

# MikroRNS-ek jelentősége gyermekkori Crohn-betegségben

Doktori értekezés

**Szűcs Dániel**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Veres Gábor, DSc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Glasz Tibor, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Németh István Balázs, Ph.D., egyetemi adjunktus

Komplex vizsgabizottság elnöke: Dr. Vásárhelyi Barna, DSc., egyetemi tanár

Komplex vizsgabizottság tagjai: Dr. Tory Kálmán, Ph.D., egyetemi adjunktus  
Dr. Szabó László, Ph.D., osztályvezető főorvos

Budapest  
2018

## Tartalomjegyzék

<b>1</b>	<b>Rövidítések jegyzéke.....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Bevezetés .....</b>	<b>9</b>
2.1	Epidemiológia.....	11
2.2	Patomechanizmus .....	12
2.2.1	Nyálkahártya barrier károsodás .....	12
2.2.2	Genetika .....	15
2.2.3	Epigenetika .....	18
2.2.4	A TGF- $\beta$ szerepe a bélnyálkahártya gyulladásos folyamatában.....	25
2.3	Klinikum .....	26
2.3.1	Tünetek .....	26
2.3.2	Lefolyás.....	27
2.3.3	Klasszifikáció.....	27
2.3.4	Aktivitási index.....	28
2.4	Diagnosztika .....	30
2.4.1	Anamnézis és fizikális vizsgálat.....	30
2.4.2	Laboratóriumi vizsgálatok.....	31
2.4.3	Széklet vizsgálatok.....	32
2.4.4	Képalkotó vizsgálatok.....	33
2.4.5	Endoszkópia.....	34
2.4.6	Szövettan.....	35
2.5	Kezelés.....	37
<b>3</b>	<b>Célkitűzések.....</b>	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>Módszerek.....</b>	<b>40</b>
4.1	Betegek .....	40
4.2	In vitro modell.....	42
4.3	RNS izolálás.....	43
4.4	Reverz transzkripció és valós idejű polimeráz láncreakció .....	43
4.5	Statisztika.....	43

<b>5</b>	<b>Eredmények.....</b>	<b>45</b>
5.1	A miR-146a expressziója CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájában ...	45
5.2	A miR-155 expressziója CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájában .....	46
5.3	A miR-122 expressziója CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájában .....	47
5.4	A miR-146a, -155 és -122 expressziója rhTGF- $\beta$ -val kezelt vékonybél epitél sejtekben .....	48
5.5	A miR-146a, -155 és -122 expressziója rhTGF- $\beta$ -val kezelt duodenum fibroblasztokban.....	50
<b>6</b>	<b>Megbeszélés .....</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>Következtetések.....</b>	<b>67</b>
<b>8</b>	<b>Összefoglalás.....</b>	<b>68</b>
<b>9</b>	<b>Summary.....</b>	<b>69</b>
<b>10</b>	<b>Irodalomjegyzék.....</b>	<b>70</b>
<b>11</b>	<b>Saját publikációk jegyzéke.....</b>	<b>84</b>
11.1	A disszertációhoz kapcsolódó publikációk .....	84
11.2	A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk .....	84
11.3	Könyvfejezet .....	86
<b>12</b>	<b>Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>87</b>
<b>13</b>	<b>Ábrajegyzék.....</b>	<b>88</b>
<b>14</b>	<b>Táblázatjegyzék.....</b>	<b>89</b>

## 1 Rövidítések jegyzéke

5-ASA	5-aminoszalicilsav
6-MP	6-mercaptopurin
6-TGN	6-tioguanin
AIP	Alpha-induced protein
ALP	Alkalikus foszfatáz
anti-CBir1	Bakteriális flagellinek elleni antitest
anti-I2	Pseudomonas fluorescens bakteriális DNS fragmentje elleni antitest
anti-OmpC	Escherichia coli külső membránján található porin C transzporter fehérje elleni antitest
AP-1	Aktivátor protein 1
APC	Antigén prezentáló sejtek
API	Apoptózis inhibitor
ASCA	Saccharomyces cerevisiae elleni antitest
ATG16L1	Autofágiához kötött 16-szerű 1 gén
AZA	Azathioprin
BMI	Testtömegindex
CACO-2	Kaukázusi colon adenocarcinoma sejtvonal
CARD	Caspase recruitment domain-containing protein
CC	Kollagén colitis
CCL2	Chemokine C-C motif ligand 2
CCR	CC Chemokine receptor
CD	Crohn disease, Crohn-betegség, Crohn-beteg
CFU	Kolóniaformáló egység
CRC	Colorectalis carcinóma
CRP	C-reaktív protein
CXCL8	Chemokine C-X-C motif ligand 8
CXCR	C-X-C chemokine receptor
DBMT1	Deleted in malignant brain tumor 1
DNS	Dezoxiribo-nukleinsav
DOK3	Docking protein 3
ECCO	European Crohn's and Colitis Organization
EEN	Kizárólagos enterális táplálás
EGR2	Early growth response 2
EIM	Extraintesztinális manifesztáció
EoE	Eosinophil oesophagitis
ER	Endoplazmás retikulum
ERAP	Endoplazmás retikulum aminopeptidáz

ERK	Extracelluláris szignál regulált kináz
ESPGHAN	European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Európai Gyermekgasztroenterológiai, Hepatológiai és Táplálási Társaság
FADD	Fas-hoz kötődő halál ligand
FASLG	Fas ligand
FCGR2	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II-b
FF	Frissen fagyasztott
FFPE	Formalinban-fixált, paraffinba ágyazott
FOXP3	Forkhead box P3
FUT2	Fucosyltransferase 2
GAB	Kehelysejt elleni antitest
GALT	Bél-rendszer asszociált immunszövet
GF	Növekedési faktor
GI	Gasztrointesztinális
GGT	Gamma-glutamil transzferáz
GO	Gén ontológia
GPR	G Protein-Coupled Receptor
GTP	Guanin trifoszfát
GWAS	Teljes genom asszociációs vizsgálat
Hb	Hemoglobin
HLA	Humán leukocita antigén
HP	Helicobacter pylori
HR	Hisztopatológiai remisszió
HSP	Hősokk fehérje
HUPIR	Hungarian Pediatric Inflammatory Bowel Disease Registry
IBD	Inflammatory bowel disease, gyulladós bélbetegség
IC	Ileo-colonoscopia
ICAM-1	Intracelulláris adhéziós molekula 1
ICOSLG	Inducible T-Cell Costimulator Ligand
IFIH1	Interferon induced with helicase C domain 1
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon alpha/beta receptor
IFNGR	Interferon gamma receptor
IFX	Infliximab
I $\kappa$ B $\alpha$	NF- $\kappa$ B inhibitor alfa
IKK	NF- $\kappa$ B inhibitor kináz
IL	Interleukin
iNOS	Indukálható nitrogén-monoxid-szintáz
IP	Interacting protein

IPEX	Immundiszreguláció, poliendokrinopátia, X-hez kapcsolt
IRAK-1	IL-1 receptor asszociált kináz 1
IRGM	Immunitáshoz kötött guanozin trifoszfátáz M gén
IRS-1	Inzulin receptor szubsztrát-1
JAK-2	Janus-kináz-2
JNK	C-Jun N-terminális kináz
K-RAS	Kirsten patkány szarkóma
LACC1	Laccase Domain Containing 1
LC	Lymphocytás colitis
LGALS9	Galectin 9
LP	Lamina propria
LPS	Lipopoliszacharid
LRR	Leucin rich repeat
LTA	Lymphotoxin alpha
MALT1	Mukóza asszociált limfoid szövet limfóma transzlokációs protein 1
MAPK	Mitogén aktivált protein kináz
MHC	Major hisztokompatibilitási komplex
MIP-2 $\alpha$	Makrofág inhibitor peptid
miR	MikroRNS
MMP	Metil-merkaptopurin
MR	Mágneses rezonanciás vizsgálat
MRE	MR enterográfia
mRNS	MessengerRNS
MSI	Mikroszatellita instabilitás
MSS	Mikroszatellita stabil
MST1	Macrophage stimulating 1
MTX	Methotrexát
MUC19	Mucin 19
NF- $\kappa$ B	Nukleáris faktor kappa B
NFIL	Nukleáris faktor interleukin
NGS	Next-generation sequencing, új generációs szekvenálás
NIK	NF- $\kappa$ B-indukáló kináz
NKX2-3	NK2 homebox 3
NO	Nitrogén-monoxid
NOD	Nukleotid kötő oligomerizációs domén
NOS2	Nitrit oxid szintáz 2
NSAID	Nem szteroid gyulladáscsökkentő
OGD	Oesophago-gastro-duodenoscopia
ORMDL3	Orosomuroid like 3

PAB	Pancreas elleni antitest
PAMP	Patogén asszociált felszíni mintázat
p-ANCA	Atípusos perinukleáris anti-neutrofil citoplazmatikus antitest
PCDAI	Pediatric Crohn's Disease Activity Index
PI3K	Foszfoinozid 3-kináz
piRNS	Piwi-interacting RNS
PLZF	Promyelotic leukaemia zinc finger transzkripció faktor
PRDM1	Positive regulatory domain I-binding factor 1
PRKCB	Protein kináz C béta
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
PTGER4	Prostaglandin E Receptor
PTPN	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor
PUCA1	Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index
rasiRNS	Repeat-associated small interfering RNS
RASGRP1	RAS guanyl releasing protein 1
REL	Proto-onkogén c-Rel
Rho	Ras homológ gén család
RhTGF- $\beta$	Rekombináns humán transzformáló növekedési faktor- $\beta$
RIP	Receptor-kölcsönhatás protein
RNS	Ribonukleinsav
RORC	Retinoid-Related Orphan Receptor Gamma
rRNS	Riboszómális RNS
RSF	Receptor superfamily
RT-PCR	Valós idejű polimeráz láncreakció
SELE	E-szelektin
SEM	Standard Error of the Mean
SHH	Sonic hedgehog
SH2	Src homológ 2
SHIP1	Src homológ 2-t tartalmazó inozitol foszfatáz-1
siRNS	Kis interferáló RNS
SLC22A4	Solute carrier family 22, member 4
SMAD	Small body size (SMA) + Mothers against decapentaplegic homolog (MAD)
Smurf1	SMAD specifikus E3 ubiquitin ligáz
snoRNS	Kis magvacska RNS
SNP	Egy pontos nukleotid polimorfizmus
SOCS-1	Citokin szignál szupresszor-1
STAT	Szignál transzducer és aktivátor transzkripció faktor
TAB	TAK1 kötő fehérje

TAGAP	T-Cell Activation RhoGTPase Activating Protein
TAK1	Transzformáló növekedési faktor $\beta$ aktivált kináz-1
Tfh	Folikuláris T helper sejtek
Th	T helper sejtek
THP-1	Tohoku Hospital Pediatrics-1 humán akut monocyta leukémia sejtvonala
TGF- $\beta$	Transzformáló növekedési faktor- $\beta$
TGF- $\beta$ R	Transzformáló növekedési faktor- $\beta$ receptor
TLR	Toll-like receptor
TNF- $\alpha$	Tumor nekrosis faktor- $\alpha$
TNFSF	Tumor nekrosis faktor- $\alpha$ szupercsalád
TPMT	Tiopurin metiltranszferáz
TRADD	TNF halál ligand
TRAF	TNF receptor asszociált faktor
Treg	Regulátoros T-sejt
tRNS	Transzfer RNS
TYK	Tirozin kináz
TVK	Teljes vaskötő kapacitás
UC	Colitis ulcerosa
UTR	Untranslated region
VAMP	Vezikula asszociált membrán protein
VEO-IBD	Very early onset IBD
VDR	Vitamin D receptor
We	Vörösvértest süllyedés
wPCDAI	Súlyozott PCDAI
XIAP	X-hez kapcsolt inhibitora az apoptózis proteinnek



## 2 Bevezetés

A gyermekkori Crohn-betegség (CD) a gyulladós bélbetegségek (IBD) csoportjába tartozó, krónikus, akár a teljes tápcsatornát érintő, változó lefolyású, **immunmediált** gyulladós kórkép. A betegségcsoportba a CD-n kívül két kórkép sorolható, a colitis ulcerosa (UC) és a konvencionális diagnosztikával egyértelműen be nem sorolható „IBD unclassified” (IBD-U).<sup>1</sup> Az IBD jelenlegi legnagyobb kihívása, hogy az elmúlt évtizedben incidenciája és prevalenciája szélsőséges, korábban nem látott mértékben emelkedik, mind a felnőtt, mind a gyermek populációban.<sup>2</sup> Az IBD multifaktoriális megbetegedés, melynek pontos etiológiája egyelőre ismeretlen. Jelenlegi elképzelések szerint genetikailag fogékony egyéneknél különböző környezeti tényezők (amelyek közül a kóros táplálék szerepe kiemelkedő) epigenetikai úton az intesztinális mukóza immunrendszerének kóros aktiválódását okozva vezetnek a gyulladós folyamat elindulásához.<sup>3,4,5</sup> Az életkori eltéréseket figyelembe véve, gyermekkori IBD-ben a környezeti behatásnál a genetikai predispozíció kiemelkedőbb szerepet tölt be etiológiai tényezőként. A betegség a krónikus kórképeknek megfelelően folyamatos kezelést, gondozást igényel. Mivel jelen tudásunk szerint – a pontos etiológiai tényező hiányában – végleges gyógyulás nem érhető el, a gondozó orvos célja a folyamatos, mély remisszió állapotának elérése. Azonban a betegség természetes lefolyása szerint hullámzó, a tünetmentes periódusokat visszaesések, relapszusok szakítják meg. Szemben a felnőttkori formával, a gyermekkori kezdetű CD már a diagnózis felállításkor gyakrabban kiterjedt, lefolyását tekintve **agresszívebb**, hamarabb igényelik a betegek az immunmoduláns kezelés bevezetését. A komplikált betegség fenotípus kialakulása a felnőtt populációval azonos, azonban a korai megjelenés miatti időfaktort is figyelembe véve, gyermekkori CD esetén fiatal felnőttkorra nagyobb a műtéti beavatkozás esélye. Növeli a megfelelő és effektív terápia igényét a populációra jellemző gyors szomatikus és mentális fejlődés, amely fokozza a betegek vulnerabilitását, a növekedésbeli elmaradás, csontfejlődési zavar, kései pubertás, valamint a pszichés stressz kialakulásának esélyét.<sup>6</sup>

A betegség diagnózisa esetenként azonban továbbra is jelentős kihívást jelent.<sup>7</sup> Az elmúlt években egyre inkább előtérbe került az igény noninvaszív vizsgálati módszerek

bevezetésére, amelyekkel gyorsabban, kíméletesen és költséghatékonyan lehetne a betegség diagnózisát felállítani, valamint a kórfolyamatot követni.<sup>7</sup>

A klasszikus vérkémiai vizsgálatokon túl az elmúlt években a mindennapi rutin részévé váltak a különböző antitest vizsgálatok. Azonban ezen markerek szenzitivitása és specificitása önmagában nem alkalmas a diagnózis felállítására, és a pontos differenciáldiagnózishoz.

A 2000-es évek végétől ugrásszerűen megnőtt azon közlemények száma, amelyek a ribonukleinsavak (RNS) egy genetikai információt nem kódoló csoportjának, a **mikroRNS**-ek (miR) inflammációban és egyéb patofiziológiai folyamatokban betöltött szerepével foglalkoznak.<sup>8</sup> A miR-ek evolúciósan jól konzerváltak és a genom transzkripciós folyamatainak nagy részét befolyásolják, ezzel számos krónikus, több szervrendszert érintő, illetve autoimmun gyulladós kórkép és malignus betegség patomechanizmusában szerepet játszanak. A miR-ek nemcsak az érintett szövetből, hanem egyéb testnedvekből is kimutathatóak. A keringő miR-ek szérumból történő detektálása ígéretes új diagnosztikus módszer kifejlesztésének lehetőségét veti fel.<sup>5</sup>

Az elmúlt évek kutatási adatai alapján munkacsoportunk olyan, az IBD patomechanizmusában releváns miR-eket választott ki a gyulladós folyamatban betöltött szerepük tisztázására, amelyek később potenciális diagnosztikus markerként, illetve terápiás targetként szolgálhatnak.

## 2.1 Epidemiológia

Az IBD incidenciája gyermek- és felnőttkorban is világszerte fokozatosan **növekszik**. Mint az a gyermekkorban induló krónikus betegségekre, az IBD-re is igaz, hogy a felnőttgyógyászat számára is új problémát jelentenek a tinédzserkorból kinövő, estenként már évek óta immunmoduláns és biológiai terápiában részesülő, a jelenleg elérhető csúcsterápia alatt álló fiatal felnőttek, akiknél várhatóan rövid időn belül állapotromlás vagy komplikált CD alakul ki.

A jelenlegi nemzetközi adatok alapján a gyermekkori CD előfordulása 2,5-11,4/100000, a becsült prevalenciája 58/100000. A gyermek betegek a felnőttkorban diagnosztizáltak 15-25%-át teszik ki.<sup>9</sup> Mivel a gyermekkori CD patogenezisében a genetikai komponens dominánsabb hatású, a családon belüli halmozódás nagyobb eséllyel fordul elő, mint a felnőttkori kezdetű betegségben.<sup>6</sup>

A nemzetközi multicentrikus adatgyűjtések beszámolóin túl hazai epidemiológiai adatok is rendelkezésre állnak. Felnőttkori IBD-re vonatkozóan 1963 óta ismertek retrospektív adatok.<sup>10,11</sup>

A legfontosabb hazai epidemiológia adatokat a hazánkban 2007. január 1-e óta működő Hungarian Pediatric Inflammatory Bowel Disease Registrynek (**HUPIR**) köszönhetjük. Ezen nemzetközi szinten is egyedülálló, prospektív vizsgálatban 27 magyarországi gyermek-gasztroenterológiai központ vesz részt, nemcsak a 18 év alatti, frissen diagnosztizált IBD-s betegek részletes dokumentálásával, de ezen betegek rendszeres utánkövetésével is. A HUPIR-ban regisztrált 420 beteg adatai alapján az IBD átlagos incidenciája hazánkban 2007. január 1. és 2009. december 31. között 7,48/100000 gyermek, a gyermekkori CD gyakorisága 4,72/100000 fő, fiú dominanciával.<sup>2</sup> A még nem publikált elmúlt évek eredményei azonban ennél is gyakoribb előfordulást mutatnak, 2014-ben 5,3, 2016-ban 6,5/100000 fő volt az incidencia. Ezen eredmények alapján Magyarország a magasabb gyermekkori CD incidenciájú országok közé sorolható.

## 2.2 Patomechanizmus

A CD a jelen ismeretek szerint a GI traktus bármely részét érintő krónikus gyulladása, amely kialakulásában a **kóros táplálék** kulcsfontosságú. Az ételeinkben egyre nagyobb mennyiségben megjelenő tartósítószer, adalékanyagok, valamint a túlzott cukor- és zsírbevitel elhagyásának terápiás konzekvenciája van, megfelelő táplálásterápiával remisszió érhető el. A patomechanizmusban genetikai hajlam, a bél mikrobiomjának megváltozása és egyéb környezeti tényezők (anyatejes táplálás hiánya, 2 év alatti életkorban adott antibiotikum) káros hatása is szerepet játszik. Ezen befolyásoló tényezők az immunrendszer kóros aktiválódásához vezetnek, amelyek kontrollálatlan immunmediált gyulladást eredményeznek.<sup>12</sup> Az IBD patomechanizmusában szerepet játszó főbb tényezőket a 2. ábrán foglaltam össze.

