kontroll szinthez viszonyítva. A MC-s nem-gyulladt területhez képest szintén csökkenés mutatkozott a MC-s gyulladt és UC-s gyulladt iAP fehérjeszintekben.

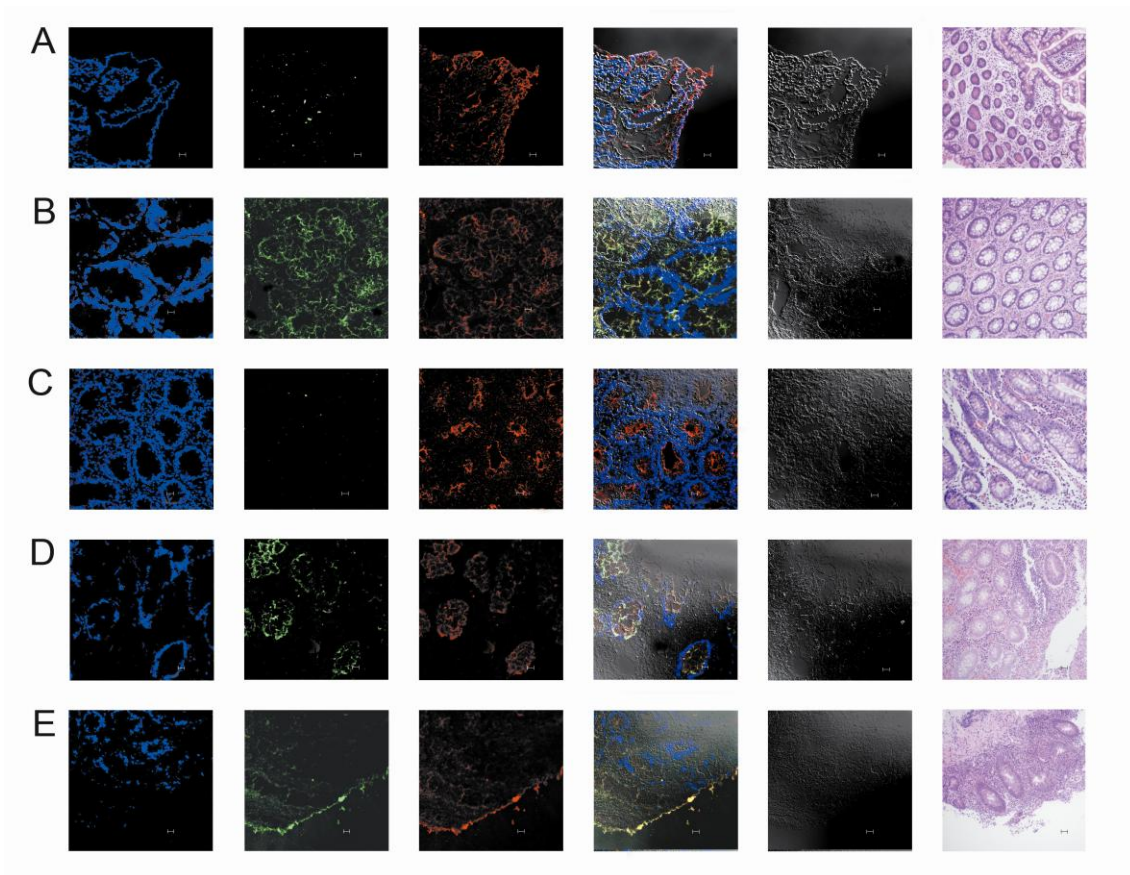


**12. ábra:** Az iAP fehérjeszintek változása a kontrollok, Crohn-beteg gyermekek (MC) gyulladt és nem-gyulladt, valamint kolitisz ulcerózási gyermekek gyulladt kolon nyálkahártyájában. Az MC-s és UC-s gyermekek gyulladt bélnyálkahártyájában az iAP fehérjeszinten szignifikáns csökkenést mutatott a kontrollcsoport képest (\* $p < 0,05$ ), ( $\#p < 0,01$ ). Szintén szignifikáns volt a csökkenés az MC-s gyulladt és UC-s gyulladt bélszakaszokban az MC-s nem-gyulladt területekhez képest (\*\* $p < 0,05$ ), ( $\#\#p < 0,01$ ). Az iAP fehérjeszint nem különbözött szignifikánsan az MC-s gyermekek nem-gyulladt vastagbél nyálkahártyájában a kontrollokhoz képest ( $p = \text{NS}$ ).



## **II. Az iAP és TLR4 lokalizációjának vizsgálata gyulladásos bélbetegségben szenvedő (IBD-s) gyermekek terminális ileumból és kolonból származó nyálkahártyájában**

Az iAP kizárólag a terminális ileum és kolon epiteliális felszínén mutatott erős festődést mindegyik vizsgált csoportban. Az iAP nem mutatott festődési különbséget a MC-s betegek gyulladt és nem-gyulladt kolon nyálkahártyája, az MC-s gyulladt terminális ileum és kolon nyálkahártya, valamint az MC-s és UC-s gyulladt kolon nyálkahártyák között. Nem detektáltam fluoreszcens jelet a Lieberkühn-kripták sejtjeiben, a kehelysejtekben és a lamina propria immunsejtjeiben. Az iAP és a TR4 együttes jelenléte pontszerű, erőteljes jelet adott; a vizsgált csoportokban festődési különbség nem volt. Kiemelendő, hogy a TLR4 mindhárom vizsgált csoport kolonból származó metszetein erősebb jelet adott, mint a kontroll és az MC-s terminális ileumban (13. ábra).



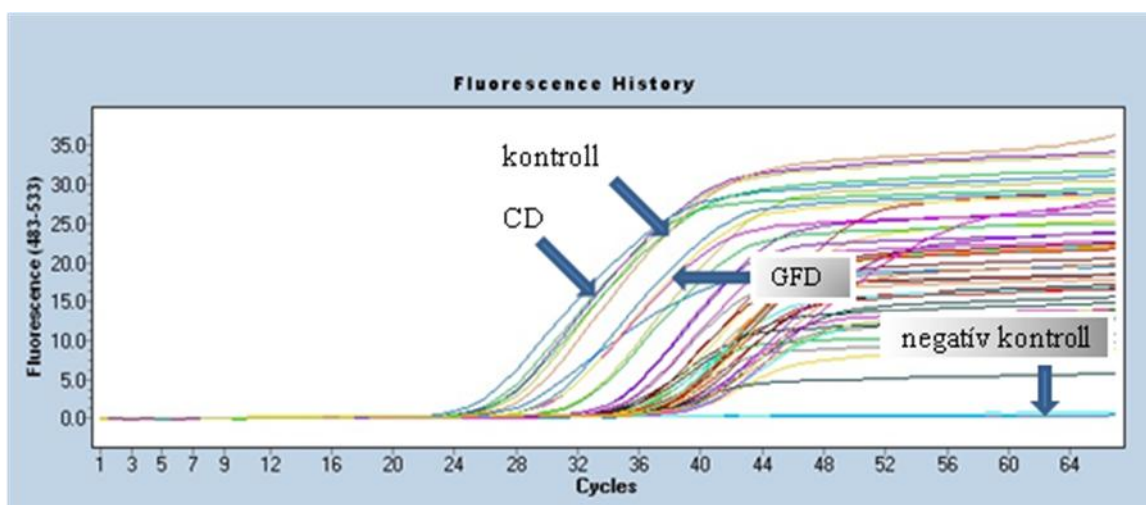
**13. ábra: Az iAP és TLR4 lokalizációja Crohn-beteg (MC), kolitisz ulcerózás (UC) és kontroll gyermekek terminális ileum - és kolon nyálkahártyájában.** Immunfluoreszcens (anti-iAP és anti TLR4 antitest felhasználásával) és hematoxin-eozin festéssel történt a terminális ileum és kolonból származó metszetek jelölése. Mindhárom vizsgált csoportban az iAP (piros) és TLR4 (zöld) kizárólag az epitélfelületre lokalizálódott: az egészséges kontrollok terminális ileumában (A), MC-s betegek terminális ileumában (B), kontrollok kolonjában (C), MC-s betegek gyulladt (D) és UC-s gyermekek gyulladt (E) kolon mukózájában. A sárga szín („merge”: együttes reakció, kolokalizáció) az iAP és TLR4 kolokalizációját (sárga és piros szín egymásra vetülését) mutatja, a kék szín a sejtmagot jelzi; 20x nagyítás.

### III. Az iAP expressziójának vizsgálata cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában

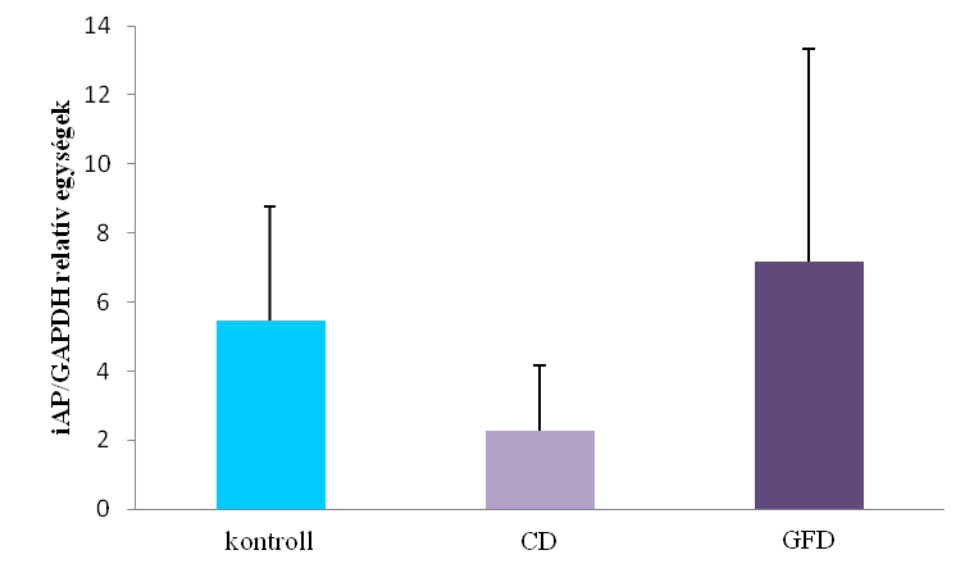
#### III.1. Az iAP mRNS expressziójának változásai cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában

Az iAP mRNS expressziót RT-PCR-rel határoztam meg az újonnan diagnosztizált CD-s, a már gluténmentes étrendet tartó CD-s és kontroll gyermekek duodenum nyálkahártyájában.

Az iAP mRNS expressziója lecsökkent az újonnan diagnosztizált CD-sekben a kontrollhoz képest, de a változás nem volt szignifikáns ( $p = ns$ ). A GFD-n tartott CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájának mRNS expressziója magasabb volt a kezeletlen CD-sekhez képest, de a kontrollhoz viszonyítva alacsonyabb ( $p = ns$ ). (14., 15. ábra).



14. ábra: Az iAP mRNS expresszió BrilliantII QPCR alapú real-time RT-PCR-rel történő kimutatásának reprezentatív képe cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában. A kontroll és újonnan diagnosztizált CD-s gyermekek duodenum biopsziás mintájából izolált cDNS-e átlagosan 24. és 32., a gluténmentes étrendet tartó gyermekek duodenum biopsziás mintájából izolált cDNS-e átlagosan 40. ciklusban lépett az amplifikáció exponenciális fázisába.

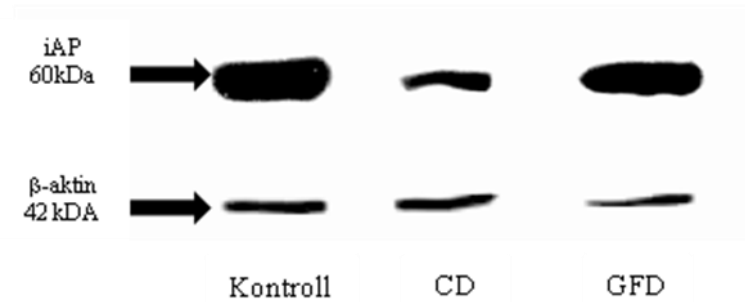


**15. ábra:** Az iAP mRNS expresszió változása kontrollok, újonnan diagnosztizált cöliákiás (CD), valamint gluténmentes diétát tartó cöliákiás (GFD) gyermekek duodenum nyálkahártyájában. Az iAP mRNS expressziója nem mutatott szignifikáns eltérést a vizsgált csoportokban ( $p=NS$ ).