### 2.2.1 Nyálkahártya barrier károsodás

Az ép bélnyálkahártya egy olyan féligáteresztő membrán, amely élettani feladata a védelem a patogén kórokozóktól, ugyanakkor a létfontosságú tápanyagok felszívása a bél lumenéből. Azonban a mukóza nem tekinthető pusztán fizikai barriernek, hanem egy olyan dinamikus rendszernek, amely a normál mikrobiom és az immunrendszer között kapcsolatot alakít ki, és ennek megfelelően folyamatos változás alatt áll. Minden olyan hatás, amely károsítja az epitélium és az immunrendszer közötti megfelelő szignál transzdukciós, kommunikációs útvonalakat **immun diszfunkcióhoz** vezet, amely hozzájárul az IBD kialakulásához.

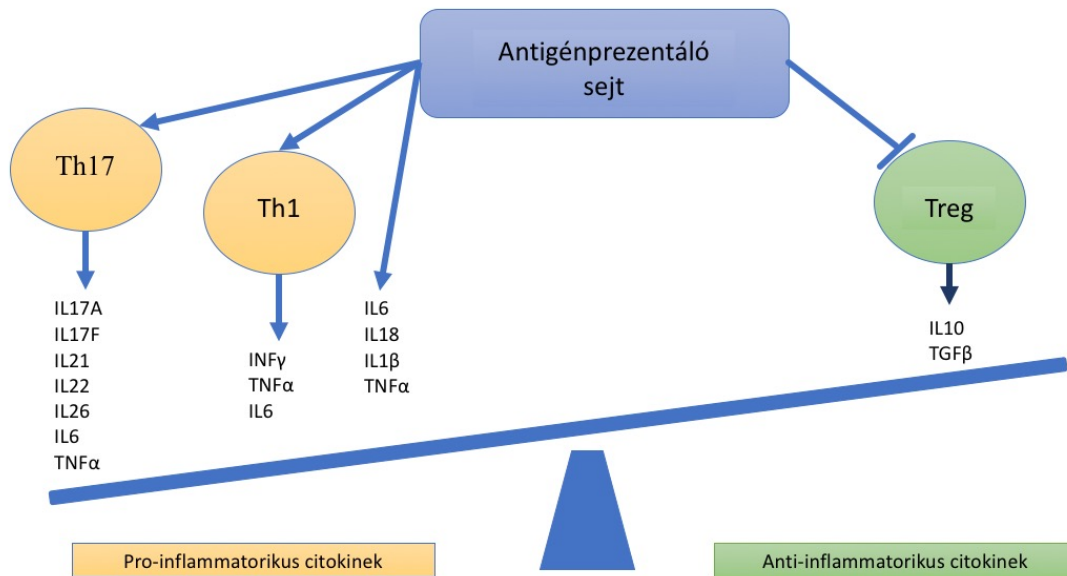
A barrier károsodás a nyálkahártya főbb alkotórészeit érinti. Csökken a kehelysejtek száma, a defenzin termelés, a nyákfilm vastagsága és összetétele. A kialakult diszbiózis önmaga is növeli a bélnyálkahártya permeabilitását, ezáltal az immunrendszer kóros aktiválódását.<sup>12</sup>

Az IBD etiológiájának kutatása során számos környezeti tényező hatása merült fel oki tényezőként. Az élet első hónapjaiban számos olyan tényező éri az újszülöttet és csecsemőt, amely a későbbi életkorban kialakuló krónikus betegségek prediktív faktora lehet. A megfelelő mikrobiológiai kolonizáció, a születés módja (per vias naturales), illetve az anyatejes táplálás a legtöbb vizsgálatban protektív tényezőként szerepel.<sup>13</sup> A

dohányzás, amely gyermekkorban elsősorban a passzív ártalom elszívését jelenti, valamint a gyorséttermi ételek gyakori fogyasztása is hajlamosító tényezőként szerepel.<sup>14</sup>

Jelentős környezeti tényező az elfogyasztott étellel a bél lumenébe kerülő káros anyagok köre. A ún. nyugati diéta a magas kalória, zsír, cukor, és alacsony rosttartalom mellett számos olyan adalékanyagot tartalmaz, amely az ipari feldolgozás során kerül ételünkbe. Ilyen adalék a széles körben használt **karragének** csoportja, amely tengeri hínárból előállított kéntartalmú poliszacharid, E407 kódnéven használt zselésítő és sűrítő célra használt anyag. A karragén a „deleted in malignant brain tumor” (DMBT)1 glikoproteinhez kapcsolódva, annak baktérium kötő képességét gátolva károsítja a barrier funkciót.<sup>15</sup> A szintén széles körben használt karboximetilcellulóz csökkenti a nyákfilm vastagságát, valamint hatással van a mikrobiom összetételére is.<sup>15</sup> A nátrium kaprát és az acetilszalicilsav a „tight junction” direkt károsításával fokozzák az intesztinális permeabilitást.<sup>12</sup> Alacsony koncentrációjú karboximetilcellulóz és poliszorbát-80 egerekben alacsony aktivitású gyulladást, ezáltal metabolikus szindróma, illetve fogékony egyedekben colitis kialakulásához vezetett.<sup>16</sup>

A **diszbiózis** a „hasznos”-nak vélt baktériumok számának csökkenését és a „hátrányos”-ak elszaporodását jelenti. CD és UC betegek biopsziás mintáiban csökkent a „hasznos”, anti-inflammatorikus *Firmicutes* és *Bacteroidetes* baktériumok száma, míg a pro-inflammatorikus hatású *Proteobacteria* és *Actinobacteria*, valamint a szulfát-redukáló fajok (pl. *E.coli*) száma emelkedett. A mikrobiom egyensúlyának felborulása a fermentáció csökkenéséhez, ezzel az anti-inflammatorikus hatású rövid szénláncú zsírsavak (pl. butirát) alacsony intraluminális mennyiségéhez vezet, amely gátolt epitéliális „tight junction” protein expresszióhoz, ezáltal fokozott permeabilitáshoz vezet. A károsodott barrieren keresztül lehetővé válik a bakteriális **transzlokáció**, amelyet elősegít a csökkent szekretált immunglobulin (Ig)A és defenzin mennyisége. A lamina propriát (LP-t) elérő kórokozók eliminálása a károsodott fagocita funkciójú makrofágok miatt nem megfelelő, emiatt túlzott toll-like receptor (TLR) aktiváció következik be. A veleszületett immunrendszer T-sejtjeinek aktiválódása pro-inflammatorikus citokinek termelődését indítja el (1. ábra).<sup>17</sup>

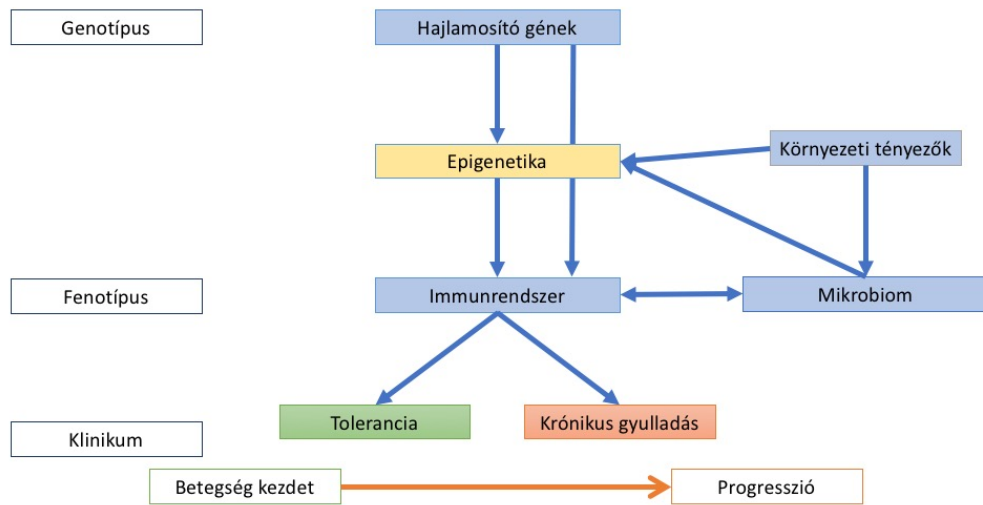


**1. ábra. A jelentősebb pro- és anti-inflammatorikus citokinek az IBD patomechanizmusában.**

*Az IBD patomechanizmusában az immunrendszer kóros aktiválódása következtében a pro-inflammatorikus citokinek termelése válik kifejezettebbé, így az egyensúly a gyulladós folyamatok felerősödése felé billen.<sup>18</sup> (IL – interleukin, INF – interferon, TNF – tumor nekrosis faktor, TGF – transzformáló növekedési faktor, Th – helper T-sejt, Treg – regulátoros T-sejt)*

A gyulladós folyamat ellensúlyozásában a **regulátoros** T-sejtek (Treg) játszanak szerepet anti-inflammatorikus interleukin (IL)-10 és transzformáló növekedési faktor (TGF) citokinek termelésével. A TGF- $\beta$  gátolja az effektor T-sejtek és makrofágok aktivációját és funkcióját, szabályozza a regulátoros „forkhead box P” (FOXP)3 pozitív és Thelper (Th)-17 sejtek perifériás differenciációját, valamint a kemotaxis befolyásolásával a gyulladós válaszban részt vevő sejteket gátolja. Ezentúl az egyik legfontosabb tényező a kollagén termelés stimulálásában, a fibrózis kialakulásában, a mezenchimális és epiteliális sejtek indukálásában, ezáltal a nyálkahártya léziók és fekélyek gyógyulásában.<sup>19,20</sup>

Mindezek mellett azonban a gyermekkori CD esetében a betegség kialakulásáig eltelt relatíve rövidebb idő miatt a környezeti tényezők káros behatásaival szemben nagyobb szerepet játszik a genetikai háttér és az azt befolyásoló **epigenetikai** tényezők.

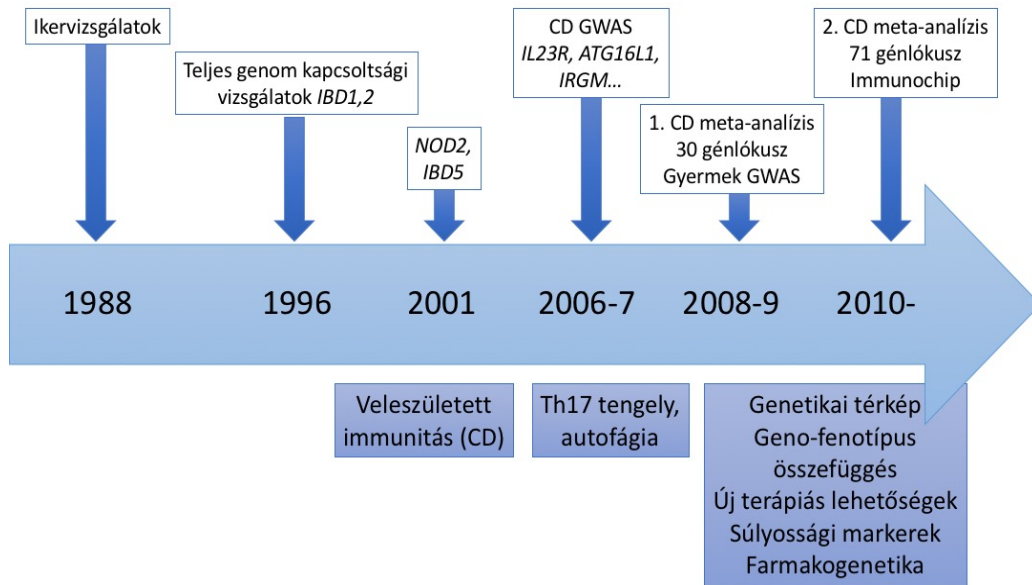


**2. ábra. Az IBD patomechanizmusa jelen elképzelések szerint, sematikusán ábrázolva.<sup>21</sup>**

### 2.2.2 Genetika

Az IBD patogenezisének genetikai hátterének tisztázásában jelentős előrelépések történtek amióta 1988-ban az első ikervizsgálatok publikálásra kerültek.

Az 3. ábrán szereplő genetikai idővonalon látható a genetikai ismeretek fejlődése a CD tekintetében.



### 3. ábra. Az elmúlt közel 30 év kutatási mérföldkövei a CD genetikájában.

GWAS: Genome-wide association studies, teljes genom vizsgálatok. Forrás: International Inflammatory Bowel Disease Genetics Consortium (IIBDGC), <https://www.ibdgenetics.org>.

Jelenleg 163 hajlamosító **génlókus** ismert az IBD patogenezisében. Ezek közül azonban a vártnál kevesebb, a CD-re 30, az UC-re 23 darab specifikus és 110 lókus közös mindkét betegségben.

Az UC-val szemben a CD esetében kifejezettebb a genetikai komponens jelentősége. Eddig 30 CD specifikus génlókus igazolódott, és az elmúlt évek eredményei egyöntetűen igazolják a veleszületett immunrendszer és mikrobiom interakciójának, valamint az **autofágia**, az intracelluláris baktérium feldolgozás jelentőségét. A nukleotid kötő oligomerizációs domén (NOD)2 szerepe egyértelműen igazolódott az autofágiában, és a CD patogenezisében játszott szerepe egész genom szinten többszörösen bizonyítást nyert.<sup>22</sup> A dohányzás, a CD kialakulására erős hajlamosító tényező, a NOD2 befolyásolásával játszhat szerepet a betegség kialakulásában.<sup>23</sup> Az autofágia kapcsolt protein (ATG)16L1 génterméke a NOD2 közreműködésével a sejtmembránba épülve indítja el a baktériumok autofagocitózisát. A NOD2 mellett az immunitáshoz kötött guanozin trifoszfátáz M (IRGM) génnek is jelentős szerepe van az autofagocitózis során bekövetkező bakteriális eliminációban („killing” mechanizmusban). Az *IRGM*-ben bekövetkező bizonyos nukleotid polimorfizmus („single nucleotide polymorphism”, SNP) protektív hatással rendelkezik *Mycobacterium tuberculosis* infekcióval szemben.<sup>24</sup>

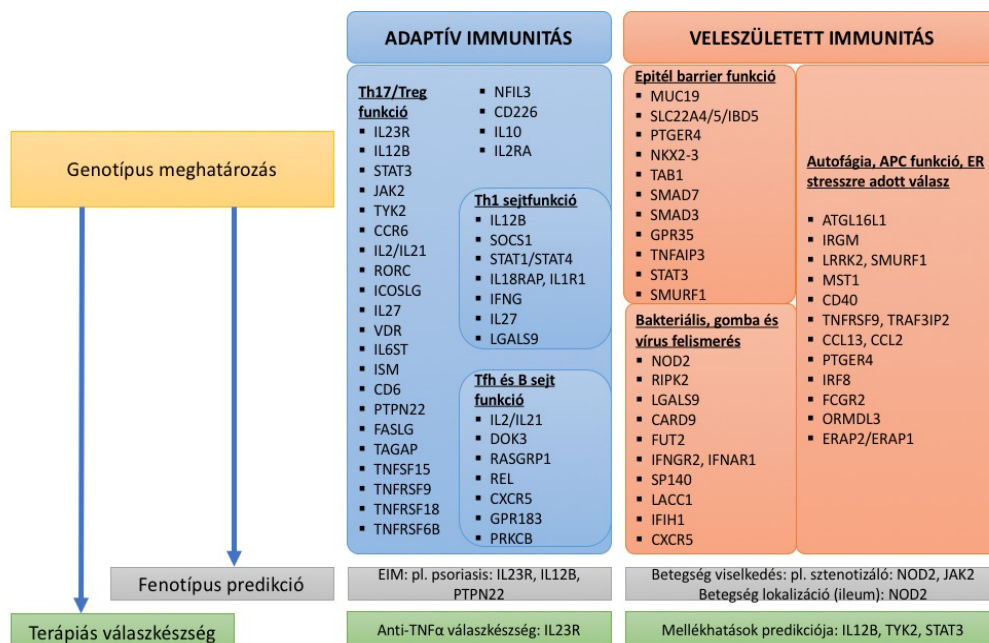


Az ImmunoChip vizsgálatok számos közös lókuszt igazoltak IBD és komplex *Mycobacterium* betegségek között. Leprózissal 7 CD gén, mycobacteriosissal 6 IBD gén azonos, azonban vannak ellentétes hatású lókuszek is.<sup>25</sup> A *Mycobacterium* kiváltotta válaszban szerepet játszó gének között megtalálható az CD asszociált CARD9 és „lymphotoxin alpha” (LTA), az immunrendszer működése szempontjából fontos, és a CD-re specifikus gének között pedig a „protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22” (PTPN)22, interleukin (IL)-2RA, IL-27, tumor nekrosis faktor (TNF) szupercsalád (SF)11, és vezikula asszociált membrán protein (VAMP)3.<sup>21</sup>

A T-helper(Th)-17 és interleukin (IL)-12/IL-23 útvonal szerepe az IBD patogenezisében jól ismert, az IL-23R, IL-12B, Janus-kináz (JAK)2, és szignál transzducer és aktivátor transzkripció faktor (STAT)3 gének igazolt fogékonysági lókuszaival.<sup>26,18</sup> Az IL12B gén mutációi az IBD-n kívül egyéb autoimmun betegségek etiológiájában is szerepet játszanak, mivel mind az IL-12, mind az IL-23 p40 alegységét kódolja. Egyéb, az immunrendszer szabályozásában fontos gének közé tartoznak a „caspase recruitment domain-containing protein” CARD9, IL1R2, proto-onkogén c-Rel (REL), small body size: SMA + mothers against decapentaplegic homolog: MAD (SMAD)3, és „positive regulatory domain I-binding factor” (PRDM)1. Figyelemkeltő, hogy a CD patogenezisében ismert NOD2 és PTPN22 mutációi protektív szerepet játszanak az UC szempontjából. Sajnos az elmúlt évtizedek intenzív genetikai kutatásai sem a diagnosztikában sem a terápiában átütő eredménnyel eddig nem jártak.

Létezik azonban egy, a CD-re klinikai megjelenését tekintve hasonló betegség, amely azonban nem tartozik az IBD alcsoportok közé. A „very early onset-IBD” (VEO-IBD) a **monogénes** kórképek csoportja, melyek valójában *nem* tartoznak az IBD-hez, hiszen itt minden esetben igazolható az adott gén (pl. Interleukin-10 receptor (IL10R)-, immundiszreguláció, poliendokrinopátia, X-hez kapcsolt (IPEX), mukóza asszociált limfoid szövet limfóma transzlokációs protein (MALT)1, X-hez kapcsolt inhibitora az apoptózis proteinnek (XIAP) stb.) mutációja. Vagyis itt nem hajlamosító, hanem oki mutációk állnak a kórkép kialakulásának hátterében.<sup>21</sup>

Az IBD pathogenezisében szerepet játszó ismert géneket a betegség progressziójában játszott szerepük, valamint az immunrendszerben elfoglalt helyük alapján a 4. ábrán foglaltam össze.



**4. ábra. Az IBD patogenezisében szerepet játszó ismert génlokuszok a betegség progressiójában játszott szerepük, valamint az immunrendszerben elfoglalt helyük alapján.**

*EIM – extraintesztinális manifesztáció, ill. lásd a rövidítésjegyzékben.*<sup>27</sup>

### 2.2.3 Epigenetika

A genetikai háttér és a megvalósult fenotípusos jegyek között helyezkedik el a környezeti tényezők által befolyásolható epigenetika. Ennek a szabályozó hatásnak köszönhetően nélkül nő a genom sokféleséget létrehozó képessége, hogy az örökítőanyag nukleotid szekvenciája megváltozna. A legismertebb példa az Agouti-gén metilációs vizsgálata, melyben a genetikusan identikus egerek az anyai étrendtől függően különböző fenotípusúak lesznek.<sup>28</sup> **Négy** fő epigenetikai mechanizmus létezik: a hiszton modifikáció, a dezoxiribonukleinsav (DNS) metiláció, az autoreguláció és a nem kódoló ribonukleinsav(RNS)-ak. Ez utóbbiak a fehérje expresszió szabályozásában vesznek részt, csoportosításuk a méretük és betöltött funkciójuk szerint történik. A transzkriptumok hossza szerint két fő csoportba, a 200 nukleotidnál rövidebb rövid-, és a 200 nukleotidnál hosszabb hosszú nem-kódoló RNS-ekre oszthatjuk őket. Ezen belül különbséget tehetünk a funkciójuk szerint is. A transzfer (t)RNS, riboszómális (r)RNS, kis sejtmagi (sn)RNS, és kis magvacska (sno)RNS a „háztartási”, a kis interferáló (si)RNS, és a **mikroRNS** (miR) pedig a „szabályzó” csoportba sorolható. Jelenleg kb. 10 000 rövid, és 15 000 hosszú, nem-kódoló RNS-t ismerünk, mely a teljes genom (kb.

60 500 gén) csaknem 40%-át teszi ki.<sup>29,30</sup> A továbbiakban csak a jelen dolgozat témája szempontjából releváns miR-ekkel foglalkozom.

### 2.2.3.1 MikroRNS-ek

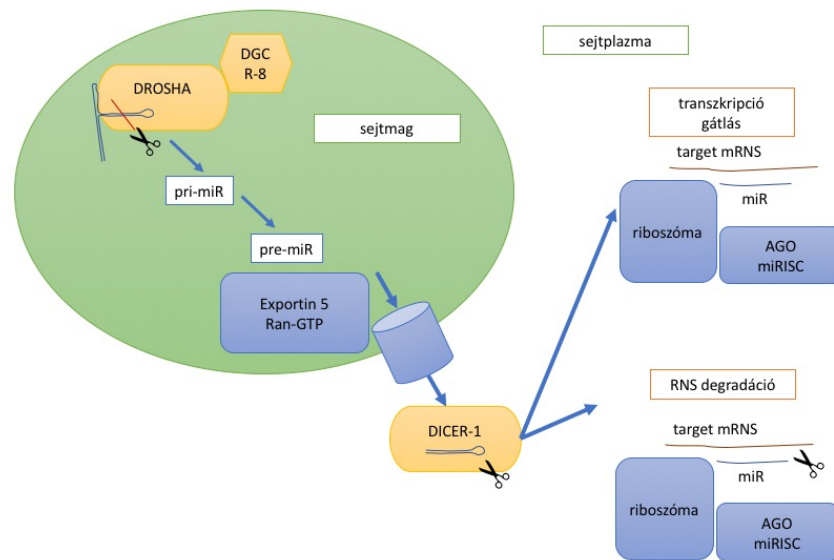
A 2000-es évek végétől ugrásszerűen megnőtt azon közlemények száma, amelyek az RNS-ek egy genetikai információt nem kódoló csoportjának, a miR-ek inflammációban és egyéb patofiziológiai folyamatokban betöltött szerepével foglalkoznak.<sup>8</sup>

A miR-ek rövid, mindösszesen 18-24 nukleotid hosszú, endogén, egyszálú RNS-ek, amelyek evolúciósan jól konzerváltak. Működésük alapja, hogy a target messenger-RNS (mRNS) 3'-„untranslated region” (UTR) végéhez kapcsolódva annak degradációját okozzák, vagy a genetikai információ transzlációját akadályozzák meg. Az első miR-t 1993-ban írták le, a lin-4-et a *Caenorabditis elegans* nematodából izolálták. Azóta több ezer miR gént írtak le növények és állatok genomjában. Minden egyes miR több száz mRNS-t tud gátolni, ugyanakkor egy mRNS több miR-nek is lehet a célpontja. Ezek alapján az humán genom transzkripció folyamatainak **több mint fele** miR-ek befolyásolása alatt áll. Így ezen reguláció szerepet játszik a biológiai folyamatok nagy részének (differenciálódás, proliferáció, apoptózis, stressz- és immunválasz) szabályozásában, és elengedhetetlenül fontos a megfelelő szöveti homeosztázis és fejlődés fenntartásában. A szabályozás zavara számos kórkép, köztük neurológiai- (Parkinson-, Alzheimer-kór), kardiológiai-, krónikus vese-, máj- és hasnyálmirigy-, gasztrointesztinális- (az epiteliális barrier funkciózavara, infekciók, IBD), autoimmun-, valamint malignus betegségek kialakulásához vezet.<sup>31,32</sup>

#### 2.2.3.1.1 Bioszintézis

A miR-ek bioszintézisének és regulációjának folyamata az utóbbi években vált ismertté. A genetikai információ transzkripcióját a DNS-ről az RNS-polimeráz-II végzi, első lépésben pri-miR-eket képezve. Ezeket azután egy multiprotein komplex alakítja tovább, amelynek két legfontosabb tagja a Drosha és a DiGeorge Syndrome critical region 8 (DGCR8), amely során egy 70–100 bázispár hosszú pre-miR keletkezik. Ezen

prekurzor miR transzportját a nukleusból a citoplazmába az Exportin-5 Ran-GTP dependens transzport fehérje végzi. A miR ekkor még kétszálú, a végleges hosszúságára a DICER endonukleáz rövidíti le. A két szál szétválása után az érett miR a target RNS-hez szállítódik (RNA-induced silencing complex – RISC), kifejtve hatását a géneexpresszióra. A másik szál lebomlik. A miR a cél-mRNS 5'-végénél található rövid, 2-8 nukleotidok által alkotott, „mag”-szekvenciákkal komplementer, ezek megléte alapján válik lehetségessé az interakció.<sup>32</sup> A bioszintézis lépéseit az 5. ábrán vázoltam.



### 5. ábra. A mikroRNS bioszintézinek menete

*DGCR8: DiGeorge Syndrome critical region 8, pri-miR: primer mikroRNS, pre-miR: prekursor mikroRNS, Ran GTP: premi-R guanozin-trifoszfát kötő része, Ago: Argonauta család, RISC: RNA induced silencing complex*<sup>33</sup>

#### 2.2.3.2 MikroRNS-ek az immunrendszerben

A miR-ek alapvető fontosságúak a veleszületett és szerzett immunrendszer fejlődése és működése szempontjából. Úgy tűnik, hogy az IBD pathomechanizmusában a **veleszületett** immunrendszer fontosabb szerepet tölt be, mint a szerzett.<sup>34</sup> Ez sajnos azért aggályos jelenleg, mert a fő terápiás arzenál a szerzett immunrendszer kóros aktiválásának gátlásán alapul, pl. adalimumab/infliximab TNF-alfa gátlása.

### 2.2.3.2.1 MikroRNS-ek szerepe a veleszületett immunitásban

A veleszületett immunrendszer a szervezet elsővonalbeli védelmi funkciója, amely felismeri és eliminálja az infektív mikrobiológiai ágenseket. A felismerő mechanizmus a kórokozók jól definiált részeihez, a patogén-asszociált felszíni molekuláris mintázatokhoz (**PAMP**) kötődik. Mikrobiális invázió esetén a veleszületett immunrendszer jól konzervált mintázat felismerő receptorait a PAMP aktiválja. A makrofágok és dendritikus sejtek toll-like receptorai (TLR) a legjobban ismert patogén felismerő rendszert képezik. A TLR két doménből áll. A PAMP felismeréséért felelős, leucinban gazdag (1-es típusú membrán protein, LRR: „leucin rich repeat”) extracelluláris, valamint a citoplazmatikus Toll/IL-1R doménekből. Ez utóbbi teszi lehetővé a további szignáltranszdukciós folyamat létrejöttét, többek között a kiemelkedő fontosságú nukleáris faktor kappa B (NF- $\kappa$ B) jelátviteli úton keresztül. Így válik kiemelt fontosságúvá a gyulladás pathomechanizmusában a TLR-en keresztüli NF- $\kappa$ B aktiváció.<sup>35</sup>

Jelenleg számos különböző TLR-t (TLR1-13) különböztetünk meg a mintázat felismerési tulajdonságuk alapján. A TLR1/2 és TLR2/6 lipopeptid, a TLR5 flagellin, a TLR3,7,9 nukleinsav kötésre képes. A TLR4-et számos PAMP tudja aktiválni, de a legfontosabb közülük a Gram-negatív baktériumok alapvető sejtfal alkotó **lipopoliszacharidja** (LPS). LPS jelenlétére az NF- $\kappa$ B jelátviteli úton keresztül szisztémás pro-és anti-inflammatorikus citokin produkció veszi kezdetét. A termelődő TNF- $\alpha$ , IL-6, és IL-10 elsődleges célja a kórokozók szaporodásának gátlása és eliminálása, majd az immunrendszer további működésének adekvát korlátozása.<sup>36</sup> Azonban, ha az NF- $\kappa$ B reguláló mechanizmusa károsodik, az immunfolyamat is diszregulálódik, amely szepszis, többszervi elégtelenség, autoimmun kórkép és malignus betegségek kialakulásához vezethet.<sup>37,35</sup>

Az első tanulmány, amely az LPS indukálta TLR aktiváció miR expresszióra kifejtett hatását vizsgálta, a kutatásban szereplő 200 miR-ből a miR-146a, -155, és -132 esetében igazolta az endotoxin szenzitivitást.<sup>38</sup>

A miR-ek hatása ezen folyamatokra legjobban a miR-146a funkcióján keresztül ismert. A miR-146a expresszióját a TLR ligand LPS, peptidoglikán és flagellin indukálja, elindítva az NF- $\kappa$ B jelátviteli utat, mely végül IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$  termeléshez vezet.

A miR-146a/b, -132 és -155 expressziója LPS stimulált humán akut monocytá leukémia, Tohoku Hospital Pediatrics (THP)-1 sejtekben fokozódik. Az LPS hatása dózisdependens a miR-146a expresszióra. Ezen túlmenően jelentős szerepe van az endotoxin tolerancia kialakulásában, tekintettel arra, hogy a tumor nekrosis faktor receptor asszociált faktor (TRAF)-6 és az IL-1 receptor asszociált kináz (IRAK)-1 expresszióját csökkenti, ezzel negatív „feedback” hatással van az extenzív gyulladásos folyamatra.<sup>39</sup> Hasonló hatás érhető el miR-146a-val kezelt bakteriális lipoprotein jelenlétének kitett sejteken.<sup>35</sup>

Ezen túlmenően az IRAK-1 és TRAF-6 expresszióját nem csak TLR4, hanem TLR2, TLR5, TLR7, TLR8, és TLR9, valamint az IL-1 $\beta$  receptor aktivációja is befolyásolja.<sup>40</sup>

Egér makrofág vizsgálat során az LPS-en kívül az interferon (IFN)- $\beta$  és számos TLR ligand is a miR-155 expressziójának emelkedéséhez vezetett.<sup>41</sup> A veleszületett immunrendszer működése során a miR-155 a citokin szignál szuppresszor („suppressor of cytokine signalling”: SOCS)-1-en keresztül befolyásolja a **dendritikus** sejtek antigén prezentáló kapacitását. A miR-155 deficiens dendritikus sejtek csökkent mértékben képesek az antigén prezentációra, és T-sejt aktivációra, ezzel gyengítve a gyulladásos immunválasz kialakulását. A miR-155 felülexpressziója állatmodellben (egér csontvelő) LPS stimulációhoz hasonlóan mieloproliferációhoz vezet. A SOCS-1-hez hasonló Src homológ (SH)2-t tartalmazó inozitol foszfatáz(SHIP)-1 gátlásán keresztül szintén a TLR4 jelátviteli útvonalat gátolja.

Míg a miR-155 és -146a expressziója fokozódik LPS stimuláció után a makrofágokban, addig a miR-125b-é csökken, amely a gyulladásos folyamat erősödésének irányában hat, mivel a miR-125b a TNF- $\alpha$  mRNS-hez kötődve annak negatív regulátora. Ezen felül a makrofágok fertőzésekre adott válaszkor számos miR szintje megemelkedik, legfontosabbak a miR-21, -147 és -9. Utóbbi funkciója az NF- $\kappa$ B 1-es alegységének (NFKB1) gátlása, ezzel állandó szinten tartva az NF- $\kappa$ B fehérje termelését a monocyták és neutrophil granulocyták TLR4 mediálta aktivációja során.<sup>32</sup>

A baktérium felismerő NOD2 a miR-29 és -122 targetjei közé tartozik. A miR-122 kapcsolódva a NOD2-höz csökkenti az LPS indukált apoptózist humán colon epitél (HT-29) sejtekben. A miR-122-vel előkezelt, majd LPS-el stimulált HT-29 sejtekben a NOD2

indukált NF- $\kappa$ B jelátviteli út gátlódik, ezáltal csökken a pro-inflammatorikus TNF- $\alpha$  és IFN- $\gamma$ , valamint emelkedik az anti-inflammatorikus IL-4, és -10 citokinek expressziója.<sup>42</sup>

#### 2.2.3.2.2 MikroRNS-ek szerepe a szerzett immunitásban

A miR-eknek jelentős szabályozó szerepük van a **szerzett immunitás**, a B- és T-sejtek érésében, aktiválódásában és működésében is.

A miR-15b, -16, -21, -24, -30c, -106b, -142-3p, -142-5p, -150, -155, -181, -223, -342, -451, let-7 expressziója magasabb a B- és T-sejtekben az immunrendszer egyéb alkotóihoz képest.<sup>43,44</sup>

A miR-326 *in vitro* és *in vivo* is a Th17 sejt differenciálódásának szabályozója.<sup>45</sup>

Több miR, köztük a miR-17-92 csoport a folliculáris T helper sejtek specializációjában játszik szerepet. Ezen T-sejtek a germinális centrum B sejtjeit látják el a megfelelő jelzésekkel a hosszú életű antitestválaszok kiváltása során.

A miR-155 szerepet játszik a T- és B-sejtek érésében is. A FOXP3 közvetlenül hat a miR-155 expresszióra, ezáltal a Treg sejtek képződésére. MiR-155 deficiens sejtekben hibás az antitest osztály váltás, valamint a plazmasejteké váló differenciálódás képessége, ezáltal a T-sejt dependens humoralis immunválasz károsodik.<sup>32</sup>

A B-sejtek érése során a miR-150 expressziója fokozódik. Ezt blokkolva a pro-B-sejt pre-B-sejt átalakulás meghiúsul, az érett B-sejt képzés sérül. A miR-181a szerepet játszik a B- és T-sejtek differenciálódásában, és expressziójának változtatásával befolyásolható a T-sejt receptor szenzitivitás.<sup>32</sup>

A bioszintézisben szerepet játszó DICER endonukleáz hibás működése az erre mutáns egerek regulátoros T-sejtjeiben funkcióvesztést okoz, ezáltal az autoimmunitás kontrollálatlan fokozódásához vezet.<sup>46</sup>

Természetesen ezeken felül számos miR működése tanulmányozott és ismert az immunrendszer működése szempontjából.<sup>32,47</sup>

#### 2.2.3.3 MikroRNS-ek a bélnyálkahártyában

Egészséges egyénben az ép intesztinális barriernek köszönhetően a táplálék antigének és a nyákfilm mikroorganizmusai nem érik el az LP-t. Amennyiben minimális

mennyiségű antigén mégis átjut a barrieren, makrofágok eliminálják fagocitózis útján anélkül, hogy proinflammatorikus citokin termelés indulna el. IBD-ben a diszbiózis, a károsodott barrier funkció és mukózális „clearing”, valamint a regulátoros T-sejtek és anti-inflammatorikus citokinek hiánya miatt elvész az immunológiai tolerancia az endogén mikrobiom iránt.<sup>48</sup>

A gasztrointesztinális (GI) traktus nyálkahártyájának különböző sejtjeiben eltérő miR mintázat található. A hemopoetikus eredetű sejtekben (**LP T-sejt** és dendritikus sejtek) az immunológiai folyamatot elindító mintázat- és antigénfelismerő receptorok aktiválódásától függően változik a miR expresszió, amely a cito- és kemokin, valamint az antitest termelés, ezáltal az immun homeosztázist befolyásolja. Az intesztinális epitel sejtekben a miR kifejeződés változása szabályozza az antimikrobiális peptidok szekrécióját, sejt regenerációt és permeabilitást. A diszbiózis megváltozott miR mintázathoz vezet.<sup>49</sup>

A vizsgálatomban szereplő miR-ek közül a miR-155 kiemelkedő jelentőségű a bél immunregulációjában. TGF- $\beta$  hatására izolált, humán LP T-sejtekben fokozódik a miR-155 expresszió. Perifériás T sejtekben ez csak szerény mértékben megy végbe. Ezen túlmenően a számos pro-inflammatorikus hatása mellett az LP T-sejtekben TGF- $\beta$  jelenlétében az IL-2 és IFN- $\gamma$  termelést csökkenti, ezzel gátolva a gyulladást folyamatot.<sup>50</sup>

A miR-146a közvetlen targetje az **intesztinális epitel** sejtekben is a TLR szignálfolyamat génjei, ezek közül kiemelve a TRAF-6 és IRAK-1 jelentőségét. Egér és humán intesztinális iszkémia-reperfúzió modellben az epitel sejtek *in vitro* miR-146a kezelése csökkentette a gyulladást kemokin termelést és a hipoxia károsító hatását. A miR-146a kezelés *in vivo* is csökkentette a károsodást az IRAK-1 gátlásán keresztül.<sup>51</sup>

*In vitro* az intesztinális epitel sejtek TNF- $\alpha$  kezelése fokozott miR-122 szinthez vezetett. Mivel a miR-122 közvetlen célpontja az occludin mRNS, ez a „tight junction” funkció közvetlen károsodásához, bélpermeabilitás fokozódáshoz vezet.<sup>52</sup>

Egészeiben véve, az eddigi vizsgálatok alapján, a bélnyálkahártya immun- és nem-immunsejtjeinek miR mintázata és expressziója alapvető szerepet játszik az intesztinális homeosztázis fenntartásában.



#### 2.2.4 A TGF- $\beta$ szerepe a bélnyálkahártya gyulladós folyamatában

Amint az a Patomechanizmus c. fejezetben található 1. ábrán is látható, az IBD kórfolyamatának alapja a pro- és anti-inflammatorikus szabályzó folyamatok egyensúlyának felborulása, kontrollálatlan gyulladós reakció elindulása. A legjelentősebb anti-inflammatorikus hatású citokin a TGF- $\beta$ .

A TGF- $\beta$  egy multifunkcionális citokin, amely többek között az epitél és endotél, illetve a hemopoetikus sejtek és lymphocyták proliferációját képes gátolni, valamint differenciációját, migrációját befolyásolni. Extracelluláris mátrix protein depozíció indukción keresztül szerepet játszik a **fibrózis** elindításában, valamint egyes epitél sejtek epitéliális-mezenchimális tranzíciójának elindításával a tumorképződésben.