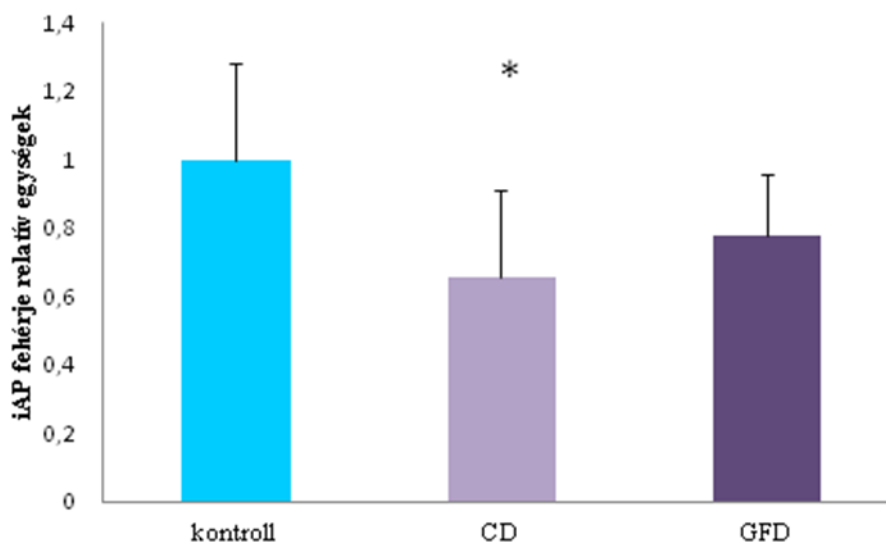
### III.2. Az iAP proteinszintek változásai cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában

Western blot technikával, iAP-ra specifikus primer ellenanyag felhasználásával vizsgáltuk az újonnan kórismézett CD-s, gluténmentes étrenden tartott CD-s, valamint kontroll gyermekek duodenum nyálkahártyáját. Az iAP-ot 60 kDa-nál, a  $\beta$ -aktin jelét 43 kDa-nál detektáltuk.

Az iAP fehérjemennyisége szignifikánsan csökkent a kontrollhoz viszonyítva ( $*p<0,05$ ). A GFD-s gyermekek iAP fehérjeszintje megnövekedett az újonnan diagnosztizált CD-sekhez képest, ugyanakkor a kontrollcsoport iAP fehérjeszintjénél alacsonyabb volt. Mindamellét a különbség GFD-s gyermekek esetében nem bizonyult szignifikánsnak ( $p = ns$ ), (16., 17. ábra).



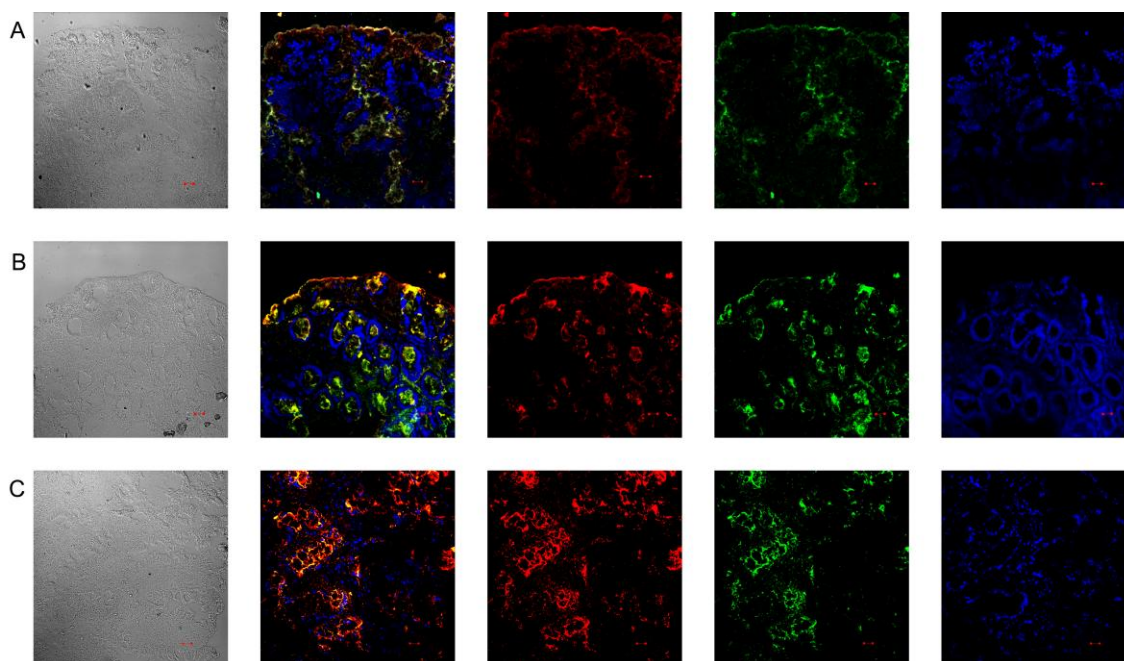
**16. ábra:** Az iAP fehérjeszintek reprezentatív eredményei a kontrollok, újonnan diagnosztizált cöliákias (CD) és gluténmentes étrendet tartó cöliákias (GFD) gyermekek duodenum nyálkahártyájában (Western blot). Az iAP fehérjeszint az újonnan diagnosztizált CD-s gyermekekben csökkent a kontrollokéhoz és a GFD-t tartó cöliákiasokhoz képest.



**17. ábra:** Az iAP fehérjeszintek változása a kontrollok, újonnan diagnosztizált cöliákias gyermekek (CD) és gluténmentes étrendet tartó cöliákias gyermekek duodenum nyálkahártyájában. A CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájában az iAP fehérjeszint szignifikánsan csökkent a kontrollcsoportéhoz képest (\* $p < 0,05$ ). A CD verus GFD, a GFD verus kontroll csoportok között nem volt szignifikáns az iAP fehérjeszint csökkenés ( $p = NS$ ).

#### IV. Az iAP és TLR4 lokalizációjának vizsgálata cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában

Immunfluoreszcens festést végeztünk az iAP és TLR4 együttes lokalizációjának megállapítására CD-s, gluténmentes étrendet tartó CD-s, valamint kontroll gyermekek duodenum nyálkahártyájában. A TLR4 és iAP molekulák között egyértelmű kolokalizációt találtunk. Az iAP és TLR4 kolokalizációja mindhárom vizsgált csoportban erőteljes és pontszerű volt. Az iAP eloszlása kizárólag a duodenum nyálkahártya epiteliális felszínére lokalizálódott, de immunfluoreszcens jelet nem detektáltunk a kehelysejteken, lamina propria immunsejtjein és a Lieberkühn kripták sejtjein. (18. ábra).



**18. ábra.** Az iAP és TLR4 lokalizációja egészséges kontroll, újonnan diagnosztizált cöliákiás (CD) és gluténmentes étrendet tartó cöliákiás (GFD) gyermekek duodenum nyálkahártyájában. Az immunfluoreszcens jelölés anti-iAP és anti-TLR4 antitestek felhasználásával történt, az egészséges kontrollok (A), CD-s (B) és GFD-s (C) gyermekek duodenum biopsziás mintáinak metszetein. A vizsgált csoportokban az iAP (piros) és TLR4 (zöld) jelölés kizárólag az epitélfelszínre lokalizálódik. Az iAP és TLR4 kolokalizációját (sárga és piros szín egymásra vetülését) mutatja, a kék szín a sejtmagot jelzi; 20-szoros nagyítás.

## EREDMÉNYEK MEGBESZELÉSE, KÖVETKEZTETÉS

Az intesztinális flóra összetételének megváltozása, illetve a bélepitélium anatómiai lokalizációja meghatározó eleme a mukózális gyulladás és szöveti destrukció kialakulásának.

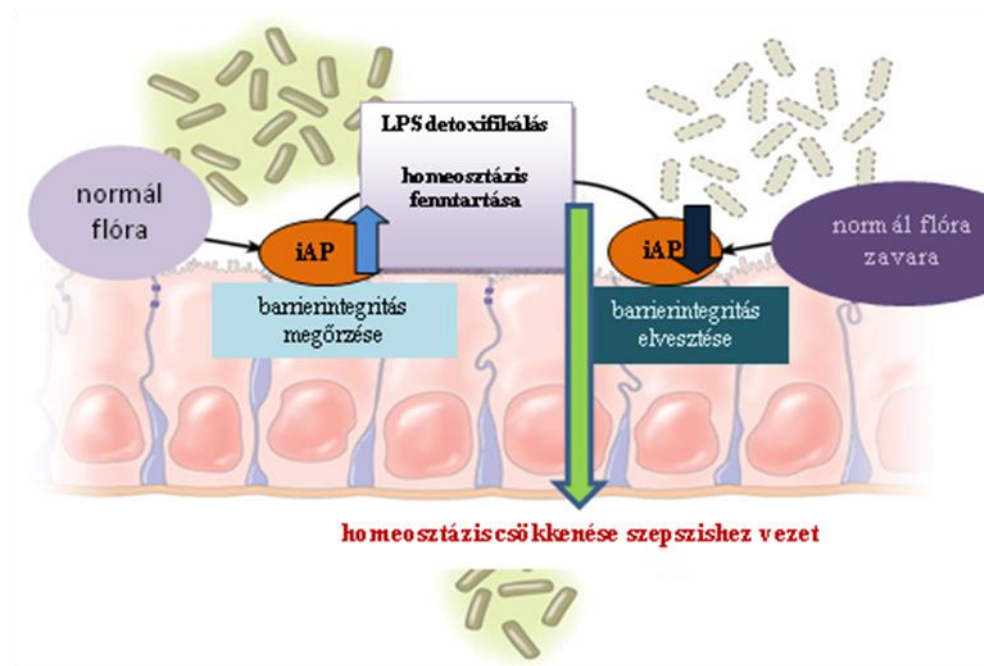
A veleszületett immunitás elemei felismerik a jelenlévő baktériumokat, elősegítik a mukózális barrier képzését, valamint az antibakteriális védelmi válasz kialakulását. A helytelen immunválasz, valamint a mukózális barrier sérülése hozzájárul az IBD és a CD kialakulásához. Az IBD és CD patomechanizmusa, lokalizációja teljesen eltérő, de mindkettő kialakulásában alapvető fontosságú a mukózális homeosztázis felborulása és a nyálkahártya sérülése (Decker és mtsai 2010, Logan és mtsai 2010).

A bélmukóza kóros immunválasza, beleértve a veleszületett immunrendszer válaszait is, alapvető szerepet játszik az IBD és a CD pathomechanizmusában. IBD-ben zavart szenved a gazdaszervezet és az intesztinális mikroflóra közötti egyensúly ez által a kommenzális mikroflóra és az immunválaszok szabályozása sérül (Ashida és mtsai 2011). CD-ben a búza, árpa, rozs fogyasztása genetikailag fogékony egyéneknél bélnyálkahártya károsodáshoz vezet. Előzetesen munkacsoportunk kimutatta, hogy a TLR4 expressziója fokozódik újonnan diagnosztizált IBD-s gyermekek gyulladt kolon és újonnan diagnosztizált CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájában a kontrollhoz képest (Szebeni és mtsai 2007).

Az LPS aktiválta TLR4 kapcsán figyelmet kapott egy új enzim, az intesztinális alkalikus foszfátáz, amely a mukózális védelemben fontos tényező. Ugyanis az iAP defoszforilálja az LPS-t, ezáltal egy inaktív, nem toxikus formát hozva létre. Ez a defoszforilálás lehetetlenné teszi az LPS és a TLR4 közötti interakció kialakulását és így a veleszületett immunválaszok aktiválódását (Malo és mtsai 2010).