A TGF- $\beta$  szignál transzdukció SMAD és nem-SMAD jelátviteli úton valósul meg. A SMAD útvonalon a TGF- $\beta$  a szerin-treonin kináz TGF- $\beta$  receptor (R)II és I-hez kapcsolódik, majd a TGF- $\beta$ RII foszforilálja a TGF- $\beta$ RI-t, amely aktiválja a SMAD2 és SMAD3-at. A SMAD2/3 a SMAD4-gyel komplexet alkot és a sejtmagba helyeződik, ahol számos transzkripciós faktoral és ko-aktivátorral interakciót képezve befolyásolja a target gének kifejeződését. A SMAD útvonal mellett a TGF- $\beta$  szignalizáció több egyéb intracelluláris jelátviteli kaszkádon keresztül is képes végbemenni. A TGF- $\beta$  receptorok aktiválják az extracelluláris szignál regulált kináz (ERK), p38 mitogén aktivált protein kináz (MAPK), C-Jun N-terminális kináz (JNK) útvonalakat is. A TGF- $\beta$  receptorok képesek a Par6-hoz kapcsolódni, ezen „tight-junction” proteint foszforilálni, és a SMAD specifikus E3 ubiquitin ligáz Smurf1-et aktiválni, amely képes ubiquitilálni és degradálni többek között a Ras homológ gén család (Rho) A tagját.<sup>53</sup>

Normál colon bélnyálkahártya és LP mononukleáris sejtvonalon az endogén TGF- $\beta$  aktivitás gátlása pro-inflammatorikus citokin termelést indukál, amely a TGF- $\beta$  szerepét mutatja a bélnyálkahártya gyulladásának kontrollálásában.<sup>54</sup>

## 2.3 *Klinikum*

### 2.3.1 Tünetek

A CD megjelenése rendkívül színes lehet. Jellemző tünet fennállása esetén indokolt a kivizsgálás megkezdése. Kizárólagosan típusos tünetek nincsenek, a klasszikus triász, úgymint hasfájás, hasmenés, súlyvesztés, csak az esetek 25%-ban fordul elő.<sup>55</sup> Makroszkópos hematokézia UC-ra jellemzőbb, CD-ben az esetek felében nem jelenik meg látható vér a székletben. A hasfájás helye legtöbbször függ a betegség lokalizációjától, azonban általában bizonytalan, köldök körüli. Jobb alhasi fájdalom mindig alarmírozó, a terminalis ileum érintettségére utal, nehézséget jelenthet és nagy figyelmet kíván a krónikus vagy rekuráló appendicitis, Yersinia infekció, lymphadenitis mesenterialis, intesztinális limfóma és intesztinális tuberculosis elkülönítésétől.<sup>56</sup> A gondos fizikális vizsgálat elmaradhatatlan része a perianális terület megtekintése és rectalis digitális vizsgálat elvégzése. Jellemző tünet a perianális fissúra és fisztula, amely az esetek mintegy 10%-ában már a betegség indulásakor jelen lehet.<sup>57</sup> Emellett a gyulladt bőrfüggelék („skin tag”), valamint perianális tályog is jellemző eltérés. Ezeken kívül a gyarapodásbeli elmaradás, anémia, láz, kései pubertás fennállása lehet figyelemfelhívó tünet. Ismeretlen eredetű láz kivizsgálása során az IBD fennállásnak lehetőségére is figyelmet kell fordítani. Különösen fontos jelentősége van az IBD extraintesztinális manifesztációinak (EIM). A GI tünetek előtt jelentkező EIM elterelheti a figyelmet az alapbetegségről, ezzel késleltve a diagnózis felállítását és a megfelelő terápia elindítását. Látványos béltraktuson kívüli bőrtünet a pyoderma gangrenosum és az erythema nodosum, valamint a szájnyalvok érintő elváltozások, elsősorban aphták megjelenése. Célzott vizsgálatot igényel a szemészeti megjelenés, uveitis, episcleritis kialakulása. Ízületi panaszt arthritis, szeronegatív spondylopathiák okoznak. Sclerotisáló cholangitis elsősorban UC-hoz társul. Ritkábban nephro- és cholelythiasis, pancreatitis lehet EIM.<sup>9</sup>

### 2.3.2 Lefolyás

A betegség természetes lefolyásában kezdetben döntően a gyulladós folyamat dominál, majd két fő irányba válik szét a kórkép progressziója, striktúrázó és penetráló fenotípust különböztetünk meg.<sup>58</sup>

A komplikált CD (striktúrázó, penetráló forma) kialakulásának kumulatív rizikója a gyermekpopulációban a felnőttkorihoz hasonló, azonban a korai betegségkezdet miatt fiatal felnőttkorra nagyobb valószínűséggel esnek át sebészeti beavatkozásra. Harminc éves korban a bélrezekció aránya  $48\pm 5\%$  és  $14\pm 2\%$  gyermek ill. felnőttkori kezdetű CD-ben.<sup>6</sup>

A krónikusan fennálló gyulladás a malignizálódás lehetőségét rejti magában. Emiatt szűrővizsgálatok, rendszeres „surveillance” endoszkópiák elvégzése szükséges hosszabb betegségfennállás esetén.<sup>59</sup>

A prepubertásban jelentkező krónikus betegségek, így az IBD is, jelentősen befolyásolják a növekedés ütemét, ha az epifízis fugák záródása előtt remisszió érhető el, megfelelő tápláltság, kalóriabevitel mellett van remény behozó növekedésre („catch-up growth”). Amennyiben a gyulladós folyamat aktív serdülő betegben, a hossznövekedés elmaradása, alacsony felnőttkori testmagasság kialakulása várható.<sup>6</sup>

Különös nehézséget jelent a hatéves kor előtt jelentkező korai kezdetű IBD (VEO-IBD) kórismézése.<sup>60,61</sup>

### 2.3.3 Klasszifikáció

A CD változatos GI megjelenése miatt szükséges egységes kritériumrendszer használata. A gyulladás helye és mértéke széles spektrumon mozoghat, a beteg genotípusát módosító genetikai polimorfizmusok, epigenetikai és környezeti tényezők befolyásolják, és határozzák meg a kórkép fenotípusát. Klasszifikációs beosztás használata rávilágíthat geno- és fenotípus összefüggésekre, valamint a mindennapi gyakorlat szempontjából elengedhetetlenül fontos a megfelelő terápia megválasztásában. A Párizsi Klasszifikáció az életkor, betegség lokalizáció és viselkedés, valamint a növekedésbeli elmaradás alapján osztályoz (1. táblázat).<sup>1</sup>

**1. táblázat. A Párizsi Klasszifikációs rendszer**

életkor (age, A) a diagnóziskor	A1a: 0–<10 év A1b: 10–<17 év A2: 17–40 év A3: >40 év
lokalizáció (location, L)	L1: terminalis ileum±izolált coecum L2: colon L3: ileocolon L4a: felső GI a Treitz szalagig L4b: felső GI a Treitz szalagtól distalisan, de a terminalis ileumtól proximalisan
viselkedés (behavior, B)	B1: nem sztenotizáló, nem penetráló (gyulladásos forma) B2: sztenotizáló B3: penetráló B2B3: mindkettő p: perianális betegség
növekedésbeli elmaradás (growth, G)	G <sub>0</sub> : nincs elmaradás G <sub>1</sub> : van elmaradás

**2.3.4 Aktivitási index**

A betegség kiterjedésén és viselkedésén túl a megfelelő terápia megválasztásához a folyamat aktivitásáról is objektív információval kell a kezelőorvosnak rendelkeznie. Jelenleg a két évtizedes múltra visszatekintő Pediatric Crohn's Disease Activity Index (PCDAI) a legelterjedtebben használt aktivitási marker. Alapvető klinikai tünetek (általános állapot, hasi fájdalom jelenléte, napi széklétszám és -állag, hasi tapintási lelet) mellett laboratóriumi paraméterek (hematokrit, vörösvértest süllyedés (We) vagy C-reaktív protein (CRP) szint, szérum albumin mennyiség), antropometriai adatok (fogyás, növekedésbeli elmaradás), valamint perirectalis elváltozás és EIM jelenléte figyelembevételével 0-tól 100-ig terjedő pontrendszerben értékelhető a betegség aktivitása. Teljes remisszióknak tekintjük a 10 alatti pontszámot, 30 felett pedig kifejezett aktivitásról beszélünk.<sup>62</sup>

Az elmúlt években számos változata jelent meg a klasszikus PCDAI-nak (rövidített, módosított), amelyek közül a matematikailag súlyozott „weighted”: **wPCDAI**-nek a jövőben várható széleskörű elterjedése. Az eddigi vizsgálatok alapján

a wPCDAI jobban teljesített a remisszió és az aktív betegség elkülönítésében, valamint ez utóbbin belül a közepesen súlyos és súlyos forma megkülönböztetésében. Az index jobbnak bizonyult a közepes és jelentős javulás közötti differenciálásban.<sup>63</sup> Jelenleg a mindennapi gyakorlatban és tudományos kutatásokban mindkét index egyaránt elfogadott aktivitásjelző.

## 2.4 *Diagnosztika*

A modern orvostudomány napjainkban rendelkezésre álló laboratóriumi és képalkotó diagnosztikus lehetőségei ellenére a gyermekkori IBD kórismézése, valamint a szubtipusok közötti differenciálás esetenként továbbra is kihívást jelent. Az Európai Gyermekgasztroenterológiai, Táplálási és Hepatológiai Társaság (European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, ESPGHAN) módosított „**Portói**” kritériumrendszere alapján az IBD diagnózisának felállításának a pontos anamnézis felvételén, fizikális és laboratóriumi vizsgálatokon, oesophago-gastro-duodeno- és ileo-colonoscopia elvégzésén, az ennek során vett biopsziás minták szövettani vizsgálatán és a vékonybél képalkotó vizsgálatán kell alapulnia.<sup>55</sup>

Az elkülönítő kórismezés során célunk az IBD differenciálása egyéb betegségektől és az alcsoportok megkülönböztetése az IBD diagnózisán belül. Kiemelt fontosságú az infektív eredet kizárása.

### 2.4.1 Anamnézis és fizikális vizsgálat

A kivizsgálás alapját az ún. „alarm”, figyelemfelhívó eltérések megítélése képezi. A részletes anamnézis felvételnek ki kell terjednie nemcsak a panaszok indulására, jellegére, hanem egyéb kezelt betegség, megelőző gyógyszeres kezelés, allergia, gyógyszerérzékenység, étrendi változások, változtatások meglétére. Részletes családi előzmény, esetleges (külföldi) utazás is fontos információ lehet. Külön figyelemet kell fordítani a székelési habitus és állag változására, a székletürítés frekvenciájára (napi székletszám, kiemelt jelentőséggel bír az éjszakai székletürítés), urgenciájára, a széklet konzisztenciájára, vér-, nyák tartalma, perianális genny ürülése a diagnózist és aktivitást befolyásoló tényezők. Rá kell kérdezni hasi fájdalom, gyengeség, rossz közérzet, valamint EIM, láz, szem-, ízületi-, bőrtünet fennállására. Részletes fizikális vizsgálat szükséges, külön hangsúlyt fektetve a következőkre: általános állapot, súly- és magasság percentilisek felvétele, pubertás korban Tanner-beosztás, pulzus, vérnyomás, testhőmérséklet mérés. A has tapintása során fájdalmat, érzékenységet, puffadtságot, terimét keresünk. Elengedhetetlen a perineum és perianális régió megtekintése, rectalis vizsgálat elvégzése, fájdalom, abszcesszus, fisztula, físzúra keresése.<sup>64</sup>

## 2.4.2 Laboratóriumi vizsgálatok

A kezdeti laboratóriumi vizsgálatok nemcsak a diagnózis felállításához, de az etiológia tisztázásához, a differenciáldiagnosztikai folyamathoz, a gyulladás aktivitásának és a prognosztikai faktorok megítéléséhez, valamint lehetséges szövődmény igazolásához is szükségesek. A kezelés megkezdése után a terápia hatékonyságának és esetleges mellékhatás fennállásának megítélésében fontosak.

A kiindulási vérvizsgálatok között szerepelnie kell a teljes vérképnek, legalább két gyulladásos paraméternek (rendszerint **CRP** és **We**), szérum albuminnak, transzaminázoknak és gamma-glutamil-transzferáznak (GGT).

Kiemelendő, hogy normál laboreredmények nem zárják ki IBD fennállását, enyhe CD betegek induló hemoglobin (Hb), albumin, CRP és We az esetek 21%-ban élettani értéket mutat.<sup>65</sup>

Alacsony szérum albumin nemcsak a tápláltsági állapotra, hanem a betegség aktivitására utal, valamint fehérjevesztő enteropathia fennállására is felhívhatja a figyelmet.<sup>55</sup> Kiemelésre érdemes, hogy UC-snek gondolt beteg alacsony albumin értéke mindig fel kell, hogy vesse: esetleg Crohn-colitisről van szó.

A vérkép és vérkémiái vizsgálatok mellett szerológiai, antitest biomarkerek lehetnek segítségünkre a diagnózis felállításában, illetve az IBD alcsoportok közötti differenciálásban. Jelenleg nem létezik egyértelmű antitest mintázat, amely alapján a diagnózis felállítható lenne, emiatt ezen tesztek nem tartoznak a kötelezően elvégzendő laborok közé.<sup>66</sup> Klasszikusan, CD-re jellemző szerológiai leletnek tekintjük az anti-*Saccharomyces cerevisiae* antitest (**ASCA**) pozitív, p-anti neutrofil cytoplasma antitest (pANCA) negatív (ASCA+/pANCA-) eredményt, bár ez messze nem zárja ki UC fennállását. Összességében elmondható, hogy az ASCA pozitívítás jellemzőbb CD-re, mint UC-ra, az előbbiben 50-70%, míg utóbbiban 10-15%-os előfordulással. Egészséges kontrollokban 5% alatti az antitest előfordulása.<sup>55</sup> Gyermekkorban az ASCA pozitívítás (szenzitivitása/specifitása 44-76/88-95%-os), UC-ban a pANCA pozitívítás (szenzitivitása/specifitása 57-83/65-97%-os) segítheti a diagnózis felállítását. ASCA pozitívítás és magas antitest titer eredmény rossz prognosztikai faktor, komplikált, penetráló vagy striktúráló betegség forma kialakulását, illetve sebészi beavatkozás szükségességét jelezheti előre. Sajnos Crohn-colitisben gyakori az ANCA pozitívítás, vagyis pont ott nem segít, ahol tényleg szükség lenne rá az elkülönítő kórismézésben.

A klasszikus antitestek mellett az utóbbi években vizsgálták a pancreas (PAB) és kehelysejt ellenes (GAB), az *E. coli* külső membránján található porin C transzporter fehérje (anti-OmpC), a *Pseudomonas fluorescens* bakteriális DNS fragmentje (anti-I2), a bakteriális flagellinek elleni (anti-CBir1), valamint az anti-glikán antitesteket is. Munkacsoportunk vizsgálata alapján megállapítható, hogy ezen markerek önmagukban alacsony szenzitivitással és specificitással rendelkeznek, azonban kombinált használatuk (pl. PAB és ASCA/pANCA) javítja a módszer szenzitivitását.<sup>67</sup>

A jövőben a genetikai és epigenetikai módszerek mellett az „omikai” forradalomnak köszönhetően a metabolomika és proteomika területéről is várható új non-invazív diagnosztikai lehetőség. Ezek közül leginkább a kilégzett levegő és széklet metabolit vizsgálatok tűnnek ígéretesnek.<sup>68</sup>

### 2.4.3 Széklet vizsgálatok

#### 2.4.3.1 Mikrobiológiai vizsgálatok

IBD fennállásának gyanúja esetén a kezdeti kivizsgálás elengedhetetlen lépése a széklet mikrobiológiai vizsgálata. Az infektív eredet kizárásának az endoszkópia előtt kell történnie. Alapvető a bakteriológiai tenyésztés elvégzése *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter* enteritis kizárására. ***Clostridium difficile*** fertőzés kizárására tenyésztés mellett toxin kimutatás elvégzése is javasolt. Kiemelésre érdemes, hogy az utóbbi infekció jelenléte gyakoribb IBD-ben (6-8%), vagyis típusos tüneteknél igazolt infekció esetén se vessük el az IBD lehetőségét.

Enterális vírus fertőzés kizárása a mindennapi gyakorlatban ritkán indokolt, kivéve az immunszupprimált egyén cytomegalovírus infekciója. Sajnos a diagnózishoz általában a sigmoidoscopy során vett biopsziás minta elemzése szükséges.

Rutinszerű szűrés nem, csak a magas kockázatú populációban és az endémiás területeken indokolt a *Giardia lamblia* infekció vizsgálata akkor, ha nincs vér a székletben.

A mikrobiológiai eredmények értékelésekor szem előtt kell tartani, hogy kórokozó igazolása nem feltétlenül zárja ki az IBD fennállását, sőt maga a fertőzés válthatja ki a betegség fellángolását.<sup>55</sup>



### 2.4.3.2 Gyulladásos markerek

A GI infekció kizárása után a bélnyálkahártya gyulladásos állapotának tisztázására széklet gyulladásos marker vizsgálatot végezhetünk. Ezek a széklet calprotectin, laktoferrin, S100 A12 fehérje és lizozim kimutatáson alapulnak.<sup>55</sup> Hazánkban a széklet calprotectin szint meghatározása a legelterjedtebb, bár egyelőre nem tartozik az egészségbiztosítás által finanszírozott vizsgálatok közé.

A **calprotectin** egy kis molekulatömegű (36 kDa) fehérje, amely számos testnedvben (szérum, liquor, ízületi folyadék, vizelet, nyál, széklet) megtalálható. Az S100 protein család tagja, kétféle – egy nehéz és egy könnyű – kalciumkötő fehérjéből áll, leggyakrabban heterodimer formában fordul elő. Döntően a neutrofil granulocyták termelik, mindegyikükben körülbelül 20 pg-nyi található belőle, a sejt citoszoljának 60%-a, összfehérjéinek 5%-a. Számos biológiai hatása ismert, kalcium- és cinkkötő képessége, többféle metalloproteináz-gátló, mieloperoxidáz-szinergista, antimikrobiális, kemotaktikus, illetve apoptózist indukáló tulajdonsága fontos a szervezet normális működése szempontjából. A calprotectin részt vesz az endotél és a fehérvérsejtek interakciójában. A neutrofil granulocyták aktivációja után a calprotectin a testnedvekbe kerül, ahol mennyisége a normálérték százszorosát is elérheti. Jelentőségét elsősorban a magas szenzitivitása adja. Specificitás alacsony, infekció, bél graft rejectio, GI ulcus, pancreatitis, enterocolitis necrotisans, mucoviscidosis, tumor, non-szteroid gyulladáscsökkentő (NSAID)-terápia, illetve coeliakia fennállása esetén is kóros értéket kapunk.<sup>69</sup> Kiemelésre érdemes, hogy csecsemőkorban a béltraktus fokozott átteresztőképessége miatt értéke több száz is lehet. Azonban használatával jó hatásokkal lehet az IBD és az irritábilis bél szindróma (IBS) között differenciálni. 150 µg/g cut-off értéket megszabva a vizsgálat negatív prediktív értéke 97%, pozitív prediktív értéke 71%.<sup>68</sup>

### 2.4.4 Képalkotó vizsgálatok

A legáltalánosabban elterjedt és használható képalkotó vizsgálat a hasi ultrahang (UH). IBD gyanúja esetén és a gondozás során általában könnyen elérhető diagnosztikus módszer, azonban a vékonybél érintettség megítélésére szenzitívebb képalkotó eljárással kell kiegészíteni. A módosított „Portói” kritériumrendszer alapján mágneses rezonanciás (**MR**) **enterográfia** (MRE) végzendő a diagnózis felállításkor,

és komplikáció gyanúja esetén. Jól használható a vékonybelek vizsgálatánál, bélhali gyulladás, fisztula, abszcesszus valamint striktúra megítélésére. A hagyományos kettős kontrasztos röntgen átvilágításhoz és számítógépes tomográfias enterográfiához (CTE) képest előnye az ionizáló sugárzás hiánya és jobb szenzitivitása. Magas negatív prediktív értéke miatt a videó kapszula endoszkópia az MRE alternatívája lehet abban az esetben, ha az MR vizsgálat nem jön szóba. Perianális betegség esetén kismedencei MR végzése indokolt.<sup>55</sup> Komplikált esetben a fisztulajáratok lefutását perianális és rectális UH vizsgálat tisztázhatja.<sup>70</sup>

#### 2.4.5 Endoszkópia

IBD gyanúja esetén ileo-colonoscopia (IC) és oesophago-gastro-duodenoscopia (OGD) elvégzése indokolt. A beavatkozást megfelelő előkészítés (bél tisztítás) után életkortól, mentális és pszichés érettségtől függően szedato-analgéziában végezzük. Colonoscopia során cél a teljes vastagbél áttekintésén túl a terminalis ileum intubációja is. A megfelelő szövettani feldolgozáshoz az endoszkópia során **minden bélszakaszból** 2-2 biopszia vétele indokolt, makroszkóposan ép nyálkahártya esetén is.