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





**19. ábra: Az intesztinális alkalikus foszfatáz (iAP) szerepe a bélhomeosztázis és a mukózális barriertartásban.** Az iAP detoxifikálja a lipopoliszacharidot (LPS) a bélhomeosztázisának fenntartása, az epiteliális barrierfunkció megőrzése és gyulladás kialakulásának megelőzése céljából. A kommenzális baktériumok által alkotott bélflóra képes stimulálni és fenntartani az iAP magas expresszióját. Éhezés, valamint a bakteriális flóra inváziója csökkent iAP expressziót eredményez. Ez a folyamat az iAP LPS-t detoxifikáló képességének csökkenéséhez és a barrierfunkció romlásához vezet, amely következményes gyulladással járhat a bélben (Geddes és mtsai 2008).

## I. Az iAP expressziójának változása gyulladásos bélbetegségben szenvedő (IBD-s) gyermekek kolon nyálkahártyájában

Eddig mindössze egyetlen humán tanulmány jelent meg, amely felnőtt IBD-s betegekben vizsgálta az iAP szerepét. Ebben a vizsgálatban bár nem mérték az iAP-fehérje mennyiségét, a kolonban csökkent LPS-defoszforiláló aktivitást találtak, amelyet az iAP aktivitás csökkenésével is magyaráztak (Tuin és mtsai 2009).

Tanulmányomban elsőként vizsgáltam a terápiát nem kapó, kezeletlen IBD-s gyermekekben az iAP enzimet.

Vizsgálatomban az iAP mRNS expresszió csökkenése nem mutatott szignifikáns különbséget az MC-s és UC-s gyermekek gyulladt kolon nyálkahártyájában a nem-



gyulladt MC és kontrollok mintáihoz képest. Az iAP mRNS szintekre vonatkozó irodalom ellentmondásos: az iAP mRNS expressziója a gyulladt MC-s és UC-s területeken emelkedett a nem-gyulladt MC-s és kontroll mintákhoz képest, amely a mukozális sejtek magasabb iAP termelésére utalhat (Tuin és mtsai 2009). Kutatási eredményeim részben átfedést mutatnak López-Posadas és munkatársai eredményeivel, akik kimutatták, hogy a gyulladt szövetek által termelt reaktív oxigén gyökök az intesztinális epitelsejtek megnövekedett iAP aktivitását okozzák (López-Posadas és mtsai 2010).

Ugyanakkor Tuin és mtsai kimutatták, hogy az iAP mRNS expresszió csökken MC-s betegek bélnyálkahártyájában a kontrollokhoz képest. Bár megjegyzendő, hogy ebben a tanulmányban a betegek több mint fele immunszuppresszív szereket (influximab, metotrexát, kortikoszteroidok és thiopurin) kaptak a mintagyűjtés idején, amelyek nagymértékben befolyásolhatják az iAP mRNS szintézist. Egészséges felnőttekben az iAP mRNS expressziót magasabbnak találták az ileumban, mint a kolonban, de az iAP mRNS expresszió és LPS-defoszforiláló aktivitás szignifikánsan csökkent IBD-s felnőttek gyulladt bélszakaszán, a nem-gyulladt IBD-s és kontroll mintákhoz képest. Ebben a vizsgálatban nem határozták meg az iAP fehérjemennyiségét, valamint a kezeletlen és kezelt csoportokat egy betegcsoportként kezelték (Tuin és mtsai 2009). Terápiánív gyermekek kolon nyálkahártyáját vizsgálva csökkent iAP fehérjeszintet találtam, ezért az eddigieket összetéve azt gondolom, hogy a gyulladt nyálkahártya csökkent iAP szintje összefüggésben lehet a csökkent LPS detoxifikációval és következményesen a megnövekedett TLR4 aktivációval.

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

Több állatmodellben kimutatták az iAP bélgyulladásra gyakorolt jótékony hatását. iAP knock-out (KO) és vad-típusú (WT) egerekben vizsgálták az intraperitoneális adott LPS hatásait. Az iAP KO egerekben megnövekedett a bakterális transzlokáció, valamint a TNF- $\alpha$  szekréció a WT állatokhoz képest (Chen és mtsai 2011). A legismertebb bélgyulladásos állatmodellben a DSS indukálta a kolitiszben, mind makroszkóposan, mind mikroszkóposan a humán vastagbélgyulladásnak megfeleltethető elváltozásokat tapasztalunk (Clapper és mtsai 2007). Ramasamay és munkatársai WT és iAP KO egerekben DSS indukálta bélgyulladást generált. A DSS itatása 4 cikluson keresztül tartott, minden ciklus között iAP tablettát kaptak az egerek. Az iAP KO állatokban a bélgyulladás súlyosabbnak bizonyult, valamint az orálisan adott iAP tablettát mindkét vizsgált csoportban szövettani vizsgálatok alapján csökkentette a kolitisz tüneteit (Ramasamy és mtsai 2011). Egy másik, WT egerek DSS indukálta kolitiszében az iAP tablettát szintén csökkentette a bélgyulladás súlyosabb formáját (Bol-Schoenmakers és mtsai 2010). Tuin és mtsai DSS-indukált kolitiszes patkányokban vizsgálta az iAP-tablettát IBD-ben betöltött jótékony hatását. A székletben mért iAP enzimaktivitás megemelkedett az iAP tablettát hatására, a bélgyulladás makroszkópos tünetei csökkentek, valamint hisztológiai vizsgálatokkal kimutatták, hogy a bélepitélium kevésbé volt sérült a placebo csoporthoz képest (Tuin és mtsai 2009).

Az állatkísérletek alátámasztották az iAP tablettát kolitiszre gyakorolt jótékony hatását, amit egy humán tanulmány is igazolni látszik. Ebben a cseh tanulmányba 21 immunszuppressziós- és szteroidkezelésre rezisztens beteget (férfi/nő=8/13, 23-54 év) vontak be, UC aktivitási indexük 6-10 közé esett. A betegek 30.000 egység iAP-enzimet kaptak intraduodenálisan. A kezelés utáni 21. napra az aktivitási index, a C-reaktív protein és a széklet kalprotektin szintjei szignifikánsan csökkent. A fentiek alapján az iAP adása javasolt lehetne az UC adjuváns terápiájaként, de fontos megjegyezni, hogy ebben a vizsgálatban hiányzott a placebo kontrollcsoport (Lukas és mtsai 2010).

Vizsgálatainknak terápiás konzekvenciája is lehet, hiszen az hosszútávú IBD kezelése nem megoldott. Az IBD jelenlegi kezelése alapvetően konvencionális terápiából áll, de súlyos terápiarezisztens esetekben erőteljesebb, biológiai szerekre van szükség (Nahidi és mtsai 2012, Jakobsen és mtsai 2011). A mikroflóra egyensúlyának visszaállítására tett terápiás kísérletek erősen hozzájárulhatnak IBD-ben a nyálkahártya gyorsabb

gyógyulásához (Andoh és mtsai 2006).

## **II. Az iAP és TLR4 lokalizációja gyulladós bélbetegségben szenvedő (IBD-s) gyermekek kolon nyálkahártyájában**

Előzetesen munkacsoportunk az IBD-s gyermekek gyulladt kolon nyálkahártyájában emelkedett TLR4 mRNS-expresszióját és proteinszintet mutatott ki (Szebeni és mtsai 2007). A TLR4 és az iAP lokalizációjának vizsgálatára immunfluoreszcens festést végeztem. Az iAP eloszlása mind a terminális ileumban, mind a kolonban az epiteliális felszínre lokalizálódott és a TLR4-gyel való kolokalizációja egyértelmű volt. A TLR4 és iAP komplexképzése megerősítheti a mukózális integritásban betöltött szerepüket. Az iAP csökkent szintje, valamint a magasabb TLR4 expresszió az iAP/TLR4 egyensúly eltolódását okozhatja, így a mukóza kevésbé lesz ellenálló a baktériális LPS-sel szemben, amely a bélhámsejt integritásának csökkenéséhez és a bélgyulladás fenntartásához is vezethet (Szebeni és mtsai 2007, Sodhi és mtsai 2011), (19. ábra).

Az iAP aktivitásának vizsgálata alkalmas hisztológiai módszer lehet az MC és UC elkülönítésére is. Immunhisztokémiai módszerekkel, paraffinos bélbiopsziából származó metszeteken, az iAP az EC-k apikális felszínén expresszálódott. Az iAP aktivitása szignifikánsan nagyobb volt a MC-s betegek bélnyálkahártyájában az UC-s betegek gyulladt nyálkahártyájához viszonyítva (Torres és mtsai 2007). A székletben megjelenő markereket gyakran vizsgálják a betegség aktivitásának, relapszus vagy remisszió, és a terápia hatékonyságának követésére. Az iAP aktivitás szignifikánsan alacsonyabb az aktív UC-s betegek székletében a kontrollesoporthoz képest, ugyanez a paraméter MC-s és inaktív UC-sek esetében magasabb volt, de a kontrollokhöz képest jelentős csökkenést mutatott (Lehmann és mtsai 1980).

## **III. Az iAP expressziójának változása cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában**

CD-ben a glutén és a hozzá kapcsolódó proteinek genetikailag fogékony egyéneknél

krónikus bélgyulladásához és következményesen a mukózális barrierintegritás megromlásához vezetnek (Husby és mtsai 2012). A CD patogenezisében mind az adaptív, mind a veleszületett immunrendszer szerepet játszik. A TLR mintázatfelismerő receptorcsalád összekötő hidat képez a veleszületett és adaptív immunválaszok között. Előzetesen munkacsoportunk CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájában fokozott TLR4 mRNS expressziót és proteinszintet mutatott ki. Újonnan diagnosztizált CD-s gyermekek perifériás vérében a TLR4 pozitív sejtek előfordulási gyakorisága hasonló volt (Szebeni és mtsai 2007, Cseh és mtsai 2011). Ezek az adatok alátámasztják, hogy a veleszületett immunitás, kiemelten a TLR4 alapvetően hozzájárulhat a CD patogeneziséhez. Az iAP LPS-t detoxifikáló aktivitása révén jelentős szerepet játszhat a TLR4-LPS komplex kialakulásának megakadályozásában, ezáltal a barrierintegritás fenntartásában.

Tudomásom szerint az iAP mRNS és fehérjeexpresszióját elsőként vizsgáltam újonnan diagnosztizált és gluténmentes diétát tartó cöliakiás gyermekek duodenumból származó biopsziás mintáiban. Az iAP mRNS expressziójában nem volt szignifikáns különbség az újonnan diagnosztizált, valamint gluténmentes étrendet tartó CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájában, a kontrollhoz viszonyítva. A GFD-n tartott gyermekek iAP mRNS expressziója enyhén emelkedő tendenciát mutatott a kontrollhoz képest, melynek magyarázata lehet a vékonybél-nyálkahártya még nem teljes regenerációja. Wahab és munkatársai kimutatták, hogy a vékonybél makroszkópos és mikroszkópos regenerációja a CD-s betegek mindössze 65%-ban következik be 2 éves gluténmentes étrendet követően (Wahab és mtsai 2002).

Az iAP fehérjeszintek szignifikánsan csökkentek az újonnan diagnosztizált, kezeletlen CD-s betegekben a kontrollcsoportéhoz képest. Az iAP fehérje csökkenése összefüggésben lehet az iAP enzimaktivitás csökkenésével. Prasad és munkatársai kimutatták, hogy az iAP és egyéb kefeszegélyhez-kötött enzimek aktivitásának csökkenése korrelált CD-s gyermekek hisztológiai léziójának súlyosságával (Prasad és mtsai 2008). Az egyik magyarázat lehet, hogy az iAP termelése függ az enterociták számától és az iAP enzim a bélhámsejtregeneráció indikátora is lehet (Prabhu és mtsai 2003). Eredményeim alapján feltételezhető, hogy nem csak az iAP enzimaktivitás, hanem az iAP proteinszint is összefüggésben lehet a CD bélnyálkahártyát érintő

súlyosságával. Előzetesen Bramble és munkatársai felnőtt, 6 hónapos gluténmentes diétát tartó CD-s betegek duodenum biopsziás mintáit vizsgálták intraduodenálisan bejuttatott glutén III frakció adása előtt és után, kontrollokhoz viszonyítva. A kontrollcsoportban az iAP enzimaktivitás a normál tartományban maradt (431-1406  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) és nem volt szignifikáns különbség az iAP enzimaktivitásában a glutén III frakció beadását követően. A GFD-n tartott CD-s csoportban az iAP enzimaktivitás az alapértékre csökkent a fél év alatt, de szignifikáns aktivitáscsökkenést tapasztaltak a glutén III frakció adása után 3-4 órával (Bramble és mtsai 1985). Ezek a felismerések is összefüggésben lehetnek eredményeimmel, miszerint a gluténmentes étrend hatására az iAP enzimaktivitása és protein szintje normalizálódik. A csökkent iAP proteinszint alapvető komponense és akár markere is lehet a CD súlyosságának és a gluténmentes diéta hatékonyságának.

#### **IV. Az iAP és TLR4 lokalizációja cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában**

Előzetesen munkacsoportunk kimutatta, hogy a TLR4 mRNS expresszió és proteinszintek növekedtek újonnan diagnosztizált CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájában (Szebeni és mtsai 2007). Emellett kimutattam CD-s és kontroll gyermekek duodenum nyálkahártyájában az iAP és TLR kolokalizációját. Az iAP kizárólag a duodenális epitel felszínére lokalizálódott az újonnan diagnosztizált, a gluténmentes étrendet tartó CD-s, valamint a kontroll csoportban és a TLR4-gyel való kolokalizációja egyértelműnek bizonyult. Az iAP és TLR4 együttes lokalizációja felveti funkcionális kapcsolatukat is. Feltételezhető, hogy az iAP proteinszintek csökkenése és TLR4 proteinszintek emelkedése együttesen hozzájárulnak az intesztinális barrierintegritás felbomlásához CD-ben.

Számos tanulmány jelent meg CD-ben a gluténmentes étrend kiváltására egy alternatív, adjuváns terápiás lehetőséggel. CD-s betegekben a gluténmentes étrend bevezetése és fenntartása rontja az életminőséget, valamint a normális étrendnél jóval költségesebb, ezért egy alacsony kockázatú, gazdaságosabb és hatékony gyógymód elérése a cél (Lionetti és mtsai 2011, Donnelly és mtsai 2011). Ezeket az újfajta terápiás

próbálkozásokat 3 részre lehet osztani: intraluminárisan, epiteliálisan és szubepiteliálisan hatók. Vannak törekvések a toxikus peptidek eliminálására a búzafehérjék módosításával, szöveti TG gátlására, toxikus peptidek bél nyálkahártyán keresztüli passzázsának megakadályozására. Az immunválaszokat célzó terápiás lehetőségek az IL-15 antagonisták vagy „veleszületett” inhibitoros glutén peptidek, amelyeket a gliadin 31-43 peptidek indukálnak és az epiteliális sejteket megőrzik az apoptózistól (Exposito és mtsai 2003, Rashtak és mtsai 2012). Az iAP monoterápiás alkalmazása feltehetően nem lenne elegendő a gluténmentes étrend kiváltására, de más újabb CD-ben alkalmazható terápiával kombinálva esetleg hozzájárulhat a mielőbbi mukózális regenerációhoz. Az iAP képes a mukózális barrierintegritás visszaállítására az LPS detoxifikáló aktivitása révén, megelőzve ezzel a TLR4 megnövekedett és kontrollálatlan aktiválódását.

A CD állatmodelljének létrehozása sokkal nehezebb, mint a kolitisz kémiai úton történő indukálása (Marietta és mtsai 2011). A CD legelfogadottabb állatmodelljében a gluténszenzitivitást BALB/c egerekben gluténmentes étrend bevezetése után 30 napos glutén terhelés követi. A glutén terhelést követően az egerek vékonybelében villustrófia, kriptahiperplázia és T-sejt, valamint makrofág infiltráció alakult ki (Papista és mtsai 2012). Egyetlen tanulmány jelent meg, amely gluténszenzitizált egerek különböző vékonybélszakaszaiból izoláltak kefeszegélyhez kötött enzimeket, de az iAP vizsgálata hiányzott (Kozáková H és mtsai 1998). Az iAP CD mukózális lézióban játszott szerepét, valamint az iAP terápiás hatását állatmodellben nem vizsgálták. Azonban az eddigi irodalmi adatok és saját –IBD-ben és CD-s betegekben végzett- vizsgálati eredményeink alapján feltételezzük, hogy az iAP kiemelt szereppel bír a barrierintegritás megőrzésében és visszaállításában vékonybélben is, mivel a duodenumban van az iAP legnagyobb koncentrációban jelen (Goldberg és mtsai 2008).

Eredményeimet összegezve elmondható, hogy az iAP fehérjeszintje csökkent az MC-s és UC-s gyermekek gyulladt kolon nyálkahártyájában a nem-gyulladt MC és kontrollok mintáihoz képest. Az iAP fehérjeszint csökkent az újonnan diagnosztizált CD-s gyermekek duodenum biopsziás mintáiban a kontrollcsoportéhoz és a gluténmentes étrendet tartó coliticiás gyermekekéhez képest. Az iAP mRNS expresszió nem változott szignifikánsan sem

az IBD-s, sem a CD-s vizsgált csoportokban. Az iAP-TLR4 komplexképzése a duodenum, terminális ileum, valamint kolon epitéliumban is kimutatható volt.

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

## EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Értekezésem legfontosabb megállapításait az alábbi pontokban foglalom össze:

### **1. Az iAP expressziójának vizsgálata krónikus gyulladós bélbetegségben szenvedő (IBD-s) gyermekek kolon nyálkahártyájában**

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

### **2. Az iAP és TLR4 lokalizációjának vizsgálata krónikus gyulladós bélbetegségben szenvedő (IBD-s) gyermekek terminális ileum és kolon nyálkahártyájában**

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

### **3. Az iAP expressziójának vizsgálata cöliákiában szenvedő gyermekek duodenum nyálkahártyájában**

(3) Elsőként mutattam ki az iAP proteinszintek csökkenését újonnan diagnosztizált CD-s gyermekekben, gluténmentes diétát tartó CD-s gyermekek és kontrollcsoporthoz képest. Az iAP mRNS expressziója nem mutatott szignifikáns eltérést a vizsgált csoportokban. Előzetesen az iAP enzimaktivitását vizsgálták CD-s gyermekek



duodenum nyálkahártyájában és az iAP enzimaktivitás csökkenése összefüggést mutatott a szövettani lézió súlyosságával. Ez a megfigyelés és eredményeink arra utalnak, hogy a csökkent iAP fehérjeszinteknek szerepe lehet a CD patomechanizmusában.

#### **4. Az iAP és TLR4 lokalizációjának vizsgálata cöliákiában szenvedő gyermekek duodenum nyálkahártyájában**

(4) Kimutattam az iAP és a TLR4 kolokalizációját a duodenum enterocitáinak felszínén és a 3 vizsgált csoport festődési különbséget nem mutatott. Munkacsoportunk előzetesen vizsgálta a veleszületett immunrendszer részéről a TLR4 expresszió változásait CD-s gyermekekben, a TLR4 pozitív sejtek prevalenciája perifériás vérben újonnan diagnosztizált CD-s gyermekekben megemelkedett és gluténmentes étrendet tartva is emelkedett maradt a kontrollokhöz viszonyítva. A duodenum biopsziás mintákban szintén emelkedett volt a TLR4 szint az újonnan diagnosztizált és gluténmentes diétát tartó CD-s csoportban. Az iAP jelenléte hozzájárulhat az LPS detoxifikálásához, ezáltal megakadályozva a TLR4-LPS komplex kialakulását.

## ÖSSZEFOGLALÓ

**Bevezetés:** A nagyobb gyermek-gastroenterológiai kórképek közül a gyulladásos bélbetegséget (IBD) és a cöliákiát (CD) vizsgáltam. A két betegség pontos patomechanizmusa ismeretlen, de a bél mukózális barrierének károsodása fontos szerepet játszik kialakulásukban. Az intesztinális alkalikus foszfát (iAP) alapvető a bél barrierintegritásának megőrzésében. Az iAP megköti a lipopoliszaharidot (LPS), a Toll-like receptor 4 (TLR4) ligandját és semlegesíti annak aktivitását.

**Célkitűzés:** Célom volt az iAP expressziójának vizsgálata IBD-s gyermekek kolon, valamint cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában, illetve az iAP és a TLR4 lokalizációjának meghatározása molekuláris biológiai módszerekkel.

**Eredmények:** Az iAP fehérjeszintek lecsökkentek az újonnan diagnosztizált kolitisz ulcerosás (UC) és Crohn-beteg (MC) gyermekek gyulladt kolon nyálkahártyájában a kontrollhoz és a MC-s nem-gyulladt területekhez viszonyítva ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,05$ ). Az iAP mRNS expresszió nem változott szignifikánsan a vizsgált csoportokban. Az immunfluoreszcens festés mindhárom csoportban igazolta az iAP és a TLR4 epiteliális kompartmenten belüli kolokalizációját. Újonnan diagnosztizált cöliákiás (CD-s) gyermekek duodenum biopsziás mintáiban az iAP fehérjeszint csökkent a kontrollcsoportéhoz és a gluténmentes étrendet tartó cöliákiás gyermekekéhez képest. Az iAP mRNS expresszió nem mutatott szignifikáns változást a betegcsoportokban. Az iAP és TLR4 kolokalizációja mindhárom csoportban egyformán igazolható volt.

**Következtetések:** A csökkent iAP szint alacsonyabb LPS-detoxifikáló hatással bírhat, amely felelőssé tehető a megemelkedett bélpermeabilitás és a következményes bakteriális passzázs kialakulásáért. Az iAP és a TLR4 együttes jelenléte mind a vékony, mind a vastagbél nyálkahártyájában felveti a mukózális barrierintegritás fenntartásában és a veleszületett immunválaszok iniciálásában betöltött szerepét a két vizsgált gyermek-gastroenterológiai kórképben. Vizsgálataim azt mutatják, hogy az érintett bélterületeken csökken az iAP fehérjeszintje, valamint irodalmi adatok alapján az iAP tabletta hatásos volt dextrán-szódium szulfát indukálta kolitiszes egerekben és felnőtt

UC-s betegekben, ezáltal az exogén iAP enzim kiegészítő terápia lehet aktív IBD-s és újonnan diagnosztizált CD-s betegek számára, amennyiben kontrollált vizsgálatok megerősítik ezt a feltételezést.

## SUMMARY

**Introduction:** I investigated two major pediatric gastroenterological diseases: the inflammatory bowel disease (IBD) and celiac diseases (CD). The exact pathomechanism of these two disorders is unknown, but the damage of intestinal mucosal barrier might play an important role in their pathomechanism. The intestinal alkaline phosphatase (iAP) contributes to the maintenance of gut epithelial integrity. The iAP is able to bind lipopolysaccharide (LPS), the ligand of Toll-like receptor 4 (TLR4) and neutralizes its activity.

**Aim:** The aim of my study was to investigate with molecular biological methods the expression of iAP in colonic biopsy samples of children with newly diagnosed IBD and duodenal biopsy specimens of pediatric patients with newly diagnosed CD and CD patients maintained on gluten-free diet (GFD). The secondary aim of the investigation was to determine the localization of iAP and TLR4 in the duodenal mucosa.

**Results:** The iAP protein level in the inflamed mucosa of children with newly diagnosed Crohn's disease (MC) and ulcerative colitis (UC) was significantly decreased when compared to controls ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.05$  respectively), and to non-inflamed mucosa in MC. The iAP mRNA expression showed no significant alteration in the groups studied. The immunofluorescent staining confirmed in all three groups the colocalization of iAP and TLR4 within the epithelial compartment.

In the duodenal biopsy specimens of children with newly diagnosed CD the iAP protein level was significantly ( $p < 0.05$ ) decreased in comparison to the controls and children with CD on GFD. There was no significant difference in the iAP mRNA expression in the studied groups. iAP and TLR molecules clearly co-localized in all groups studied.