OGD elvégzése felső GI tünet hiányában is indokolt. A HUPIR adatai alapján a felső GI eltérés CD-ben az esetek 64%-ában, UC-ban 40%-ban található. CD-re karakterisztikus elváltozások a betegek mintegy harmadában voltak láthatóak, és az esetek 9%-ban szignifikáns lézió igazolásával alapvetően hozzájárult a diagnózis felállításához (diagnosztikus hozam).<sup>71</sup> Jelenleg nem áll rendelkezésre olyan specifikus marker, amely segítene a CD és egyéb felső GI betegségek, *Helicobacter pylori* (HP) infekció, HP negatív krónikus aktív gastritis, eosinophil enteropathia vagy gyógyszer okozta nyálkahártya eltérés differenciálásában.<sup>72</sup>

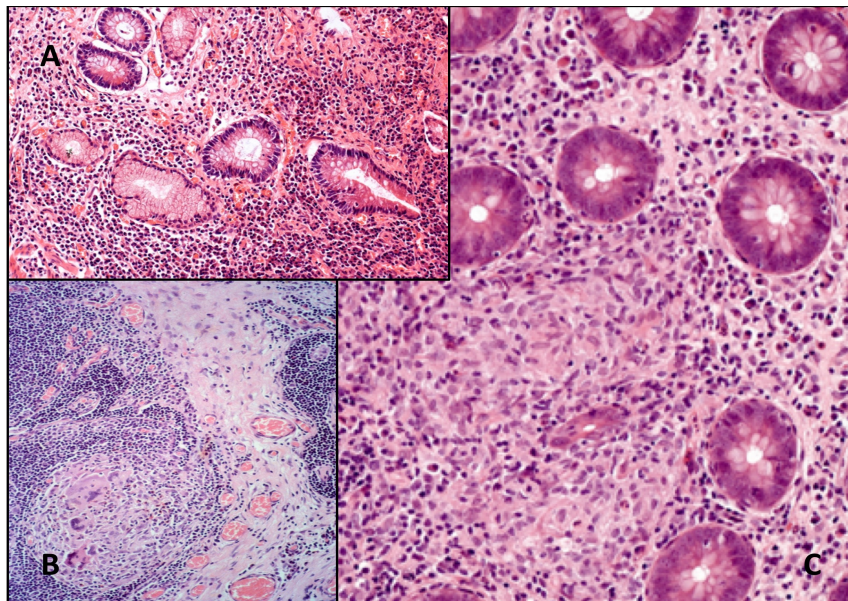
A CD a teljes tápcsatornát, szegmentálisan érintheti. Típusos, CD-re jellemző eltérések az aphták, hosszanti vagy kanyargós (kígyózó – serpinginosus) fekélyek, macskakő rajzolat, stenosis vagy striktúra, prestenotikus tágulattal. A makroszkóposan ép és kóros szakaszok éles határral váltakoznak. A perianális régióban fisztula, abszcesszus, a rectumban szűkület, fekély alakulhat ki. A gyulladt skin tag szintén specifikus jel. Nem specifikus eltérések a nyálkahártya általános gyulladással jelei, oedemás, sérülékeny, vérzékeny mucosa, a szokványos érrendszeri mintázat eltűnése, perianálisan kis skin tag, középvonali físzúra fennállása.<sup>55</sup>

A diagnosztika mellett az endoszkópia során terápiás beavatkozásra, vérzéscsillapításra, illetve a szűkületek ballonos tágítására is lehetőség van.

#### 2.4.6 Szövettan

CD-re leginkább típusos szövettani eltérés az el nem sajtosodó **granuloma** jelenléte a biopsziás mintában, főleg, ha az rupturált cryptától távol látható. Fokális krónikus vagy transmuralis gyulladás, submucosus fibrózis is jellemző lelet.

Gyulladást jelző, de nem specifikus szövettani kép a rupturált cryptához közeli granuloma, az LP-t infiltráló enyhe gyulladásos jelek, nyálkahártya fekély vagy erózió, krónikus gyulladás hisztológiai jelei.<sup>55</sup> A CD-ben előforduló típusos makroszkópos és mikroszkópos eltérések a 2. táblázatban foglaltam össze. CD-re jellemző szövettani eltérések a 6. ábrán láthatók.



#### 6. ábra. CD-re jellemző szövettani eltérések.

*A panel: Fokális krónikus gyulladás jelei, cryptában Paneth-sejt metaplasia. B panel: Tuberculoid granuloma a nyirokcsomóban. C panel: Tuberculoid granuloma a lamina propriában. A Szegedi Tudományegyetem Pathológia Intézetének anyagából.*

**2. táblázat. CD-ben előforduló makroszkópos és mikroszkópos eltérések a módosított “Portói” kritériumrendszer szerint.**

<p><i>Típusos makroszkópos eltérések:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– aphta</li> <li>– hosszanti vagy serpinginosus fekélyek</li> <li>– macskakő rajzolat</li> <li>– szűkület, prestenotikus tágulattal</li> <li>– megvastagodott bélfal, beszűkült lumen</li> <li>– perianalis betegség: fisztula, abszcesszus, rectum szűkület, ulcus, nagy, gyulladt skin tag</li> <li>– szegmentális megjelenés („skip lesion”)</li> <li>– jejunum, ileum ulcus</li> </ul>	<p><i>Típusos mikroszkópos eltérések:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– el nem sajtosodó granuloma, ruptúrált cryptától távol</li> <li>– transzmurális gyulladás</li> <li>– submucosus fibrózis</li> <li>– fokális krónikus gyulladás</li> </ul>
<p><i>Nem specifikus makroszkópos eltérések:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– nyálkahártya oedema, erythema, egyenetlenség, sérülékenység</li> <li>– exsudatum</li> <li>– érmintázat eltűnése</li> <li>– izolált aphtosus ulcus</li> <li>– perianalisan: középvonali físzúra, kis skin tag</li> </ul>	<p><i>Nem specifikus mikroszkópos eltérések:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– granuloma destruált crypta mellett</li> <li>– enyhe gyulladással infiltrátum a lamina propriában</li> <li>– nyálkahártya erózió vagy fekély</li> <li>– krónikus gyulladás jelei: crypta károsodás, Paneth-sejt metaplasia, kehelysejt depléció</li> </ul>

## 2.5 Kezelés

Az IBD kezelésében tradicionálisan a **remisszió** elérése a cél. A „remisszió” fogalma azonban az elmúlt években megváltozott, jelenleg nemcsak a klinikailag jó állapot, alacsony aktivitási index elérése a cél, hanem a mély („deep”) remisszió, amely a tünetmentesség és normál laboratóriumi paraméterek mellett a nyálkahártya szövettani gyógyulását is jelenti. A mély remisszió állapota megváltoztathatja a betegség természetes lefolyását, ezáltal csökkentve a sebészeti beavatkozások szükségességét.<sup>6</sup>

A betegség eltérő fenotípusos megjelenése miatt azonban nagy a személyre szabott terápia, ezzel együtt az alkalmazott kezelés toxicitásának minimalizálásának jelentősége, amely elvek figyelembevételével készült el az ESPGHAN és a European Crohn’s and Colitis Organization (ECCO) közös, gyermekkori CD kezelési stratégiáját tartalmazó ajánlása.<sup>6</sup>

A 2014-ben publikált vezérfonal klinikailag legjelentősebb pontja a szteroidmentes remisszió elérésére vonatkozik. Jelenleg gyermekkori luminális CD remisszió indukciójában elsőként választandó kezelési lépés a **kizárólagos enterális táplálás** (EEN) alkalmazása. Az esetlegesen fennálló tejallergia fennállásától függően tehéntej fehérje alapú, polimer, extenzíven hidrolizált vagy aminosavra bontott tápszer bevezetésével és 6-8 héten keresztül alkalmazásával érhető el remisszió. A tápszer mennyisége a beteg napi kalóriaigényéhez igazított, tinédzser esetében mintegy napi 1,5-3 liter folyadék elfogyasztását jelenti, a tápszer kalóriatartalmától (1-2 kcal/ml) függően. Ezen kívül más étel, ital a tiszta vízen kívül nem fogyasztható. A tápszer per os vagy nasogastricus szondán át is adható. A hatásmechanizmus alapja a feldolgozott élelmiszerekben jelen lévő, a bélnyálkahártyát közvetve vagy közvetlenül károsító, a normál mikrobiom és az immunrendszer működését, valamint a mukóza „tight junction”-jait károsító anyagok kizárása. Az EEN remisszió indukáló hatása megegyezik a szteroidokéval, de jobb mukózális gyógyulási rátával.<sup>73</sup> Kiemelésre érdemes, hogy a tápszeres táplálás alatt a hiányzó oltások is pótolhatók.

A szteroidok elhagyása annak minden mellékhatásának kiküszöbölésével jár, emellett megfelelő tápláltsági állapot és testösszetétel érhető el, javul a növekedési ütem és csontsűrűség.<sup>74</sup>

Amennyiben az EEN egyáltalán nem tolerálható vagy 2 hét effektív kezelés ellenére sem hatásos, akkor a kortikoszteroid kezelés elkezdése indokolt. Ez izolált,

enhye ileo-coecalis kórkép esetén lokálisan ható budesonid, egyéb esetben szisztémás prednisolon vagy ekvivalens hatású gyógyszer alkalmazását jelenti. Kedvezőbb mellékhatás-profil miatt metil-prednisolon adása javasolt.

A személyre szabott kezelési elveket figyelembe véve súlyos perianális fisztulázó forma és jelentős növekedésbeli elmaradás, rossz prognózisú betegség esetén egyéni mérlegelés alapján biológiai terápia elkezdése javasolt. Erre azonban a jelenlegi magyarországi finanszírozási rend alapján a hazai IBD centrumoknak nincs lehetőségük.

A remisszió elérése után célunk annak fenntartása. Alacsony rizikójú betegek esetében parciális enterális táplálás 5-aminoszalicilsav (ASA) adásával vagy anélkül jön szóba. Megjegyzendő, hogy a betegek túlnyomó többsége nem ebbe a csoportban tartozik. Sokkal gyakrabban van szükség immunmoduláns terápia elindítására, amely thiopurin vagy methotrexát lehet. Hazánkban gyakoribb az azathioprin használata. Amennyiben optimalizált szérum gyógyszer szint mellett is aktív a betegség, vagy intolerancia alakul ki, az immunmoduláns váltása javasolt, hatástalanság esetén pedig az anti-TNF- $\alpha$  biológia terápia bevezetése indokolt.

A sebészeti beavatkozásokat a lehetőségekhez képest minimalizálni indokolt a hosszútávú következmények, bélvesztés elkerülése érdekében. Azonban terápia refrakter, izolált L1 lokalizációjú betegség (terminalis ileum és coecum) illetve biológiai terápia mellett is fennálló sztenózis esetén, lehetőség szerint remisszióban elvégzett rezekció hosszú távú tünetmentességet eredményezhet.<sup>6</sup>

### 3 Célkitűzések

Az CD patomechanizmusában a miR-ek fontos szerepet játszanak. A lokális expressziójuk vizsgálata közelebb vihet a betegség kialakulásának megértéséhez, valamint potenciális specifikus diagnosztikus markerként, illetve terápiás targetként való használatukhoz.

1.: Fő célkitűzésem a miR-146a, -155 és -122 expressziójának meghatározása volt Crohn-beteg gyermekek duodenum nyálkahártyájából származó biopsziás mintáiban. Gyermekkorban felső GI traktusból származó mintákból korábban ilyen vizsgálat még **nem történt**.

2.: A kapott eredményeket összehasonlítottam a korábbi, colon biopsziás mintákban mért miR expressziós értékekkel.

3.: Tekintettel az anti-inflammatorikus TGF- $\beta$  gyulladássos folyamatokban betöltött szerepére, további céloom volt a rekombináns humán (rh)TGF- $\beta$  ezen miR-ekre kifejtett hatásának vizsgálata vékonybél epitél és duodenum fibroblaszt sejteken.

## 4 Módszerek

### 4.1 Betegek

A kutatásban szereplő szövetminták a Semmelweis Egyetem I. sz. Gyermekgyógyászati Klinikáján vizsgált és gondozott betegek biopsziáiból származnak. A vizsgálat a Semmelweis Egyetem Egészségügyi Tudományos Tanácsa által engedélyezett (TUKEB No.: 10408/2012). A vizsgálat megkezdése előtt az érintett gyermekek szülei írásos beleegyező nyilatkozatot tettek.

A CD diagnózisának felállítása a „Portói” kritériumoknak megfelelően történt. A betegség aktivitásának megítélésre PCDAI-t használtunk. A kontroll biopsziák makroszkóposan és szövettanilag is ép nyálkahártyából származtak. A minták visszatérő hasfájás, valamint organikus betegség kizárására végzett endoszkópos vizsgálaton átesett betegekből származtak.

Vizsgálatainkat CD (CD; n=20) gyermekek makroszkóposan ép (CD ép; n=10) és kóros (CD kóros; n=10), valamint kontrollként egészséges (K; n=10) gyermekek biopsziáin végeztük. A mintavétel után a szövetdarabokat azonnal pufferelt formaldehidben fixáltuk, majd paraffinba ágyasztuk.

Korábbi vizsgálatunkkal történő összehasonlító részben formalinban fixált, paraffinba ágyazott colon biopsziás eredményeinket vettük alapul, ahol makroszkóposan ép CD (CD ép: n=12) és kóros (CD kóros: n=12) és kontroll (K: n=16) gyermekek mintái szerepeltek.

A CD betegek és kontrollok adatait a 3. táblázatban foglaltam össze.



**3. táblázat. A CD beteg és kontroll gyermekek klinikai adatai és laboratóriumi paramétereit.**

(BMI: body mass index, CD: Crohn-betegség, f: fiú, l: lány, PCDAI: gyermekkori Crohn-betegség aktivitási index, lokalizáció, L: lsd. 1. táblázat, TVK: teljes vaskötő kapacitás; a:  $p \leq 0,05$ , b:  $p \leq 0,01$ , c:  $p \leq 0,001$  vs. Kontroll).

	<b>Kontroll</b>	<b>CD ép</b>	<b>CD kóros</b>
<b>n</b>	10	10	10
<b>Kor (év)</b>	8,75±2.36	12,4±1.52	12,11±1,63
<b>Nem</b>	2l/8f	5l/5f	2l/8f
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	20,07±2,64	14,83±0,8	18,64±1,81
<b>PCDAI</b>	0	21,94±4,37 <sup>c</sup>	16,11±3,51 <sup>b</sup>
<b>Lokalizáció (betegszám)</b>		L1: 1 L1+L4: 1 L3: 6 L3+L4: 2	L1+L4: 2 L2+L4: 2 L3+L4: 6
<b>Vas (umol/l)</b>	15,83±2.53	4,89±0,84 <sup>b</sup>	8,33±2,61 <sup>a</sup>
<b>TVK (umol/l)</b>	60,4±2,71	48,5±2,64	59,71±8,7
<b>Albumin (g/l)</b>	47,33±1,31	38,67±1,62	48,4±5,56
<b>Hemoglobin (g/l)</b>	132,8±6,72	113,1±4,02 <sup>a</sup>	124,4±5,93
<b>Hematokrit (%)</b>	0,38±0,02	0,344±0,01	0,37±0,02
<b>Trombocita (Giga/l)</b>	365,5±30,29	517,1±34,62 <sup>a</sup>	416,7±63,77

## 4.2 *In vitro* modell

Normál vékonybél epitél (CCL-241, American Type Culture Collection, Manassas, VA, United States) sejteket 10%-os borjú savóval (FBS, Invitrogen, Carlsbad, CA, United States), 30 ng/mL epidermális növekedési faktorról (R&D Systems, Minneapolis, MN, United States), és 1%-os Penicillin és Streptomycin keverékkel (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, United States) kiegészített HybriCare táptalajon (American Type Culture Collection, Manassas, VA, United States) tenyésztettük. A folyamat standard körülmények között (37°C, pársított, 5% CO<sub>2</sub>/95% levegő összetételű légkör) történt.

A primer fibroblaszt sejtek egészséges gyermekek duodenum nyálkahártyájából a Seymour és mtsai. által leírt módon kerültek izolálásra.<sup>75</sup> A mintákat foszfát-alapú pufferrel (PBS) mostuk, majd 1mg/mL kollagenáz tartalmú PBS-sel (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, United States) homogenizáltuk. A sejteket 1%-os FBS-sel (Invitrogen, Carlsbad, CA, United States) és 1% Penicillin-Streptomycin keverékkel kiegészített Dulbecco's Modified Eagle Medium táptalajon tenyésztettük. A folyamatot itt is standard körülmények között (37°C, pársított, 5% CO<sub>2</sub>/95% levegő összetételű légkör) végeztük. A tenyésztés alatt 24 óránként a különálló sejteket eltávolítottuk egybefüggő sejtréteg kialakulásáig.

A sejt kultúrák elkészülte után az epitél és primer fibroblaszt sejteket 6-lyukú lemezekre osztottuk szét,  $5 \times 10^5$  sejt/lyuk sűrűségben, majd rhTGF- $\beta$ -val (R&D Systems, Minneapolis, MN, United States, 1nM, 24 óra), illetve a kontroll csoport esetében vehikulummal (24 óra) kezeltük.

### 4.3 RNS izolálás

A formalinban-fixált, paraffinba ágyazott mintákból RNeasy minikittel (Qiagen, Düsseldorf, Germany) izoláltunk teljes RNS-t. A paraffin eltávolítása a gyártó utasításainak megfelelően történt. A szennyezőanyagok kimosása után DNase-t (Ambion, Life Sciences, Foster City, CA, USA) használtunk a DNS enzimatisz emésztéssel történő eltávolításához. Végül a koncentrált RNS-t RNeasy MinElute spin oszlopokkal (Qiagen, Düsseldorf, Germany), 30  $\mu$ L vízzel eluáltuk.