**Conclusion:** The lower level of iAP would result in decreased LPS detoxifying capacity, and could be responsible for the enhanced intestinal permeability and consequent bacterial passage. The finding that iAP and TLR4 is colocalized in the small and large intestines, supports a linked role of iAP in the maintenance of mucosal barrier integrity and initialization of innate immune responses in these two disorders. Based on

my results, the iAP protein levels of the affected intestinal mucosa are lower, and according to the literature the effectiveness of iAP tablets in mice with dextrane sodium sulfate induced colitis and in adult UC patients, the administration of exogenous iAP enzyme could be an adjuvant therapeutic option in the active form of IBD and newly diagnosed CD. This hypothesis should be examined in future controlled studies.

## IRODALOMJEGYZÉK

1. Abraham C, Medzhitov R. Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2011; 140:1729-37.
2. Abramson O, Durant M, Mow W, Finley A, Kodali P, Wong A, Tavares V, McCroskey E, Liu L, Lewis JD, Allison JE, Flowers N, Hutfless S, Velayos FS, Perry GS, Cannon R, Herrinton LJ. Incidence, prevalence, and time trends of pediatric inflammatory bowel disease in Northern California, 1996 to 2006. *J Pediatr*. 2010; 157:233-239.
3. Akiba Y, Mizumori M, Guth PH, Engel E, Kaunitz JD. Duodenal brush border intestinal alkaline phosphatase activity affects bicarbonate secretion in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007; 293:G1223-33.
4. Andoh A, Fujiyama Y. Therapeutic approaches targeting intestinal microflora in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4452-60.
5. Abrantes J, Esteves PJ. Signatures of positive selection in Toll-like receptor (TLR) genes in mammals. *BMC Evol Biol*. 2011; 11:368.
6. Ashida H, Ogawa M, Kim M, Mimuro H, Sasakawa C. Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier. *Nat Chem Biol*. 2011; 8:36-45.
7. Barone MV, Zanzi D, Maglio M, Nanayakkara M, Santagata S, Lania G, Miele E, Ribocco MT, Maurano F, Auricchio R, Gianfrani C, Ferrini S, Troncone R, Auricchio S. Gliadin-mediated proliferation and innate immune activation in celiac disease are due to alterations in vesicular trafficking. *PLoS One*. 2011; 6:e17039.
8. Bates JM, Akerlund J, Mittge E, Guillemin K. Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota. *Cell Host Microbe*. 2007; 2:371-82.
9. Biagi F, Bianchi PI, Vattiato C, Marchese A, Trotta L, Badulli C, De Silvestri A, Martinetti M, Corazza GR. Influence of HLA-DQ2 and DQ8 on Severity in Celiac Disease. *J Clin Gastroenterol*. 2012; 46:46-50.
10. Bol-Schoenmakers M, Fiechter D, Raaben W, Hassing I, Bleumink R, Kruijswijk D, Maijoor K, Tersteeg-Zijderveld M, Brands R, Pieters R. Intestinal alkaline phosphatase contributes to the reduction of severe intestinal epithelial damage. *Eur J Pharmacol*. 2010; 633:71-7.

11. Bramble MG, Zucoloto S, Wright NA, Record CO. Acute gluten challenge in treated adult coeliac disease: a morphometric and enzymatic study. *Gut*. 1985; 26:169-74.
12. Briani C, Samaroo D, Alaedini A. Celiac disease: from gluten to autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2008; 7:644-50.
13. Bruewer M, Samarin S, Nusrat A. Inflammatory bowel disease and the apical junctional complex. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1072:242-52.
14. Bruining DH, Siddiki HA, Fletcher JG, Tremaine WJ, Sandborn WJ, Loftus EV Jr. Prevalence of penetrating disease and extraintestinal manifestations of Crohn's disease detected with CT enterography. *Inflamm Bowel Dis*. 2008; 14:1701-6.
15. Caccamo D, Currò M, Ientile R. Potential of transglutaminase 2 as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets*. 2010; 14:989-1003.
16. Caja S, Mäki M, Kaukinen K, Lindfors K. Antibodies in celiac disease: implications beyond diagnostics. *Cell Mol Immunol*. 2011; 8:103-9.
17. Calleja S, Vivas S, Santiuste M, Arias L, Hernando M, Nistal E, Casqueiro J, Ruiz de Morales JG. Dynamics of non-conventional intraepithelial lymphocytes-NK, NKT, and  $\gamma\delta$  T-in celiac disease: relationship with age, diet, and histopathology. *Dig Dis Sci*. 2011; 56:2042-9.
18. Candia E, Díaz-Jiménez D, Langjahr P, Núñez LE, de la Fuente M, Farfán N, López-Kostner F, Abedrapo M, Alvarez-Lobos M, Pinedo G, Beltrán CJ, González C, González MJ, Quera R, Hermoso MA. Increased production of soluble TLR2 by lamina propria mononuclear cells from ulcerative colitis patients. *Immunobiology*. 2012; 217:634-42
19. Cario E. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut*. 2005; 54:1182-93.
20. Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker HC, Podolsky DK. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol*. 2000; 164:966-72.
21. Cario E. Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later. *Inflamm Bowel Dis*. 2010; 16:1583-97.

22. Chen KT, Malo MS, Beasley-Topliffe LK, Poelstra K, Millan JL, Mostafa G, Alam SN, Ramasamy S, Warren HS, Hohmann EL, Hodin RA. A role for intestinal alkaline phosphatase in the maintenance of local gut immunity. *Dig Dis Sci.* 2011; 56:1020-7.
23. Chong WH, Molinolo AA, Chen CC, Collins MT. Tumor-induced osteomalacia. *Endocr Relat Cancer.* 2011; 18:R53-77.
24. Cseh A, Vasarhelyi B, Molnar K, Szalay B, Svec P, Treszl A, Dezsöfi A, Lakatos PL, Arató A, Tulassay T, Veres G. Immune phenotype in children with therapy-naïve remitted and relapsed Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2010; 16:6001-9.
25. Cseh Á, Vásárhelyi B, Szalay B, Molnár K, Nagy-Szakál D, Treszl A, Vannay Á, Arató A, Tulassay T, Veres G. Immune phenotype of children with newly diagnosed and gluten-free diet-treated celiac disease. *Dig Dis Sci.* 2011; 56:792-8.
26. Clapper ML, Cooper HS, Chang WC. Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: a promising model for the development of chemopreventive interventions. *Acta Pharmacol Sin.* 2007; 28:1450-9.
27. Comino I, Real A, Vivas S, Síglez MÁ, Caminero A, Nistal E, Casqueiro J, Rodríguez-Herrera A, Cebolla A, Sousa C. Monitoring of gluten-free diet compliance in celiac patients by assessment of gliadin 33-mer equivalent epitopes in feces. *Am J Clin Nutr.* 2012; 95:670-7.
28. Curtis BJ, Radek KA. Cholinergic regulation of keratinocyte innate immunity and permeability barrier integrity: new perspectives in epidermal immunity and disease. *J Invest Dermatol.* 2012;132:28-42.
29. Dafik L, Albertelli M, Stammaes J, Sollid LM, Khosla C. Activation and inhibition of transglutaminase 2 in mice. *PLoS One.* 2012; 7:e30642.
30. de Bie CI, Buderus S, Sandhu BK, de Ridder L, Paerregaard A, Veres G, Dias JA, Escher JC; and the EUROKIDS Porto IBD Working Group of ESPGHAN; Members of the EUROKIDS Porto IBD Working Group of ESPGHAN. Diagnostic Workup of Paediatric Patients With Inflammatory Bowel Disease in Europe: Results of a 5-Year Audit of the EUROKIDS Registry. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012; 54:374-80.



31. Decker E, Engelmann G, Findeisen A, Gerner P, Laass M, Ney D, Posovszky C, Hoy L, Hornef MW. Cesarean delivery is associated with celiac disease but not inflammatory bowel disease in children. *Pediatrics*. 2010; 125:e1433-40.
32. Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover. *J Bone Miner Res*. 1993; 8:S549-55.
33. Dezsöfi A, Szébeni B, Hermann CS, Kapitány A, Veres G, Sipka S, Körner A, Madácsy L, Korponay-Szabó I, Rajczy K, Arató A. Frequencies of genetic polymorphisms of TLR4 and CD14 and of HLA-DQ genotypes in children with celiac disease, type 1 diabetes mellitus, or both. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2008; 47:283-7.
34. Di Sabatino A, Vanoli A, Giuffrida P, Luinetti O, Solcia E, Corazza GR. The function of tissue transglutaminase in celiac disease. *Autoimmun Rev*. 2012 Feb 3. [Megjelenés alatt]
35. Di Simone N, Silano M, Castellani R, Di Nicuolo F, D'Alessio MC, Franceschi F, Tritarelli A, Leone AM, Tersigni C, Gasbarrini G, Silveri NG, Caruso A, Gasbarrini A. Anti-tissue transglutaminase antibodies from celiac patients are responsible for trophoblast damage via apoptosis in vitro. *Am J Gastroenterol*. 2010; 105:2254-61.
36. Donnelly SC, Ellis HJ, Ciclitira PJ. Pharmacotherapy and management strategies for coeliac disease. *Expert Opin Pharmacother*. 2011; 12:1731-44.
37. Dziejko V, Safranow K, Słowik-Zyłka D, Machoy-Mokrzyńska A, Millo B, Machoy Z, Chlubek D. Comparison of rat and human alkaline phosphatase isoenzymes and isoforms using HPLC and electrophoresis. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1752:26-33.
38. Esposito C, Paparo F, Caputo I, Porta R, Salvati VM, Mazzarella G, Auricchio S, Troncione R. Expression and enzymatic activity of small intestinal tissue transglutaminase in celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2003; 98:1813-20.
39. Fan MZ, Adeola O, Asem EK. Characterization of brush border membrane-bound alkaline phosphatase activity in different segments of the porcine small intestine. *J Nutr Biochem*. 1999; 10:299-305.
40. Fishman WH. Alkaline phosphatase isozymes: recent progress. *Clin Biochem*. 1990; 23:99-104.
41. Fukata M, Shang L, Santaolalla R, Sotolongo J, Pastorini C, España C, Ungaro R, Harpaz N, Cooper HS, Elson G, Kosco-Vilbois M, Zaias J, Perez MT, Mayer L,

- Vamadevan AS, Lira SA, Abreu MT. Constitutive activation of epithelial TLR4 augments inflammatory responses to mucosal injury and drives colitis-associated tumorigenesis. *Inflamm Bowel Dis.* 2011; 17:1464-73.
42. Gaboriau-Routhiau V, Lécuyer E, Cerf-Bensussan N. Role of microbiota in postnatal maturation of intestinal T-cell responses. *Curr Opin Gastroenterol.* 2011; 27:502-8.
43. Gao Q, Qi L, Wu T, Wang J. Clostridium butyricum activates TLR2-mediated MyD88-independent signaling pathway in HT-29 cells. *Mol Cell Biochem.* 2012; 361:31-7.
44. Geddes K, Philpott DJ. A new role for intestinal alkaline phosphatase in gut barrier maintenance. *Gastroenterology.* 2008; 135:8-12.
45. Gersemann M, Stange EF, Wehkamp J. From intestinal stem cells to inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol.* 2011; 17:3198-203.
46. Giersiepen K, Lelgemann M, Stuhldreher N, Ronfani L, Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR; and the ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis. Accuracy of Diagnostic Antibody Tests for Coeliac Disease in Children: Summary of an Evidence Report. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012; 54:229-241.
47. Gilbert S, Zhang R, Denson L, Moriggl R, Steinbrecher K, Shroyer N, Lin J, Han X. Enterocyte STAT5 promotes mucosal wound healing via suppression of myosin light chain kinase-mediated loss of barrier function and inflammation. *EMBO Mol Med.* 2012; 4:109-24.
48. Goddard AF, James MW, McIntyre AS, Scott BB; British Society of Gastroenterology. Guidelines for the management of iron deficiency anaemia. *Gut.* 2011; 60:1309-16.
49. Goldberg RF, Austen WG Jr, Zhang X, Munene G, Mostafa G, Biswas S, McCormack M, Eberlin KR, Nguyen JT, Tatlidede HS, Warren HS, Narisawa S, Millán JL, Hodin RA. Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:3551-6.
50. Gorgun J, Portyanko A, Marakhouski Y, Cherstvoy E. Tissue transglutaminase expression in celiac mucosa: an immunohistochemical study. *Virchows Arch.* 2009; 455:363-73.