A vékonybél epitel és duodenum fibroblaszt sejtekből Quick-RNA MiniPrep isolation kit-tel (Zymo Research, Irvine, CA, United States), a gyártó utasításainak megfelelően izoláltuk a teljes RNS-t. RNA Lysis Buffer-t és Zymo-Spin<sup>TM</sup> oszlopot használtunk az RNS tisztítására. A szennyezőanyagok kimosása után (RNA Prep és Wash Buffer) DNase-zal távolítottuk el a DNS-t. Az RNS-t 30  $\mu$ L vízzel eluáltuk, majd egyből felhasználtuk.

### 4.4 Reverz transzkripció és valós idejű polimeráz láncreakció

Az izolálás során kapott RNS reverz transzkripciójához TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit-et (Applied Biosystems – ABI, Foster City, CA, United States) használtunk.

Az egyes miR-ek mennyiségét valós idejű reverz transzkripcióval és valós idejű polimeráz láncreakcióval (RT-PCR) TaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystems–ABI, Foster City, CA, United States) felhasználásával, LightCycler 480 műszeren (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) végeztük. A mérések háromszorozva (triplikátumokban) történtek. A vizsgált miR-ek relatív expresszióját  $2\Delta Cq$  módszert használva, standardként U6-hoz viszonyítva határoztuk meg.

### 4.5 Statisztika

A statisztikai vizsgálatokhoz a Graphpad statistical software csomagot (Graphpad Software, La Jolla, CA, United States) használtuk. Shapiro-Wilk normalitás tesztet végeztünk. Az adatokat Mann-Whitney U-teszttel, Kruskal-Wallis, Analysis of variance (ANOVA) és Dunn's Post-Hoc teszttel elemeztük. Szignifikáns eltérésnek

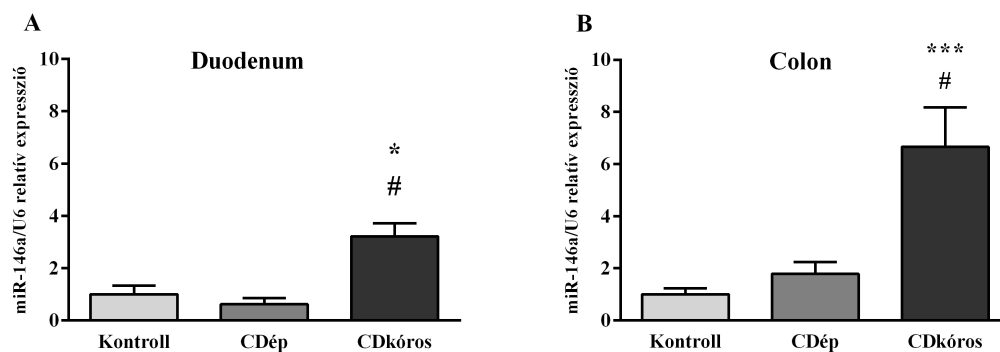
$p \leq 0,05$  vettük. Ábráimon és a táblázatban az átlag + az átlag szórását (SEM: Standard Error of the Mean) tüntettem fel.

## 5 Eredmények

### 5.1 A miR-146a expressziója CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájában

A miR-146a expressziója szignifikánsan magasabbnak bizonyult a makroszkóposan kóros duodenum nyálkahártyájú betegek mintáiban az ép mukózából származó CD-s biopsziákhoz (CD kóros:  $3,21 \pm 0,50$  vs. CD ép:  $0,62 \pm 0,26$ ,  $p \leq 0,01$ ) és a kontroll mintákhoz (CD kóros:  $3,21 \pm 0,50$  vs. Kontroll:  $1,00 \pm 0,33$ ,  $p \leq 0,05$ ) képest. Nem volt különbség az ép CD-s és kontroll minták miR-146a expressziója között (CD ép vs. Kontroll:  $p = \text{N.S.}$ ).

A 7. ábrán látható a korábbi vizsgálati eredményeinkkel történő összehasonlítás is. A colonból származó mintákban a miR-146a szintje magasabb volt a makroszkóposan kóros CD-s mintákban a makroszkóposan ép és kontroll csoporthoz képest (CD kóros:  $6,66 \pm 1,52$  vs. Kontroll:  $1 \pm 0,23$ ,  $p < 0,001$ , CD kóros  $6,66 \pm 1,52$  vs. CD ép:  $1,79 \pm 0,45$ ,  $p < 0,05$ ). Nem volt különbség a kontroll és CD-s ép minták miR-146a expressziójában a colon nyálkahártya esetében sem (CD ép vs. Kontroll:  $p = \text{N.S.}$ ).



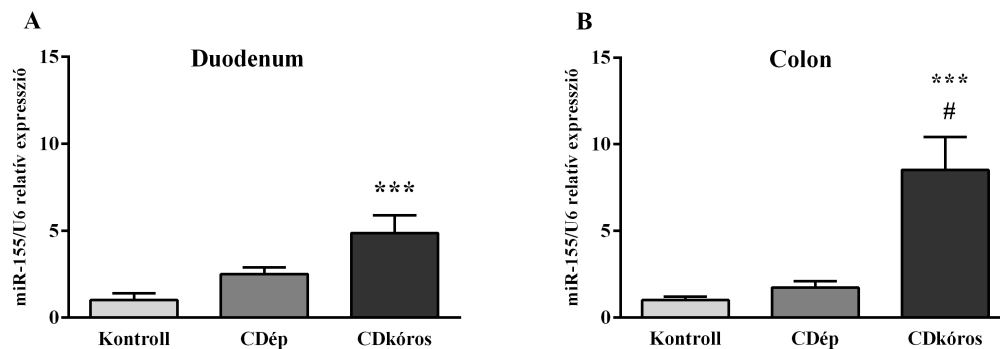
### 7. ábra. A miR-146a expressziója CD-s gyermekek duodenum (A) és colon (B) nyálkahártyájában.

Mindkét lokalizációból származó mintákban a makroszkóposan gyulladt (CDkóros) területeken magasabb expresszió mérhető a kontrollok mintáihoz és a makroszkóposan ép területekhez (CDép) képest. (Colon: \*\*\*:  $p < 0,001$  vs. Kontroll, #:  $p < 0,05$  vs. CDép. Duodenum: \*:  $p < 0,01$  vs. CDép; #:  $p < 0,05$  vs. Kontroll)

## 5.2 A miR-155 expressziója CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájában

A miR-155 expressziója szignifikánsabb magasabb volt a makroszkóposan kóros duodenum nyálkahártyájú betegek mintáiban a kontrollokhoz képest (CD kóros:  $4,87 \pm 1,02$  vs. Kontroll:  $1,00 \pm 0,40$ ,  $p \leq 0,001$ ). Nem volt különbség a CD-s ép és kontroll minták miR-155 expressziója között (CD ép:  $2,50 \pm 0,38$  vs. Kontroll:  $1,00 \pm 0,40$ ,  $p = \text{N.S.}$ ).

A 8. ábrán látható a korábbi vizsgálati eredményeinkkel történő összehasonlítás is. A colonból származó minták miR-155 expressziója emelkedett volt a makroszkóposan gyulladt CD-s biopsziákban a makroszkóposan ép és kontroll biopsziákhoz képest (CD kóros:  $8,52 \pm 1,90$  vs. Kontroll:  $1 \pm 0,21$ ,  $p < 0,001$ , CD kóros:  $8,52 \pm 1,90$  vs. CD ép:  $1,73 \pm 0,38$ ,  $p < 0,05$ ), az ép és kontroll csoport között nem volt különbség.



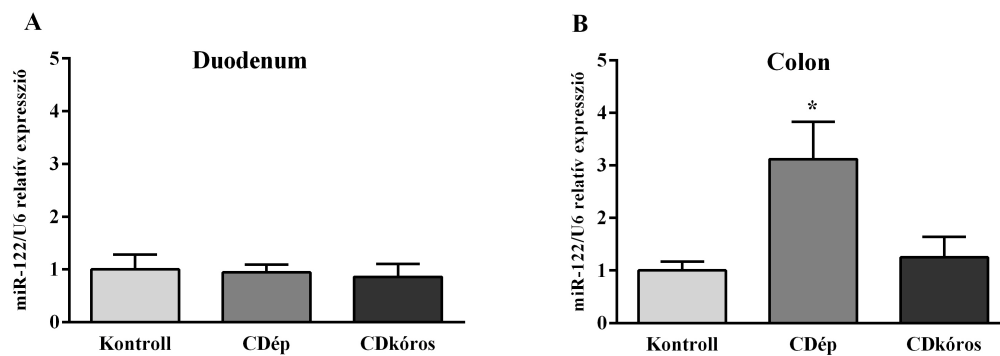
### 8. ábra. A miR-155 expressziója CD-s gyermekek duodenum (A) és colon (B) nyálkahártyájában.

Mindkét helyről származó mintákban a makroszkóposan gyulladt (CDkóros) területeken magasabb expresszió mérhető a kontrollok mintáihoz képest. A duodenum esetén nem volt különbség a makroszkóposan ép területek (CDép) és kontroll minták között. (\*\*\*:  $p < 0,001$  vs. Kontroll, #:  $p < 0,05$  vs. CDép)

### 5.3 A miR-122 expressziója CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájában

Nem volt különbség a CD-s és kontroll duodenum nyálkahártya minták miR-122 expressziója között (CD kóros:  $0,86 \pm 0,25$ , CD ép:  $0,96 \pm 0,14$ , Kontroll:  $1,00 \pm 0,28$ ,  $p=N.S$ ).

A 9. ábrán látható a korábbi vizsgálati eredményeinkkel történő összehasonlítás is. A colonból származó mintákban a miR-122 expressziója magasabb volt a CD-s gyermekek makroszkóposan ép biopsziás mintáiban a kontroll csoporthoz képest (CD ép:  $3,12 \pm 0,71$  vs. Kontroll:  $1 \pm 0,17$ ,  $p < 0,05$ ).



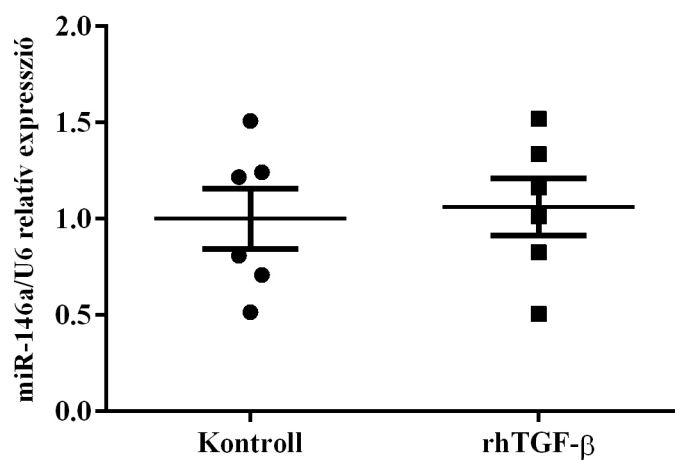
### 9. ábra. A miR-122 expressziója CD-s gyermekek duodenum (A) és colon (B) nyálkahártyájában.

A miR-122 expressziója emelkedett a makroszkóposan ép colon CD-s biopsziákban a kontroll csoporthoz képest. A duodenumból származó mintákban nem volt különbség a CD-s és a kontroll minták között. (\*:  $p < 0,05$ )

#### 5.4 A miR-146a, -155 és -122 expressziója rhTGF- $\beta$ -val kezelt vékonybél epitél sejtekben

A rhTGF- $\beta$  nem befolyásolta a miR-146a expresszióját ( $p=N.S.$ ), azonban csökkentette a miR-155 expresszióját a CCL-241 vékonybél epitél sejtekben a kontrollhoz képest (rhTGF- $\beta$ :  $0,7\pm 0,083$  vs. Kontroll:  $1\pm 0,09$ ,  $p\leq 0,05$ ). A miR-146a expresszió a 10., a miR-155 expresszió változás a 11. ábrán látható.

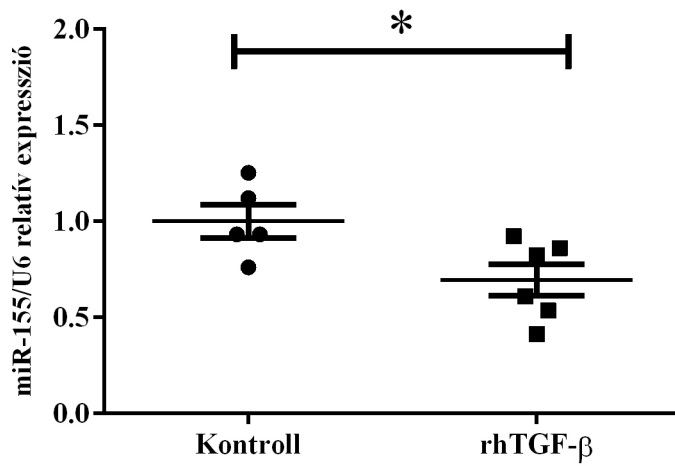
Nem volt mérhető mennyiségű miR-122 a vékonybél epitél sejtekben.



**10. ábra.** A miR-146a expressziója rhTGF- $\beta$ -val kezelt vékonybél epitél sejtekben.

A rhTGF- $\beta$  nem befolyásolta a miR-146a expresszióját a kontroll mintákhoz képest. ( $p=N.S.$ )





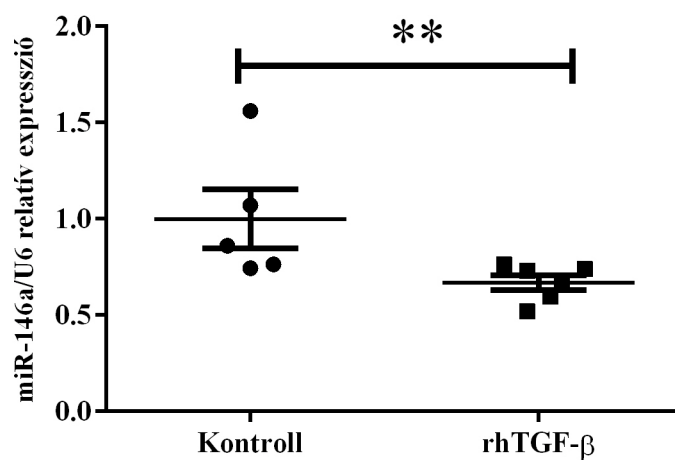
**11. ábra.** A miR-155 expressziója rhTGF-β-val kezelt vékonybél epitél sejtekben.

*A rhTGF-β csökkentette a miR-155 expresszióját a kontroll mintákhoz képest. (\*:  $p < 0,05$ )*

### 5.5 A miR-146a, -155 és -122 expressziója rhTGF- $\beta$ -val kezelt duodenum fibroblasztokban

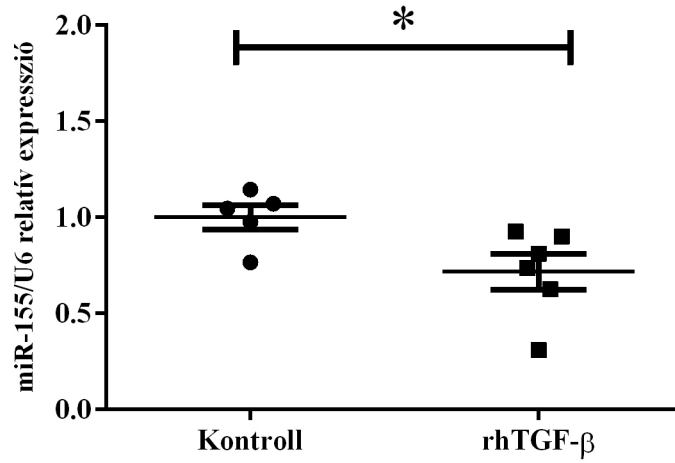
A rhTGF- $\beta$  csökkentette a miR-146a (rhTGF- $\beta$ :  $0,67 \pm 0,04$  vs. Kontroll:  $1 \pm 0,15$ ,  $p \leq 0,01$ ) és miR-155 (rhTGF- $\beta$ :  $0,72 \pm 0,09$  vs. Kontroll:  $1 \pm 0,06$ ,  $p \leq 0,05$ ) expresszióját a duodenum fibroblasztokon a vehikulummal kezelt kontroll sejtekhez képest. A miR-146a expresszió változása a 12., a miR-155-é a 13. ábrán látható.

A rhTGF- $\beta$  kezelés nem befolyásolta a miR-122 expresszióját ( $p = \text{N.S.}$ , 14. ábra).



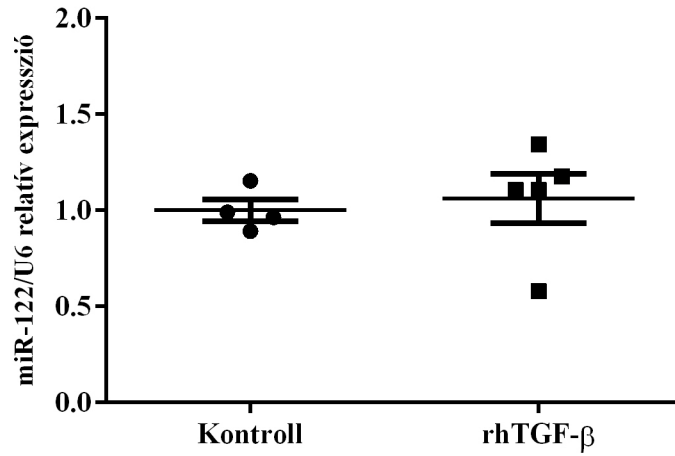
**12. ábra. A miR-146a expressziója rhTGF- $\beta$ -val kezelt duodenum fibroblasztokban.**

A rhTGF- $\beta$  csökkentette a miR-146a expresszióját a kontroll mintákhoz képest. (\*\*:  $p < 0,01$ )



**13. ábra. A miR-155 expressziója rhTGF-β-val kezelt duodenum fibroblasztokban.**

*A rhTGF-β csökkentette a miR-155 expresszióját a kontroll mintákhoz képest. (\*:p<0,05)*



**14. ábra. A miR-122 expressziója rhTGF-β-val kezelt duodenum fibroblasztokban.**

*A rhTGF-β kezelés nem befolyásolta a miR-122 expresszióját a kontroll mintákhoz képest. (p=N.S.)*

## 6 Megbeszélés

Az utóbbi években egyértelművé vált, hogy az IBD incidenciája felnőtt és gyermekkorban is emelkedik. A betegség gyermekkori prevalenciáját és incidenciáját most már pontos hazai adatok is mutatják a 2007 óta működő HUPIR-nak köszönhetően.<sup>2</sup>

Az IBD pontos etiológiája egyelőre ismeretlen. Jelenlegi elképzelések szerint genetikailag fogékony egyéneknél különböző környezeti tényezők (döntően a kóros táplálék) az intesztinális mukóza immunrendszerének kóros aktiválódását okozva vezetnek a gyulladós folyamat elindulásához.<sup>3,4,5</sup>

A betegség diagnózisa esetenként azonban továbbra is jelentős kihívást jelent. Az elmúlt években egyre inkább előtérbe került az igény olyan vizsgálati módszerek bevezetésére, amelyekkel gyorsabban, kíméletesen és költséghatékonyan lehetne a betegség diagnózisát felállítani, az IBD alcsoportok között differenciálni, valamint a kórfolyamatot követni. További igényként merül fel, főleg a gyermekgyógyászat területén, a neminvaszív diagnosztika előtérbe helyezése.