51. Hammer HF. Gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Dig Dis.* 2011; 29:550-3.
52. Hedin CR, Mullard M, Sharratt E, Jansen C, Sanderson JD, Shirlaw P, Howe LC, Djemal S, Stagg AJ, Lindsay JO, Whelan K. Probiotic and prebiotic use in patients with inflammatory bowel disease: a case-control study. *Inflamm Bowel Dis.* 2010; 16:2099-108.
53. Heimesaat MM, Fischer A, Jahn HK, Niebergall J, Freudenberg M, Blaut M, Liesenfeld O, Schumann RR, Göbel UB, Bereswill S. Exacerbation of murine ileitis by Toll-like receptor 4 mediated sensing of lipopolysaccharide from commensal *Escherichia coli*. *Gut.* 2007; 56:941-8.
54. Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, Thaiss CA, Kau AL, Eisenbarth SC, Jurczak MJ, Camporez JP, Shulman GI, Gordon JI, Hoffman HM, Flavell RA. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature.* 2012; 482:179-85.
55. Heyman M, Menard S. Pathways of gliadin transport in celiac disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1165:274-8.
56. Hundorfean G, Neurath MF, Mudter J. Functional relevance of T helper 17 (Th17) cells and the IL-17 cytokine family in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2012; 18:180-6.
57. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, Troncone R, Giersiepen K, Branski D, Catassi C, Leigeman M, Mäki M, Ribes-Koninckx C, Ventura A, Zimmer KP; ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis; ESPGHAN Gastroenterology Committee. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012; 54:136-60.
58. IBD Working Group of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. Inflammatory bowel disease in children and adolescents: recommendations for diagnosis--the Porto criteria. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005; 41:1-7.
59. Inaba Y, Ashida T, Ito T, Ishikawa C, Tanabe H, Maemoto A, Watari J, Ayabe T, Mizukami Y, Fujiya M, Kohgo Y. Expression of the antimicrobial peptide alpha-defensin/cryptdins in intestinal crypts decreases at the initial phase of intestinal

inflammation in a model of inflammatory bowel disease, IL-10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis.* 2010; 16:1488-95.

60. Jakobsen C, Munkholm P, Paerregaard A, Wewer V. Steroid dependency and pediatric inflammatory bowel disease in the era of immunomodulators--a population-based study. *Inflamm Bowel Dis.* 2011; 17:1731-40.

61. Kaur N, Chen CC, Luther J, Kao JY. Intestinal dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut Microbes.* 2011; 2:211-6.

62. Kalliomäki M, Satokari R, Lähteenoja H, Vähämiko S, Grönlund J, Routi T, Salminen S. Expression of Microbiota, Toll-Like Receptors And Their Regulators In The Small Intestinal Mucosa In Celiac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012; 54:727-32.

63. Kaur J, Madan S, Hamid A, Singla A, Mahmood A. Intestinal alkaline phosphatase secretion in oil-fed rats. *Dig Dis Sci.* 2007; 52:665-70.

64. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity.* 2011; 34:637-50.

65. Korpimäki S, Kaukinen K, Collin P, Haapala AM, Holm P, Laurila K, Kurppa K, Saavalainen P, Haimila K, Partanen J, Mäki M, Lähdeaho ML. Gluten-sensitive hypertransaminasemia in celiac disease: an infrequent and often subclinical finding. *Am J Gastroenterol.* 2011; 106:1689-96.

66. Korponay-Szabó IR, Halttunen T, Szalai Z, Laurila K, Király R, Kovács JB, Fésüs L, Mäki M. In vivo targeting of intestinal and extraintestinal transglutaminase 2 by coeliac autoantibodies. *Gut.* 2004; 53:641-8.

67. Koslowski MJ, Beisner J, Stange EF, Wehkamp J. Innate antimicrobial host defense in small intestinal Crohn's disease. *Int J Med Microbiol.* 2010; 300:34-40.

68. Kozáková H, Stěpánková R, Kolínská J, Farré MA, Funda DP, Tucková L, Tlaskalová-Hogenová H. Brush border enzyme activities in the small intestine after long-term gliadin feeding in animal models of human coeliac disease. *Folia Microbiol (Praha).* 1998; 43:497-500.

69. Kurokawa K, Ryu KH, Ichikawa R, Masuda A, Kim MS, Lee H, Chae JH, Shimizu T, Saitoh T, Kuwano K, Akira S, Dohmae N, Nakayama H, Lee BL. Novel

bacterial lipoprotein structures conserved in low-GC content Gram-positive bacteria are recognized by Toll-like receptor 2. *J Biol Chem.* 2012; 287:13170-81.

70. La Scaleia R, Stoppacciaro A, Oliva S, Morrone S, Di Nardo G, Santoni A, Cucchiara S, Palmieri G. NKG2D/Ligand dysregulation and functional alteration of innate immunity cell populations in pediatric IBD. *Inflamm Bowel Dis.* 2012 Jan 31. [Megjelenés alatt]

71. Lakatos PL, Fischer S, Lakatos L, Gal I, Papp J. Current concept on the pathogenesis of inflammatory bowel disease-crosstalk between genetic and microbial factors: pathogenic bacteria and altered bacterial sensing or changes in mucosal integrity take "toll" ? *World J Gastroenterol.* 2006; 12:1829-41.

72. Lallès JP. Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. *Nutr Rev.* 2010; 68:323-32.

73. Laparra Llopis JM, Sanz Herranz Y. Gliadins induce TNFalpha production through cAMP-dependent protein kinase A activation in intestinal cells (Caco-2). *J Physiol Biochem.* 2010; 66:153-9.

74. Larrosa M, Azorín-Ortuño M, Yañez-Gascón MJ, García-Conesa MT, Tomás-Barberán F, Espín JC. Lack of effect of oral administration of resveratrol in LPS-induced systemic inflammation. *Eur J Nutr.* 2011; 50:673-80.

75. Laukoetter MG, Nava P, Nusrat A. Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2008; 14:401-7.

76. Lehmann FG, Cramer P, Hillert U. Intestinal alkaline phosphatase: an immunoprecipitation method for the determination in feces. *Clin Chim Acta.* 1980; 105:367-76.

77. Levin A, Shibolet O. Toll-like receptors in inflammatory bowel disease-stepping into uncharted territory. *World J Gastroenterol.* 2008; 14:5149-53.

78. Levine A, Griffiths A, Markowitz J, Wilson DC, Turner D, Russell RK, Fell J, Ruemmele FM, Walters T, Sherlock M, Dubinsky M, Hyams JS. Pediatric modification of the Montreal classification for inflammatory bowel disease: the Paris classification. *Inflamm Bowel Dis.* 2011; 17:1314-21.

79. Lindfors K, Kaukinen K. Contribution of celiac disease autoantibodies to the disease process. *Expert Rev Clin Immunol.* 2012; 8:151-4.
80. Lionetti E, Catassi C. New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment. *Int Rev Immunol.* 2011; 30:219-31.
81. Logan I, Bowlus CL. The geoepidemiology of autoimmune intestinal diseases. *Autoimmun Rev.* 2010; 9:372-8.
82. López-Posadas R, González R, Ballester I, Martínez-Moya P, Romero-Calvo I, Suárez M, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O, Sánchez de Medina F. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is activated in enterocytes by oxidative stress via changes in glycosylation. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 543-56.
83. Lorne E, Dupont H, Abraham E. Toll-like receptors 2 and 4: initiators of non-septic inflammation in critical care medicine? *Intensive Care Med.* 2010; 36:1826-35.
84. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* 2008; 42:145-51.
85. Lukas M, Drastich P, Konecny M, Gionchetti P, Urban O, Cantoni F, Bortlik M, Duricova D, Bulitta M. Exogenous alkaline phosphatase for the treatment of patients with moderate to severe ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2010; 16:1180-6.
86. Luo Y, Takaki M, Misawa H, Matsuyoshi H, Sasahira T, Chihara Y, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H. Determinants of the epithelial-muscular axis on embryonic stem cell-derived gut-like structures. *Pathobiology.* 2010; 77:253-9.
87. Lynes MD, Widmaier EP. Involvement of CD36 and intestinal alkaline phosphatases in fatty acid transport in enterocytes, and the response to a high-fat diet. *Life Sci.* 2011; 88:384-91.
88. MacDonald TT, Monteleone I, Fantini MC, Monteleone G. Regulation of homeostasis and inflammation in the intestine. *Gastroenterology.* 2011; 140:1768-75.
89. Malo M, Alam S, Mostafa G, Zeller S, Johnson P, Mohammad N, Chen K, Moss A, Ramasamy S, Faruqui A, Hodin S, Malo P, Ebrahimi F, Biswas B, Narisawa S, Millán J, Warren H, Kaplan J, Kitts C, Hohmann E, Hodin R. Intestinal alkaline phosphatase preserves the normal homeostasis of gut microbiota. *Gut* 2010; 59: 1476-1484.
90. Marietta EV, David CS, Murray JA. Important lessons derived from animal models of celiac disease. *Int Rev Immunol.* 2011; 30:197-206.

91. Martins MJ, Dias PO, Hipólito-Reis C. Rat serum alkaline phosphatase electrophoretic fractions: variations with feeding, starvation and cellulose fibre ingestion. *Clin Nutr.* 1998; 17:279-85.
92. Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, Zeitz M, Duchmann R. Peripheral and intestinal regulatory CD4<sup>+</sup> CD25<sup>(high)</sup> T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2005; 128:1868-78.
93. Maynard CL, Weaver CT. Immunology: Context is key in the gut. *Nature.* 2011; 471:169-70.
94. McGuckin MA, Eri R, Simms LA, Florin TH, Radford-Smith G. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2009; 15:100-13.
95. Mencarelli A, Renga B, Palladino G, Claudio D, Ricci P, Distrutti E, Barbanti M, Baldelli F, Fiorucci S. Inhibition of NF- $\kappa$ B by a PXR-dependent pathway mediates counter-regulatory activities of rifaximin on innate immunity in intestinal epithelial cells. *Eur J Pharmacol.* 2011; 668:317-24.
96. Moens E, Veldhoen M. Epithelial barrier biology: good fences make good neighbours. *Immunology.* 2012;135:1-8.
97. Moes N, Rieux-Laucat F, Begue B, Verdier J, Neven B, Patey N, Torgerson TT, Picard C, Stolzenberg MC, Ruemmele C, Rings EH, Casanova JL, Piloquet H, Biver A, Breton A, Ochs HD, Hermine O, Fischer A, Goulet O, Cerf-Bensussan N, Ruemmele FM. Reduced expression of FOXP3 and regulatory T-cell function in severe forms of early-onset autoimmune enteropathy. *Gastroenterology.* 2010; 139:770-8.
98. Monteleone I, Pallone F, Monteleone G. Th17-related cytokines: new players in the control of chronic intestinal inflammation. *BMC Med.* 2011; 9:122.
99. Mustalahti K, Catassi C, Reunanen A, Fabiani E, Heier M, McMillan S, Murray L, Metzger MH, Gasparin M, Bravi E, Mäki M; Coeliac EU Cluster, Project Epidemiology. The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Ann Med.* 2010; 42:587-95.
100. Nagy-Szakál D, Gyorffy H, Arató A, Cseh A, Molnár K, Papp M, Dezsöfi A, Veres G. Mucosal expression of claudins 2, 3 and 4 in proximal and distal part of duodenum in children with coeliac disease. *Virchows Arch.* 2010; 456:245-50.

101. Nahidi L, Day AS, Lemberg DA, Leach ST. Differential effects of nutritional and non-nutritional therapies on intestinal barrier function in an in vitro model. *J Gastroenterol.* 2012; 47:107-17.
102. Oliva-Hemker M, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel disease: the importance of the pediatric perspective. *Inflamm Bowel Dis.* 2002; 8:112-28.
103. Olsen L, Bressendorff S, Troelsen JT, Olsen J. Differentiation-dependent activation of the human intestinal alkaline phosphatase promoter by HNF-4 in intestinal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005; 289:G220-6.
104. Orlando G, Bendala JD, Shupe T, Bergman C, Bitar KN, Booth C, Carbone M, Koch KL, Lerut JP, Neuberger JM, Petersen B, Ricordi C, Atala A, Stratta RJ, Soker S. Cell and organ bioengineering technology as applied to gastrointestinal diseases. *Gut.* 2012 Jan 20. [Megjelenés alatt]
105. Papista C, Gerakopoulos V, Kourelis A, Sounidaki M, Kontana A, Berthelot L, Moura IC, Monteiro RC, Yiangou M. Gluten induces coeliac-like disease in sensitised mice involving IgA, CD71 and transglutaminase 2 interactions that are prevented by probiotics. *Lab Invest.* [Lab Invest.](#) 2012; 92:625-35.
106. Pellegrino S, Villanacci V, Sansotta N, Scarfi R, Bassotti G, Vieni G, Princiotta A, Sferlazzas C, Magazzù G, Tuccari G. Redefining the intraepithelial lymphocytes threshold to diagnose gluten sensitivity in patients with architecturally normal duodenal histology. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011; 33:697-706.
107. Prabhu R, Thomas S, Balasubramanian KA. Oral glutamine attenuates surgical manipulation-induced alterations in the intestinal brush border membrane. *J Surg Res.* 2003; 115:148-56.
108. Prasad KK, Thapa BR, Nain CK, Sharma AK, Singh K. Brush border enzyme activities in relation to histological lesion in pediatric celiac disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008; 23:e348-52.
109. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell.* 2004; 118:229-41.



110. Ramasamy S, Nguyen DD, Eston MA, Alam SN, Moss AK, Ebrahimi F, Biswas B, Mostafa G, Chen KT, Kaliannan K, Yammine H, Narisawa S, Millán JL, Warren HS, Hohmann EL, Mizoguchi E, Reinecker HC, Bhan AK, Snapper SB, Malo MS, Hodin RA. Intestinal alkaline phosphatase has beneficial effects in mouse models of chronic colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2011; 17:532-42.
111. Rashtak S, Murray JA. Review article: coeliac disease, new approaches to therapy. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012; 35:768-81.
112. Renz H, Brandtzaeg P, Hornef M. The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2011; 12:9-23.
113. Rescigno M, Di Sabatino A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *J Clin Invest.* 2009; 119:2441-50.
114. Ribes-Koninckx C, Mearin ML, Korponay-Szabó IR, Shamir R, Husby S, Ventura A, Branski D, Catassi C, Koletzko S, Mäki M, Troncone R, Zimmer KP; ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis. Coeliac disease diagnosis: ESPGHAN 1990 criteria or need for a change? Results of a questionnaire. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012; 54:15-9.
115. Richard-Miceli C, Criswell LA. Emerging patterns of genetic overlap across autoimmune disorders. *Genome Med.* 2012; 4:6.
116. Richter JM, Schanbacher BL, Huang H, Xue J, Bauer JA, Giannone PJ. Lipopolysaccharide Binding Protein Enables Intestinal Epithelial Restitution Despite Lipopolysaccharide Exposure. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012; 54:639-44.
117. Sakiyama T, Musch MW, Ropeleski MJ, Tsubouchi H, Chang EB. Glutamine increases autophagy under Basal and stressed conditions in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* 2009; 136:924-32.
118. Salim SY, Söderholm JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2011; 17:362-81.
119. Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology.* 2004; 126:1620-33.

120. Saurer L, Mueller C. T cell-mediated immunoregulation in the gastrointestinal tract. *Allergy*. 2009; 64:505-19.
121. Savilahti E, Arato A, Verkasalo M. Intestinal gamma/delta receptor-bearing T lymphocytes in celiac disease and inflammatory bowel diseases in children. Constant increase in celiac disease. *Pediatr Res*. 1990; 28:579-81.
122. Scanlon SA, Murray JA. Update on celiac disease - etiology, differential diagnosis, drug targets, and management advances. *Clin Exp Gastroenterol*. 2011; 4:297-311.
123. Schäppi MG, Meier S, Bel M, Siegrist CA, Posfay-Barbe KM; the H1N1 Study Group. Protective Antibody Responses to Influenza A/H1N1/09 Vaccination in Children with Celiac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012 Jan 4. [Megjelenés alatt]
124. Schiffrin EJ, Blum S. Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. *Eur J Clin Nutr*. 2002; 56:S60-4.
125. Schumann M, Richter JF, Wedell I, Moos V, Zimmermann-Kordmann M, Schneider T, Daum S, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Mechanisms of epithelial translocation of the alpha(2)-gliadin-33mer in coeliac sprue. *Gut*. 2008; 57:747-54.
126. Sepehri S, Khafipour E, Bernstein CN, Coombes BK, Pilar AV, Karmali M, Ziebell K, Krause DO. Characterization of *Escherichia coli* isolated from gut biopsies of newly diagnosed patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011; 17:1451-63.
127. Shahidi N, Fu YT, Qian H, Bressler B. Performance of interferon-gamma release assays in patients with inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 Jan 31. [Megjelenés alatt]
128. Shen L, Su L, Turner JR. Mechanisms and functional implications of intestinal barrier defects. *Dig Dis*. 2009; 27:443-9.
129. Shirazi SP, Beechey RB, Butterworth PJ. Potent inhibition of membrane-bound rat intestinal alkaline phosphatase by a new series of phosphate analogues. *Biochem J*. 1981; 194:797-802.

130. Siegmund B. Targeted therapies in inflammatory bowel disease. *Dig Dis.* 2009; 27:465-9.
131. Smith PD, Smythies LE, Shen R, Greenwell-Wild T, Gliozzi M, Wahl SM. Intestinal macrophages and response to microbial encroachment. *Mucosal Immunol.* 2011; 4:31-42.
132. Sodhi C, Levy R, Gill R, Neal MD, Richardson W, Branca M, Russo A, Prindle T, Billiar TR, Hackam DJ. DNA attenuates enterocyte Toll-like receptor 4-mediated intestinal mucosal injury after remote trauma. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011; 300:G862-73.
133. Sotolongo J, España C, Echeverry A, Siefker D, Altman N, Zaias J, Santaolalla R, Ruiz J, Schesser K, Adkins B, Fukata M. Host innate recognition of an intestinal bacterial pathogen induces TRIF-dependent protective immunity. *J Exp Med.* 2011; 208:2705-16.
134. Szebeni B, Vannay A, Sziksz E, Prókai A, Cseh A, Veres G, Dezsöfi A, Györffy H, Szabó IR, Arató A. Increased expression of serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1 in the duodenal mucosa of children with coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010; 50:147-53.
135. Szebeni B, Veres G, Dezsöfi A, Rusai K, Vannay A, Mraz M, Majorova E, Arató A. Increased expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol.* 2008; 151:34-41.
136. Szebeni B, Veres G, Dezsöfi A, Rusai K, Vannay A, Bokodi G, Vásárhelyi B, Korponay-Szabó IR, Tulassay T, Arató A. Increased mucosal expression of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007; 45:187-93.
137. Sziksz E, Kozma G, Komlósi ZI, Pállinger E, Kardos M, Szebeni B, Losonczy G, Falus A, Szabó A, Tulassay T, Vannay A. Increased synthesis of vascular endothelial growth factor in allergic airway inflammation in histidine decarboxylase knockout (HDC(-/-)) mice. *Exp Lung Res.* 2010; 36:420-30.

138. Sziksz E, Veres G, Vannay A, Prókai A, Gál K, Onody A, Korponay-Szabó IR, Reusz G, Szabó A, Tulassay T, Arató A, Szebeni B. Increased heat shock protein 72 expression in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010; 51:573-8.
139. Taniguchi Y, Yoshioka N, Nakata K, Nishizawa T, Inagawa H, Kohchi C, Soma G. Mechanism for maintaining homeostasis in the immune system of the intestine. *Anticancer Res.* 2009; 29:4855-60.
140. Tewari R, Choudhury SR, Ghosh S, Mehta VS, Sen E. Involvement of TNF $\alpha$ -induced TLR4-NF- $\kappa$ B and TLR4-HIF-1 $\alpha$  feed-forward loops in the regulation of inflammatory responses in glioma. *J Mol Med (Berl).* 2012; 90:67-80.
141. Tezuka H, Ohteki T. Regulation of intestinal homeostasis by dendritic cells. *Immunol Rev.* 2010; 234:247-58.
142. Tjellström B, Stenhammar L, Högberg L, Fälth-Magnusson K, Magnusson KE, Midtvedt T, Sundqvist T, Norin E. Gut microflora associated characteristics in children with celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2005; 100:2784-8.
143. Tjon JM, van Bergen J, Koning F. Celiac disease: how complicated can it get? *Immunogenetics.* 2010; 62:641-51.
144. Tlaskalová-Hogenová H, Stepánková R, Hudcovic T, Tucková L, Cukrowska B, Lodinová-Zádníková R, Kozáková H, Rossmann P, Bártová J, Sokol D, Funda DP, Borovská D, Reháková Z, Sinkora J, Hofman J, Drastich P, Kokesová A. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett.* 2004; 93:97-108.
145. Tomasello G, Bellavia M, Palumbo VD, Gioviale MC, Damiani P, Lo Monte AI. From gut microflora imbalance to mycobacteria infection: is there a relationship with chronic intestinal inflammatory diseases? *Ann Ital Chir.* 2011; 82:361-8.
146. Torres MI, Lorite P, López-Casado MA, Ríos A. A new approach using tissue alkaline phosphatase histochemistry to identify Crohn's disease. *Pathol Res Pract.* 2007; 203:485-7.
147. Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol.* 2002; 23:301-4.

148. Tuin A, Poelstra K, de Jager-Krikken A, Bok L, Raaben W, Velders MP, Dijkstra G. Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats. *Gut*. 2009; 58:379-87.
149. Turner D, Griffiths AM. Acute severe ulcerative colitis in children: a systematic review. *Inflamm Bowel Dis*. 2011; 17:440-9.
150. 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. Mathematical weighting of the pediatric Crohn's disease activity index (PCDAI) and comparison with its other short versions. *Inflamm Bowel Dis*. 2012; 18:55-62.
151. Turner D, Hyams J, Markowitz J, Lerer T, Mack DR, Evans J, Pfefferkorn M, Rosh J, Kay M, Crandall W, Keljo D, Otley AR, Kugathasan S, Carvalho R, Oliva-Hemker M, Langton C, Mamula P, Bousvaros A, LeLeiko N, Griffiths AM; Pediatric IBD Collaborative Research Group. Appraisal of the pediatric ulcerative colitis activity index (PUCAI). *Inflamm Bowel Dis*. 2009; 15:1218-23.
152. Ulluwishewa D, Anderson RC, McNabb WC, Moughan PJ, Wells JM, Roy NC. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *J Nutr*. 2011; 141:769-76.
153. van Maren WW, Jacobs JF, de Vries IJ, Nierkens S, Adema GJ. Toll-like receptor signalling on Tregs: to suppress or not to suppress? *Immunology*. 2008; 124:445-52.
154. Vannay A, Sziksz E, Prókai A, Veres G, Molnár K, Szakál DN, Onódy A, Korponay-Szabó IR, Szabó A, Tulassay T, Arató A, Szebeni B. Increased expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in coeliac disease. *Pediatr Res*. 2010; 68:118-22.
155. Veerappan SG, O'Morain CA, Daly JS, Ryan BM. Review article: the effects of antitumour necrosis factor- $\alpha$  on bone metabolism in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011; 33:1261-72.
156. Veltkamp C, Anstaett M, Wahl K, Möller S, Gangl S, Bachmann O, Hardtke-Wolenski M, Länger F, Stremmel W, Manns MP, Schulze-Osthoff K, Bantel H. Apoptosis of regulatory T lymphocytes is increased in chronic inflammatory bowel disease and reversed by anti-TNF $\alpha$  treatment. *Gut*. 2011; 60:1345-53.