A klasszikus vércémiai vizsgálatokon túl az elmúlt években a mindennapi rutin részévé váltak a különböző antitest vizsgálatok. Azonban ezen markerek szenzitivitása és specificitása önmagában nem alkalmas a diagnózis felállítására és a pontos differenciáldiagnózishoz.<sup>55</sup>

A 2000-es évek végétől ugrásszerűen megnőtt azon közlemények száma, amelyek a ribonukleinsavak egy genetikai információt nem kódoló csoportjának, a miR-ek inflammációban és egyéb patofiziológiai folyamatokban betöltött szerepével foglalkoznak.<sup>8</sup>

Az eddigi közlemények alapján tudjuk, hogy a nagy számú vizsgált miR-ek közül az IBD patomechanizmusában kiemelkedő jelentősége van a miR-146a, -155, és -122-nek.<sup>49,50,51,52</sup>

Azonban az eddig publikált tanulmányok nagyobb részében **felnőtt** betegek mintáit vizsgálták, a gyermek populációban kis számú kutatás történt.

**CD-s gyermekek duodenum mintáival ezeddig egyetlen közlemény sem foglalkozott, annak ellenére, hogy a felső GI traktus érintettsége ebben a kórképben igen gyakori.**

Kutatási célom volt ezért ezen miR-ek expressziójának vizsgálata CD-ben szenvedő gyermekek makroszkóposan ép és gyulladt felső tápcsatornai biopsziás mintáiban. A kapott eredményeket összehasonlítottam korábbi eredményeinkkel, amely során IBD-s gyermekek **colonból** származó mintáit vizsgáltuk.<sup>76</sup>

Az IBD diagnózisának felállításához az ESPGHAN módosított „Portói” kritériumrendszer ajánlásának megfelelően felső tápcsatornai flexibilis endoszkópia is kötelező. A beavatkozást releváns felső GI tünetek hiányában is indokolt elvégezni, a klinikai panaszokat nem okozó nyálkahártya eltérések igazolására.<sup>6</sup> A HUPIR adatai alapján CD-ben a felső GI endoszkópiák 64, UC-ban 40%-ában volt látható releváns lézió. CD-re jellemző eltérés (aphta, fekély, granuloma) a betegek kb. harmadában látszódott, azonban ennél is fontosabb, hogy az esetek 9%-ában az OGD során igazolódott nyálkahártya lézióhoz volt köthető a végső diagnózis felállítása (diagnosztikus hozam).<sup>71</sup>

Mindezek ellenére jelenleg nem áll rendelkezésre olyan specifikus marker, amely lehetővé tenné az egyéb etiológiájú nyálkahártya eltérések pontos differenciálását. Ezek közül a leggyakoribbak a HP infekció, eosinophil enteropathia illetve a gyógyszerhatás okozta nyálkahártya károsodás. A felnőtt populációban a gyakran előforduló HP negatív krónikus aktív gastritis igen nehezen különíthető el a CD-től.<sup>72</sup>

Ezért célul tűztük olyan, duodenum-specifikus miR mintázat feltérképezését, amely lehetővé teheti a betegség etiopatológiájának pontosabb megértését, és a jövőben azon túl, hogy diagnosztikus markerként segíthetné a kórisme felállítását, potenciális terápiás targetként is funkcionálhatna.

A közelmúlt kutatási eredményei igazolták a miR-146a, -155 és -122 jelentőségét az immunrendszer számos működési folyamatában. Kiemelt fontosságú regulátorai a gyulladáshoz való válasz kialakulásának, intracelluláris kaszkád mechanizmusoknak, citokin termelésnek, valamint a bakteriális invázióra adott válaszreakciónak. Ezen folyamatok mindegyikének jelentős szerepe van az IBD patomechanizmusában.

A kezdeti vizsgálatok közös jellemzője, hogy **felnőtt** betegek szövetmintáiból mutatták ki az miR-eket, illetve a target géneket. Azonban a miR-ek reprodukálhatóan és konzisztensen izolálhatóak szérumból és egyéb testnedvből is. Ezen fontos tulajdonság az alapja a lehetséges neminvazív diagnosztikai markerként történő felhasználásra. Korábbi vizsgálatok már igazolták, hogy malignus tumorok esetén a keringő miR-profil jól korrelál a szövetekből kimutathatóval.<sup>77</sup>

Wu és munkatársai 2008-ban voltak az elsők, akik felnőtt IBD betegek vastagbél nyálkahártyájában vizsgálták a miR-ek expresszióját.<sup>78</sup> Tizenegy olyan miR-t írtak le, amelyek aktív UC-s betegek nyálkahártyájában szignifikánsan magasabb szinten expresszálódtak, mint az egészséges kontrollok esetén. Ezen felül fordított arányosságot igazoltak a makrofágok és colon epitél sejtek által termelt, a kemotaxisban, ezáltal a gyulladással kapcsolatban szerepet játszó makrofág inhibitor peptid (MIP)-2a és a miR-192 között. Ezen úttörő munka új ablakot nyitott az IBD patogenezisének megértéséhez.

2010-ben három kiemelkedő fontosságú tanulmány került publikálásra, valamennyi felnőtt IBD-ben. Takagi munkacsoportja 12 UC beteg mintáját hasonlította 12 egészségeséhez, és igazolta a miR-21 és -155 emelkedett szintjét a gyulladt szövetben.<sup>79</sup> Fasseu és munkatársai 300 különböző miR-t vizsgáltak UC, CD, valamint a kontroll populáció vastagbél nyálkahártya biopsziás mintáiból. A vizsgálat jelentősége, hogy nemcsak olyan miR-t kerestek, amelynek expressziója aktív IBD-szek szövetmintájában emelkedik, hanem olyanokat, amelyek mintázata különbözik CD-ben és UC-ben, így segíthetnek a két betegségcsoport közötti differenciáldiagnosztikában.<sup>80</sup> Wu következő közleményében a 467 vizsgált miR-ből 9 olyat igazolt, amelyek eltérő lokalizációban expresszálódtak kifejezettebben. Öt közülük a sigmabélben, 4 a terminalis ileumot érintő CD esetén expresszálódott fokozottan.<sup>31</sup>

Iborra és mtsai. több, mint 700 miR-t vizsgáltak aktív és inaktív CD és UC felnőtt betegek szövet- és szérummintáiban. Hét olyan miR-t (miR-18a, -140-3p, -328, -422a, -629, -885-5p és let-7b) igazoltak, amelyek expressziója eltért az aktív és inaktív CD-s colon nyálkahártya biopsziáiban, valamint hat olyat (miR-188-5p, miR-877, miR-140-5p, miR-145, miR-18a, miR-128), amelyek ezen csoportok szérumában mutattak eltérő expressziót.<sup>5</sup>

Schaefer munkacsoportjának eredményeiben emelkedett miR-31, -101 és -146, és csökkent miR-375 szintet találtak felnőtt CD-s betegek colon biopsziáiban a kontrollokhoz képest, és kilenc miR (miR-21, miR-31, miR-101, miR-142-3p, miR-142-5p, miR-155, miR-223, miR-375, és miR-494) esetében igazoltak fokozott expressziót makroszkóposan gyulladt nyálkahártya esetén intakt colon mukózával összehasonlítva. CD betegek vérmintáiban csökkent miR-21, miR-31, miR-146a, és miR-155, valamint emelkedett miR-101 és miR-375 mennyiséget mértek a kontroll csoporthoz képest.<sup>81</sup>

Kiemelt jelentőségű Lin és munkacsoportjának közleménye, amelyben azon túl, hogy négy olyan miR-t igazoltak (miR-31, -206, -424, -146), amelyeket az IBD specifikus markereinek tartanak, a miR-31 expresszióját mind friss, fagyasztott szövetből és **formalinban fixált**, paraffinba ágyazott mintából is egyaránt sikerült kimutatni felnőttekben.<sup>82</sup>

Pekow és munkatársai a tumorszuppresszor hatású miR-143 és -145, valamint a célgénjeik, az inzulin receptor szubsztrát (IRS)-1 (miR-145), Kirsten patkány szarkóma (K-RAS), apoptózis inhibitor (API)-5 és MAPK kináz-2 (miR-143) között írtak le fordított korrelációt.<sup>47</sup> Nguyen jelentősen csökkent miR-7-szintet talált CD betegek gyulladt vastagbél nyálkahártyájában. Ezen miR célgénje a CD98, amelynek expresszió változása befolyásolja az enterocyták fiziológiás proliferációját és differenciációját.<sup>31</sup> Bian és munkatársai szintén colon nyálkahártya vizsgálata során írta le a miR-150 emelkedett szintjét, amelynek célgénje az apoptózisban szerepet játszó c-Myb protoonkogén.<sup>31</sup>

A miR-ek **gyermekkori IBD**-ben betöltött szerepével időrendben később jelentek meg kutatási adatok.

Az első vizsgálati eredményeket Zahm és munkacsoportja publikálták 2011-ben. A vizsgálatuk célja új **szérum** biomarkerek feltérképezése volt, a munka során CD és coeliakia betegek szérumát hasonlították össze egészségesekével. A 667 vizsgált miR közül 11, a miR-16, let-7b, miR-195, miR-106a, miR-20a, miR-30e, miR-140, miR-484, miR-93, miR-192 és miR-21 mutatott fokozott expressziót. Klinikai biomarkerként a miR-484 és let-7b szenzitivitása több, mint 80% volt.<sup>83</sup> Következő vizsgálatukban szérum, valamint rectum biopsziás mintákat vizsgáltak UC-s, vastagbél lokalizációjú CD-s és egészséges gyermekekben. Eredményeikben 21 eltérően expresszálódó miR-t igazoltak, de csak a miR-24 esetében volt eltérő kifejeződés a CD-s és UC-s csoport között, és a szérum miR mintázat sem különbözött.<sup>84</sup>

Koukos miR-124 hatását vizsgálta az IBD patomechanizmusában szerepet játszó STAT-3 expressziójára. A vizsgálatban igazolták, hogy az IL-6-STAT-3 jelátviteli útvonal nemcsak felnőtt, de gyermekkorban is felülvezérelt. A betegség kialakulása mellett ezen szabályozó mechanizmusnak jelentős szerepe van a betegség malignizálódásában is. A folyamat fontos regulátora a miR-124, amelynek nyálkahártya szöveti mennyisége fordítottan arányos a STAT-3 expresszióval.<sup>85</sup> A munkacsoport következő vizsgálatában 24 diszregulált miR-t igazoltak UC-s



gyermek colon nyálkahártyájából. A legkifejezettebb expressziós eltérést a miR-4284 esetében írták le.<sup>86</sup>

Az eddig tárgyalt immunológia folyamatokban számtalan miR játszik szerepet. Az IBD, és ezen belül a CD patogeneziséből három jelentős miR-t emelek ki, amelyek a munkacsoportunk kutatásában szerepelnek. A miR-146a, -155 és -122 által az immunrendszer működésében befolyásolt célgéneket és az ezáltal szabályozott folyamatokat a 15. ábrán foglaltam össze. Az ezen miR-ek felnőtt- és gyermekkori IBD-ben betöltött szerepével foglalkozó eddigi közleményeket a 4. és 5. táblázatban tüntettem fel.

A **miR-146a** kiemelt helyet foglal el a veleszületett és szerzett immunrendszer sejtjeinek differenciációjának és funkciójának szabályozásában. A gyulladásos kórképek mellett számos tumor esetében igazolták diszregulált működését. A miR-146a az NF- $\kappa$ B útvonal negatív regulátora. A sejt felszíni TLR4 receptor aktiválódását követően az IRAK1-et és TRAF6-ot tartalmazó kaskád az NF- $\kappa$ B inhibitor alfa (I $\kappa$ B $\alpha$ ) foszforilációjához és degradációjához vezet, amellyel az NF- $\kappa$ B aktiválódik és a nukleuszba transzlokálódik, számos gén, közöttük a pri-miR-146a aktivációját okozva. Visszakerülve a sejt plazmába, a miR-146a-RISC komplex az IRAK1 és TRAF6 gátláson keresztül a jelátvitel attenuátora. Azonban ezen túl a miR-146a TNF- $\alpha$  termelés regulátora is, és szerepet játszik az endotoxin tolerancia szabályozásában. Ezen hatásokat figyelembe véve a miR-146a-ra, mint a gyulladásos folyamat finomhangolójára tekinthetünk.<sup>87</sup>

A **miR-155** a jelentős szerepet játszik a gyulladásos folyamat elindításában a monocyta-makrofág rendszeren keresztül. A bakteriális LPS mellett miR-155 indukciót vált ki a gyulladásos mediátor IFN- $\beta$  polyribonucleosinic-polyribocytidylic sav (poly IC) és a TNF- $\alpha$  is. A miR-155 expressziót a JNK és MAPK útvonal szabályozza.<sup>88</sup>

Az áttekintett kutatások, valamint a saját korábbi eredményeinket figyelembe véve kijelenthető, hogy a miR-146a és -155 expressziója a GI traktus vizsgált részein (duodenum, colon, rectum) gyulladt CD-s nyálkahártyából származó mintákban emelkedett volt. Ez alapján feltételezhető, hogy ezen miR-ek gyulladás specifikusak, függetlenül a mintavétel helyétől.<sup>76,89,81,82,90,91,79,92</sup> Azonban a gyulladásos folyamatban betöltött szerepük már nem ennyire nyilvánvaló. Mind *in vitro*, mind *in vivo* vizsgálatok igazolták a miR-146a és -155 immunválaszban betöltött eltérő szerepét. Míg az előbbi a szuppresszor válasz jelentős befolyásolója, a miR-155 a gyulladás folyamatának elősegítője.<sup>93,94</sup>

Szemben a miR-146a és -155 esetében találtakkal, a **miR-122** expressziós mintázata különbözik a GI eltérő részein. Míg a CD gyermekek ép colon nyálkahártyájában emelkedett a miR-122 szintje, a duodenumból származó minták esetében nem volt különbség a CD-ben szenvedők és kontrollok között. Ennek magyarázata lehet Chen és mtsainak eredménye. Vizsgálatukban igazolták, hogy a miR-122 gátolja az LPS indukálta NOD2 expressziót, az NF- $\kappa$ B szignálfolyamatot, és a proinflammatorikus citokin termelést, ezáltal csökkentve a bélnyálkahártya károsodását.<sup>42</sup> Azonban a miR-122 funkciója nem ennyire egyértelmű, a fentiekkel ellentétben, az IBD patomechanizmusában jelentős folyamatok elősegítésében is igazolódott már a szerepe. TNF- $\alpha$  kezelés hatására enterocytákban, sejt kultúrákban és intesztinális szövetben ugrásszerűen megnő a miR-122 expresszió, amely az occludin mRNS 3' végéhez kapcsolódva annak degradációját okozza, ezzel a „tight junction” funkció károsodásához, a bélpermeabilitás fokozódásához vezet.<sup>95,52</sup>

Az általunk vizsgált miR-ek döntően a gyulladásos folyamatok, apoptózis, érújdonképződés általános mediátorai, finomszabályozó elemei, azonban egyes miR-ek specifikusak lehetnek.

HP infekció esetén mind a miR-155, mind a -146a expressziója emelkedett lehet, ez azonban nem specifikusan a baktériumra adott válasz, hanem az ismert, gyulladásban szerepet játszó szignáltranszdukciós utakban bekövetkező változás.<sup>96</sup> Ezek mellett számos miR expressziója változik HP infekció kapcsán. Emelkedik a miR-223, és csökken a miR-129-1-3p és -129-2-3p szintje. Ígéretes diagnosztikus eszköz a szérumból miR vizsgálat HP okozta gyomorrák és mukóza-asszociált limfóma esetében is. A miR-223, -22, -218, és -25 fokozottan expresszálódott gyomorrák és metasztázis esetén, a miR-10b, -21, -223, -338, 30a-5p, -126, valamint let7a jó pozitív korrelációt mutatott a korai rák diagnózisával.<sup>97,98</sup>

Az eosinophil oesophagitisen (EoE-en) kívül kevés adat áll rendelkezésre a miR-ek eosinophil gasztrointesztinális kórképek patomechanizmusában betöltött szerepéről.

Zahm és munkacsoportja EoE betegek biopsziás és szérumbelvételeit vizsgálta. Emelkedett miR-223, -21, -142-3p, -142-5p, -29a, -20a, -221, -126, -106b és -15a, valamint csökkent miR-99a, -210, -203, -375 expressziót igazoltak a szövetmintákban, azonban a szérumbelvételek során nem volt változás a vizsgált miR profilban.<sup>99</sup>

Lu és munkacsoportja közleményének jelentősége, hogy aktív és remisszióban lévő EoE betegek szövetmintáit hasonlította össze. Vizsgálatuk során harminckét diszregulált miR jelenlétét igazolták, amelyek közül a legkifejezettebben emelkedett

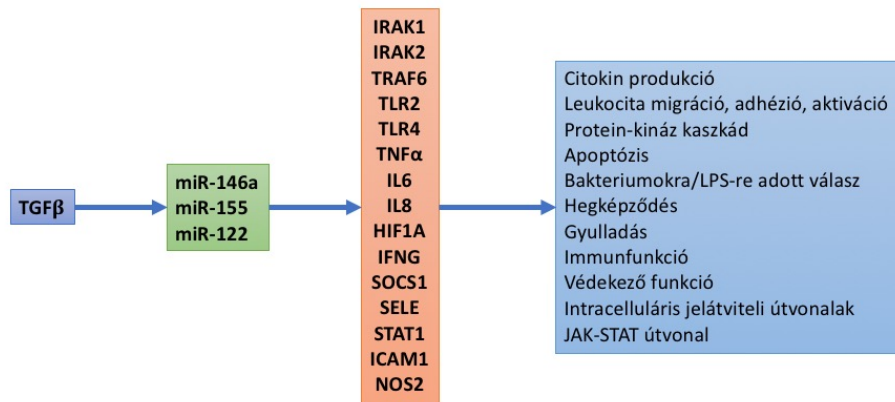
miR-21 és -223, valamint csökkent miR-375 expressziója szoros korrelációt mutatott a szöveti eosinophilia mértékével. A miR kifejeződés változása glükokortikoid kezelésre reverzibilis volt. A szérumbizsgálattal a legkifejezettebb eltérést a miR-146a, -146b és -223 mutatta.<sup>100</sup>

Az EoE-n kívül az elmúlt években más allergiás eredetű gyulladáshoz kórképek (asztma, allergiás rhinitis, atópiás ekcéma) esetében is jelentős miR-eket érintő vizsgálatokat végeztek. Az allergia patomechanizmusának kulcslépéseiben eltérő miR mintázat igazolható. A szerzett immunitást és T-sejt működést befolyásolja a miR-146 és -21, az eosinophil sejtek érését a miR-21 és -223, és az interleukin(IL)-13 függő epiteliális reakciót elsősorban a miR-375.<sup>101</sup>

Munkacsoportunk –elsőként– eosinophil colitises gyermekek colon biopsziás mintáit vizsgálva igazolta a miR-21, -99b, -146a, -221, és -223 a szöveti eosinophiliával korreláló expresszió emelkedését.<sup>102</sup>

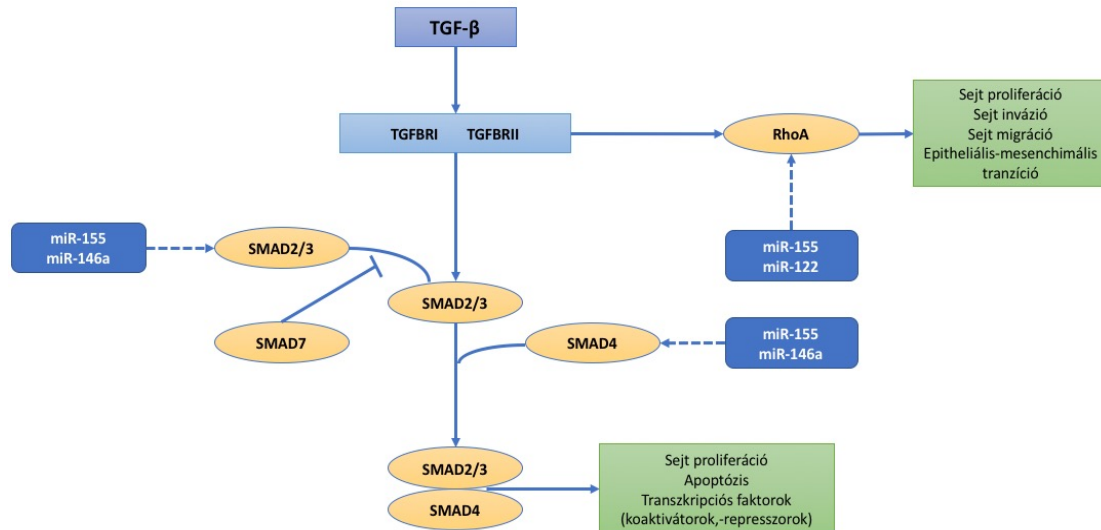
Korábbi vizsgálatainkban, RT-PCR méréseink során számos olyan miR eltérő expressziója igazolódott CD-ben és UC-ben (miR-99b, -141, -142-3p és -5p) amelyek feladata még nem tisztázott, így ezek betegségspecifikusak lehetnek, így további vizsgálatok tárgyát képezik.