157. Verdier J, Begue B, Cerf-Bensussan N, Ruemmele FM. Compartmentalized expression of Th1 and Th17 cytokines in pediatric inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2012; 18:1260-6.
158. Veres G, És a magyar gyermek ibd regiszter részvevői. A magyarországi gyermekkori gyulladásos bélbetegségek (ibd) regiszterének első éves (2007) elemzése. *Gyermekgyógyászat* 2008; 59: 282–287.
159. Vilppula A, Kaukinen K, Luostarinen L, Krekelä I, Patrikainen H, Valve R, Luostarinen M, Laurila K, Mäki M, Collin P. Clinical benefit of gluten-free diet in screen-detected older celiac disease patients. *BMC Gastroenterol*. 2011; 11:136.
160. Wahab PJ, Meijer JW, Mulder CJ. Histologic follow-up of people with celiac disease on a gluten-free diet: slow and incomplete recovery. *Am J Clin Pathol*. 2002; 118:459-63.
161. Walker MM, Murray JA. An update in the diagnosis of coeliac disease. *Histopathology*. 2011; 59:166-79.
162. Wang S, Villablanca EJ, De Calisto J, Gomes DC, Nguyen DD, Mizoguchi E, Kagan JC, Reinecker HC, Hacoen N, Nagler C, Xavier RJ, Rossi-Bergmann B, Chen YB, Blomhoff R, Snapper SB, Mora JR. MyD88-dependent TLR1/2 signals educate dendritic cells with gut-specific imprinting properties. *J Immunol*. 2011; 187:141-50.
163. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007; 448:427-34.
164. Zhang Y, Shao JS, Xie QM, Alpers DH. Immunolocalization of alkaline phosphatase and surfactant-like particle proteins in rat duodenum during fat absorption. *Gastroenterology*. 1996; 110:478-88.
165. Zhou F, Zhang X, Dam HV, Dijke PT, Huang H, Zhang L. Ubiquitin-specific protease 4 mitigates Toll-like/interleukin-1 receptor signaling and regulates innate immune activation. *J Biol Chem*. 2012 Jan 19. [Megjelenés alatt]

## ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

### Ábrák

- 1. ábra:** A gyulladásos bélbetegség (IBD) ethiopatogenezise.
- 2. ábra:** Az IBD és az intesztinális mikroflóra kapcsolata.
- 3. ábra** A TLR ligandok diverzitása.
- 4. ábra:** A humorális és sejt-mediált immunválaszok és későbbi mukózális sérülés sematikus ábrája cöliákiában.
- 5. ábra:** Az intesztinális alkalikus foszfatáz (iAP) alapvető funkciói fiziológiás állapotban.
- 6. ábra:** Az intesztinális alkalikus foszfatáz (iAP) lipopoliszacharidot (LPS) detoxifikáló folyamata.
- 7. ábra:** A Crohn-betegség (bal) és kolitisz ulcerosa (jobb) makroszkópos, kolonoszkópia során látható képe.
- 8. ábra:** Újonnan diagnosztizált cöliakiás gyermek duodenum nyálkahártyája felső endoszkópia során.
- 9. ábra:** Az iAP mRNS expresszió BrilliantII QPCR alapú real time RT-PCR-el történő kimutatásának reprezentatív képe gyulladásos bélbetegségben szenvedő (IBD) gyermekek kolon nyálkahártyájában.
- 10. ábra:** Az iAP mRNS expressziós változása kontrollok, Crohn-beteg (MC) gyermekek gyulladt és nem-gyulladt, valamint kolitisz ulcerózás (UC) kolon nyálkahártyájában (rea- time-PCR).
- 11. ábra:** Az iAP fehérjeszintek (Western blot) reprezentatív eredményei a kontrollok, Crohn-beteg (MC) gyulladt és nem-gyulladt, valamint kolitisz ulcerózás (UC) gyermekek gyulladt kolon nyálkahártyájában.

**12. ábra:** Az iAP fehérjeszintek változása mutatja a kontrollok, Crohn-beteg gyermekek (MC) gyulladt és nem-gyulladt, valamint kolitisz ulcerózás gyermekek gyulladt kolon nyálkahártyájában.

**13. ábra:** Az iAP és TLR4 lokalizációja Crohn-beteg (MC), kolitisz ulcerózás (UC) és kontroll gyermekek terminális ileum és kolon nyálkahártyájában.

**14. ábra:** Az iAP mRNS expresszió BrilliantII QPCR alapú real-time RT-PCR-el történő kimutatásának reprezentatív képe cöliákias gyermekek duodenum nyálkahártyájában.

**15. ábra:** Az iAP mRNS expressziós változása kontrollok, újonnan diagnosztizált cöliákias (CD), valamint gluténmentes diétát tartó cöliákias (GFD) gyermekek duodenum nyálkahártyájában.

**16. ábra:** Az iAP fehérjeszintek (Western blot) reprezentatív eredményei a kontrollok, újonnan diagnosztizált cöliákias (CD) és gluténmentes étrendet tartó cöliákias (GFD) gyermekek duodenum nyálkahártyájában.

**17. ábra:** Az iAP fehérjeszintek változása a kontrollok, újonnan diagnosztizált cöliákias gyermekek (CD) és gluténmentes étrendet tartó cöliákias gyermekek duodenum nyálkahártyájában.

**18. ábra:** Az iAP és TLR4 lokalizációja egészséges kontroll, újonnan diagnosztizált cöliákias (CD) és gluténmentes étrendet tartó cöliákias (GFD) gyermekek duodenum nyálkahártyájában.

**19. ábra:** Az intesztinális alkalikus foszfátáz (iAP) szerepe a bélhomeosztázis és a mukózális barrierrintegritás fenntartásában.



## **Táblázatok**

**1. táblázat:** Az újonnan diagnosztizált Crohn-beteg (MC) és kolitisz ulcerózáss (UC) betegek klinikai jellemzői.

**2. táblázat:** Az újonnan diagnosztizált cöliákiás (CD), gluténmentes étreden tartott cöliákiás (GFD) gyermekek klinikai jellemzői.

## PUBLIKÁCIÓK

### A doktori értekezés témájához kapcsolódó közlemények

**1. Molnár K**, Vannay A, Szebeni B, Bánki NF, Sziksz E, Cseh A, Gyórfy H, Lakatos PL, Papp M, Arato A, Veres G. : Intestinal Alkaline Phosphatase in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 2012; 18: 3254-3259 (IF:2.24)

**2. Molnár K**, Vannay A, Sziksz E, Bánki NF, Gyórfy H, Arato A, Dezsőfi A, Veres G.: Decreased mucosal expression of intestinal alkaline phosphatase in children with coeliac disease. Virchows Arch. 2012; 460:157-61. (IF:**2.33**)

**3. Molnár K**, Vannay Á, Szebeni B, Arató A, Gyórfy H, Sziksz E, Nagy Szakál D, Cseh Á, Bánki NF, Tulassay T, Dezsőfi A, Veres G: Intestinalis alkalikus foszfatase expressziója IBD-s gyermekek vastagbél nyálkahártyájában. Gyermekgyógyászat, 2011; 62: 125-29. (IF : 0,00)

Összesített IF : **4,56**

## A doktori értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények

1. Szakál DN, Gyórfly H, Arató A, Cseh Á, **Molnár K**, Papp M, Dezsőfi A, Veres G.: Mucosal expression of claudins 2, 3 and 4 in proximal and distal part of duodenum in children with coeliac disease. *Virchows Arch.* 2010; 456:245-50. (IF:**2.33**)
2. Vannay Á, Sziksz E, Prókai A, Veres G, **Molnár K**, Szakál DN, Ónody A, Korponay-Szabó IR, Szabó A, Tulassay T, Arató A, Szebeni B.: Increased expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in coeliac disease. *Pediatr Res.* 2010; 68:118-22. (IF:**2.60**)
3. Cseh Á, Vásárhelyi B, Szalay B, **Molnár K**, Nagy-Szakál D, Treszl A, Vannay Á, Arató A, Tulassay T, Veres G.: Immune Phenotype of Children with Newly Diagnosed and Gluten-Free Diet-Treated Celiac Disease., *Dig Dis Sci.* 2011;56:792-8. (IF:**1.838**)
4. Cseh Á, **Molnár K**, Pintér P, Szalay B, Szebeni B, Treszl A, Arató A, Vásárhelyi B, Veres G.: Regulatory T Cells and T Helper Subsets in Breast-fed Infants With Hematochezia Caused by Allergic Colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010; 51:675-7. (IF:**2.183**)
5. Cseh Á, Vasarhelyi B, **Molnár K**, Szalay B, Svec P, Treszl A, Dezsőfi A, Lakatos PL, Arató A, Tulassay T, Veres G.: Immune phenotype in children with therapy-naïve remitted and relapsed Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2010; 16:6001-9. (IF:**2.24**)
6. Kovács M, Müller KE, Arató A, Lakatos PL, Kovács JB, Várkonyi A, Sólyom E, Polgár M, Nemes E, Guthy I, Tokodi I, Tóth G, Horváth A, Tárnok A, Tomsits E, Csozánzsky N, Balogh M, Vass N, Bódi P, Dezsőfi A, Gárdos L, Micskey E, Papp M, Szűcs D, Cseh Á, **Molnár K**, Szabó D, Veres G; on behalf of the Hungarian IBD Registry Group (HUPIR). Diagnostic yield of upper endoscopy in paediatric patients

with Crohn's disease and ulcerative colitis. Subanalysis of the HUPIR registry. J Crohns Colitis. 2012;6:86-94. (IF:2.628)

7. Kovacs M, Lakatos PL, Papp M, Jacobsen S, Nemes E, Polgar M, Solyom E, Bodi P, Horvath A, Muller KE, **Molnar K**, Szabo D, Cseh A, Dezsofi A, Arato A, Veres G. Pancreatic autoantibodies and autoantibodies against goblet cells in pediatric patients with inflammatory bowel disease (IBD). J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2012 Mar 29. [megjelenés alatt] (IF:2.183)

8. Kovacs M, Papp M, Lakatos PL, Jacobsen S, Nemes E, Polgar M, Solyom E, Bodi P, Horvath A, **Molnar K**, Szabo D, Cseh A, Muller KE, Dezsofi A, Arato A, Veres G. Low mannose-binding lectin (MBL) is associated with paediatric inflammatory bowel diseases and ileal involvement in patients with Crohn disease. J Crohns Colitis. 2012 Apr 13. [megjelenés alatt] (IF:2.628)

9. **Molnár K**, Papp M, Szőnyi L, Lakatos PL, Tornai I, Földi I, Arató A, Dezsőfi A, Veres G.: Haptoglobin polymorphism primer sclerosing cholangitisben szenvedő gyermekekben és felnőttekben. Gyermekgyógyászat, 2008; 59:277-281. (IF : 0,00)

10. Pintér V, Gyórfy H, Arató A, Dezsőfi A, **Molnár K**, Veres G.: Allergiás és eosinophil colitises gyermekek laboratóriumi és klinikai jellemzői. Gyermekgyógyászat, 2008; 59:291-295. (IF : 0,00)

11. Veres G, Putz R, Szabó D, **Molnár K**, Bodánszky H, Dezsofi A, Arató A.: Adalimumab kezelés infliximab-rezisztens Crohn-beteg gyermekben. Orv Hetil. 2009; 150: 1858-60. (IF : 0,00)

12. **Molnár K**.: Eozinofil enteropathia vagy IBD? A hematochesia okai kisdedkorában. Gyermekgyógyászati Továbbképző Szemle, 2010; 15: 19-21. (IF : 0,00)

Összesített IF : 16,447

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

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

Hálás vagyok Dr. Arató András Professzor Úrnak, hogy szellemi és anyagi támogatással hozzájárult a vizsgálatok felépítéséhez és kivitelezéséhez.

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

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

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

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

Köszönöm Megyeri Zsuzsanna baráti segítségét a nyelvi lektorálásért.

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