A gyulladáshoz folyamat számos tényezője befolyásolja a miR expresszió változását, azonban a miR-146a, -155 és -122 pontos szabályozó mechanizmusai nagyrészt ismeretlenek. Az egyik legjelentősebb ilyen befolyásoló faktor az anti-inflammatorikus TGF- $\beta$  (15. ábra).<sup>103,104,105</sup>



**15. ábra. A transzformáló növekedési faktor (TGF)- $\beta$  által, a mikroRNS (miR)-146a, -155, és -122 keresztül a gyulladásos folyamatban befolyásolt gének és folyamatok.**  
(Rövidítések részletezve a rövidítésjegyzékben.)

Azonban a miR-146a, -155 és -122 is számos ponton befolyásolhatja a TGF- $\beta$  szignál transzdukciós útvonalát, ezáltal szabályozva a sejt migrációs, inváziós, proliferációs és apoptotikus folyamatokat. Ezen felül a TGF- $\beta$  a transzkripció regulálásával a génexpresszióra is hatással van. A TGF- $\beta$  mediált szignál folyamatra ható faktorokat a 16. ábrán foglaltam össze.



**16. ábra. A transzformáló növekedési faktor (TGF)-β és a mikroRNS (miR)-146a, -155, és -122 hatásmechanizmusának kapcsolódási pontjai sematikusán ábrázolva.**

*Forrás: MiRTarBase Adatbázis. SMAD: small body size (SMA) + Mothers against decapentaplegic homolog (MAD); RhoA: Ras homológ gén család, A tag.*

A TGF-β-hoz köthető, az IBD patomechanizmusában kulcsfontosságú regulációs mechanizmusok miatt célom volt a TGF-β és miR-146a, -155 és -122 közötti kapcsolat vizsgálata. Kutatásom eredményei szerint a rhTGF-β kezelés csökkentette a miR-155 expresszióját a CCL-241 vékonybél epitél sejteken és duodenum fibroblasztokon, valamint a miR-146a expresszióját a duodenum fibroblaszt sejteken, azonban a rhTGF-β nem befolyásolta a miR-122 expresszióját egyik sejtvonalon sem.

IBD-ben a gyulladt bélszakaszok TGF-β expressziója fokozódik, azonban a foszforilált SMAD3 szint csökkent, és a SMAD4 komplex képzés sérül, a TGF-β mediált szignál folyamat a fokozott expresszió ellenére elégtelenné válik.<sup>106</sup> Ezen túlmenően a SMAD7 – amely a TGF-β szignál endogén inhibitora – szintje emelkedik, ami pro-inflammatorikus citokin produkcióban nyilvánul meg, fenntartva a gyulladós folyamatot.<sup>107,108</sup> Ezen patofiziológiai út blokkolása ígéretes terápiás lehetőséget kínál, a fázis II klinikai vizsgálatban a SMAD7 antiszenz oligonukleotid *mongersen per os* adása felnőtt CD 60%-ában remisszió eléréséhez vezetett.<sup>109</sup>

Szintén a TGF-β mediált szignál folyamathoz kapcsolódóan befolyásolja az IBD kialakulását a Rho fehérjéinek csoportja. A RhoA aktivációja CD-ben emelkedik.

Jelentősége, hogy az NF- $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , és TNF- $\alpha$  útvonal, ezáltal a sejt adhéziós, migrációs, proliferációs és fagocitózis folyamatok szabályozásában is szerepet játszik.<sup>110,111</sup>

Chondrocytákban, újszülött femurból származó csont eredetű őssejtekben és gyomorrák sejtvonalban a miR-146a csökkenti a SMAD2/3 és SMAD4 expresszióját. Monocytaiban, valamint méhnyak és prosztata ráksejtekben a miR-155 szintén negatív regulátora a SMAD2/3-nak, ezáltal jelentősen befolyásolva a TGF- $\beta$  jelátviteli utat.<sup>112,113,114,115</sup> A SMAD rendszer regulálásán túl, a miR-155 és -122 szignifikánsan csökkenti a RhoA expressziót, melynek a TGF- $\beta$  indukálta epitéliális-mezenchimális tranzíció, sejt migráció és invázió szabályozásában van jelentősége.<sup>116,117</sup>

Vizsgálatom eredménye szerint a miR-146a, és -155 expressziója emelkedett a gyulladt **duodenum** nyálkahártyában. Ez igazolja az IBD patomechanizmusában CD specifikus gyulladási markerként betöltött jelentős szerepüket. A vizsgált miR-ek eltérő expressziós mintázata valószínűsíti, hogy a miR-146a és -155 független, míg a -122 függ a betegség lokalizációjától. Ezen túlmenően igazolódott, hogy az anti-inflammatorikus rhTGF- $\beta$  a miR-155 negatív regulátora duodenum fibroblaszt és vékonybél epitél sejtekben, miR-146a esetében az előbbi sejtenyészetben, ami a TGF- $\beta$  egy eddig ismeretlen hatását tárta fel.

Eredményeim jelentősége, hogy kutatási alapot szolgáltat ezen miR-ek potenciális diagnosztikus markerként és terápiás targetként való felhasználására.

**4. táblázat. A legfontosabb eddigi közlemények a miR-146a, -155, és -122 felnőttkori gyulladásos bélbetegségben betöltött szerepéről.**

(CD: Crohn-betegség, UC: colitis ulcerosa, 5-ASA: 5-aminoszalicilsav, AZA: azathioprin, IFX: infliximab, MTX: methotrexate, CC: kollagén colitis, LC: lymphocytás colitis, (H)R: (hisztopatológiai) remisszió, MSI: mikroszatellita instabilitás, MSS: mikroszatellita stabil, CRC: colorectalis carcinoma, L2: vastagbél érintettségű CD, TNF: tumor nekrozis faktor, N/A: nem áll rendelkezésre adat, ↑: fokozott expresszió, ↓: csökkent expresszió

Minta típusa	Beteg alapadatok (átlagéletkor: év)	Betegség aktivitás	Kezelés	Eredmény	Szerző
szigmabél myofibroblast	UC: n=8 átlagéletkor: 42 CD: n=8 átlagéletkor: 39 kontroll: n=8 átlagéletkor: 55	aktív	UC: 5-ASA 100% CD: 5-ASA 75% Semmi 25%	MiR-155 ↑: UC-s myofibroblastokban a kontrollokhoz és CD-hez képest	<b>Pathak et al., 2015</b> <sup>118</sup>
szigmabél biopszia	UC: n=20 átlagéletkor: 42.6 kontroll: n=16 átlagéletkor: 52.2	aktív	5-ASA 100% Szteroid 10%	MiR-155 és -146a ↑: UC-sek szigmabél biopsziáiban a kontrollokhoz képest.	<b>Min Min et al., 2014</b> <sup>119</sup>
colon biopszia	CD: n=8 átlagéletkor: 37.6 kontroll: n=10 átlagéletkor: N/A	aktív inaktív	5-ASA 25% Szteroid 25% AZA 25% IFX/MTX 13%	MiR-155 és -146a ↑: CD-sek gyulladt és ép colon nyálkahártyájában a kontrollokhoz képest	<b>Fasseu et al., 2010</b> <sup>92</sup>
colon biopszia	UC: n=12 átlagéletkor: 48.8 kontroll: n=12 átlagéletkor: 58.2	aktív	N/A	MiR-155 ↑: UC-sek gyulladt colon nyálkahártyájában a kontrollokhoz képest	<b>Takagi et al., 2010</b> <sup>79</sup>

## 4. táblázat folytatása

colon biopszia	aktív UC: n=6 átlagéletkor: 52 inaktív UC: n=10 átlagéletkor: 59 kontroll: n=11 átlagéletkor: 58.6	aktív inaktív	5-ASA: 75% Semmi: 25%	MiR-155 és -146a ↑: aktivitást mutató UC-sek colon nyálkahártyájában a kontrollokhöz és inaktív betegekhez képest	<b>Günaltay et al., 2014</b> <sup>91</sup>
colon biopszia	IBD: n=18 átlagéletkor: 37 IBD-hez társult CRC: n=20 átlagéletkor (MSI): 53.5 átlagéletkor (MSS): 49.6 nem-IBD-hez társult CRC: n=62 átlagéletkor: örklődő MSI: 58.6 sporadikus MSI: 74.5 sporadikus MSS: 68.6 kontroll: n=20 átlagéletkor: 66.1	inaktív	N/A	MiR-155 ↑: neoplasiás és nem-neoplasiás CRC-s IBD-sek nyálkahártyájában és CRC nélküli IBD-sek nyálkahártyájában	<b>Svrcek et al., 2013</b> <sup>90</sup>
colon biopszia	CD: n=9 átlagéletkor: 42 UC: n=10 átlagéletkor: 46 kontroll: n=18 átlagéletkor: 46	aktív	N/A	MiR- 146a ↑: CD-sek és UC-sek colon nyálkahártyájában a kontrollokhöz képest	<b>Lin et al., 2014</b> <sup>82</sup>



## 4. táblázat folytatása

colon biopszia	CD: n=42 átlagéletkor: 42.7 UC: n=41 átlagéletkor 47.6 kontroll: n=35 átlagéletkor: 56.6	aktív inaktív	N/A	MiR-155 ↑: aktív CD-sek colon nyálkahártyájában az endoszkóposan inaktív CD-sekhez képest  MiR-146 és -155 ↑: UC-sek endoszkóposan érintett colon nyálkahártyájában az érintetlenhez képest	<b>Schaefer et al., 2015</b> <sup>81</sup>
colon biopszia	CD: n=4 átlagéletkor: N/A UC: n=2 átlagéletkor: N/A	IBD-s, neoplasia nélkül, dyplasia, rák	Immuno- szuppresszív szer nélkül	MiR-122 ↑: CD-ben nem-neoplasiástól dysplasiás nyálkahártyáig  MiR-122 ↓: CD-ben dysplasiától carcinómáig	<b>Kanaan et al., 2012</b> <sup>89</sup>

**5. táblázat. Eddigi közlemények a miR-146a, -155, és -122 gyermekkori gyulladós bélbetegségben betöltött szerepéről.**  
 (CD: Crohn-betegség, UC: colitis ulcerosa, 5-ASA: 5-aminosalicilsav, AZA: azathioprin, IFX: infliximab, MTX: methotrexate, 6-MP: 6 mercaptopurin, L2: vastagbél érintettségű CD, TNF: tumor nekrozis faktor, ↑: fokozott expresszió)

Minta típusa	Beteg alapadatok (átlagéletkor: év)	Betegség aktivitás	Kezelés	Eredmény	Szerző
rectum biopszia	CD (L2): n=12 átlagéletkor: 15.4 UC: n=18 átlagéletkor: 15.8 Kontroll: n=20 átlagéletkor: 14.8	aktív inaktív	CD: Szteroid 25% Anti-TNF: 25% MTX/6-MP: 17% Enteralis táplálás: 0% UC: Szteroid 61% Anti-TNF: 17% MTX/6-MP: 17% Enterális táplálás: 0%	MiR-146a ↑: UC betegek rectum nyálkahártyájában a kontrollokhoz képest	<b>Zahm et al.</b> , 2014 <sup>84</sup>
colon biopszia	CD gyulladt: n=24 átlagéletkor: 12.9 CD ép n=14 átlagéletkor: 12.9 UC: n=10 átlagéletkor: 11.8 Kontroll: n=23 átlagéletkor: 8.57	gyulladt, ép	5-ASA: 21%  Szteroid: 8%  AZA: 25%  anti-TNF: 4%	MiR-146a és -155↑: CD és UC betegek gyulladt colon nyálkahártyája a kontrollokhoz képest  miR-122 ↑: CD betegek ép nyálkahártyájában a kontrollokhoz képest	<b>Béres et al.</b> , 2016 <sup>76</sup>

## 7 Következtetések

Vizsgálataink alapján az alábbi új megállapításokat tehetjük:

1. A miR-146a és -155 expressziója emelkedett a CD-s gyermekek gyulladt duodenum nyálkahártyájában.
2. Ezen eredmények megegyeznek a korábbi vizsgálati eredményünkkel, ahol a gyulladt colon nyálkahártyában igazoltunk emelkedett miR-146a és -155 szintet.
3. Előző (colon) kutatási eredményünkkel ellentétben a duodenum biopsziás mintákban nem találtam eltérő miR-122 expressziót a vizsgálati csoportok között.
4. A gyermekkori Crohn-betegek gyulladt duodenum nyálkahártyájában mérhető emelkedett miR-146a és -155 expresszió a gyulladáshoz kapcsolódó folyamat patomechanizmusában betöltött gyulladásspecifikus szerepüket igazolja.
5. A miR-146a és -155 a gyulladás lokalizációjától független, a miR-122 ettől függő expressziót mutat.
6. Az anti-inflammatorikus rhTGF- $\beta$  a miR-155 negatív regulátora duodenum fibroblaszt és vékonybél epitél sejteken, miR-146a esetében az előbbi sejttényészetén.
7. Ezen eredmények jó alapot képeznek a kiválasztott miR-ek további vizsgálatához, amely lehetővé teszi, hogy a jövőben potenciális diagnosztikus markerként vagy terápiás targetként kerüljenek felhasználásra.

## 8 Összefoglalás

A Crohn-betegség (CD) egy krónikus, immunmediált gyulladós folyamat, amely gyermekkorban jelentős százalékban felső tápcsatornai érintettséggel jár. A betegség patofiziológiájában kiemelkedő az epigenetikai faktorok, köztük a mikro-RNS-eknek (miR) a gyulladós folyamatban betöltött szerepe. Azonban az eddigi tudományos közlemények között **nincs adat a gyermekkori CD felső tápcsatornai miR mintázatáról**. Kutatásom alapját munkacsoportunk korábbi vizsgálatai képezik, amely során emelkedett miR-122, -146a és -155 mintázatot igazoltunk CD-s gyermekek gyulladt vastagbél nyálkahártya biopsziás mintáiban.

Kutatásom elsődleges célja a miR-146a, -155 és -122 expressziójának meghatározása volt Crohn-beteg gyermekek duodenum nyálkahártyájából származó biopsziás mintáiban. A kapott eredményeket összehasonlítottam a korábbi, colon biopsziás mintákban mért miR expressziós értékekkel. Tekintettel az anti-inflammatorikus TGF- $\beta$  gyulladós folyamatokban betöltött szerepére, további célom volt a rhTGF- $\beta$  ezen miR-ekre kifejtett hatásának vizsgálata vékonybél epitél és duodenum fibroblaszt sejteken.

Vizsgálatom eredményeként **elsőként igazoltam emelkedett miR-146a és -155 expressziót** terápia-naív CD-s gyermekek gyulladt duodenum nyálkahártyájában. Ezen eredmények egybevágóak a korábbi colon biopsziás eredményeinkkel, azonban a miR-122 esetében az előzőekkel ellentétben nem találtam fokozott expressziót. A rhTGF- $\beta$ -val kezelt sejttenyészetek vizsgálatakor csökkent miR-155 expressziót igazoltam mind a vékonybél epitél, mind a primer duodenum fibroblaszt mintákon, míg a miR-146a expresszió csak a duodenum fibroblaszt tenyészetben igazolódott csökkent mennyiségűnek. A rhTGF- $\beta$  kezelésnek egyik sejtvonalon sem volt hatása a miR-122 kifejeződésére.

A gyermekkori Crohn-betegek gyulladt vékonybél nyálkahártyájában mérhető emelkedett miR-146a és -155 expresszió a gyulladós folyamat patomechanizmusában betöltött szerepüket igazolja.

Az anti-inflammatorikus rhTGF- $\beta$  a miR-155 negatív regulátora duodenum fibroblaszt és vékonybél epitél sejteken, miR-146a esetében az előbbi sejttenyészetben.

Ezen eredmények jó alapot képeznek a kiválasztott miR-ek további vizsgálatához, amely lehetséges eredményeként a jövőben potenciális diagnosztikus markerként vagy terápiás targetként kerülhetnek felhasználásra.

## 9 Summary

Crohn disease (CD) is a chronic immune-mediated disorder frequently characterized by lesions in the upper gastrointestinal (GI) tract, primarily in pediatric patients. Recently, epigenetic factors including microRNAs (miRs) have come into focus as potent modulators of the progression of the disease; however, the expression profile of miRs in the **upper GI region** of pediatric CD patients is yet completely **unknown**.

Our working group has previously investigated the expression of miR-146a, -155 and -122 in the inflamed colonic region of pediatric IBD patients. In that study we observed elevated expression levels of all three analyzed miRs.

The aim of the present study was to investigate the mucosal expression of miR-146a, -155 and -122 in the upper GI tract of children with CD. Thereafter I compared the obtained results with our previous findings. My next aim was to examine the effect of anti-inflammatory recombinant human transforming growth factor (rhTGF)- $\beta$  on their expression of CCL-241 small intestinal epithelial and primary duodenal fibroblast cells.

**For the first time**, I demonstrated the elevated expression of miR-146a and -155 in the macroscopically inflamed duodenal mucosa of newly diagnosed, treatment-naive pediatric patients with CD compared to the control group. These results are in accordance with our previous observations demonstrating the increased expression of miR-146a and -155 in the inflamed colonic region of pediatric IBD patients. However, in contrary to our earlier observations related to the colon, I have found unchanged expression of miR-122 in the duodenal mucosa of children with CD. Following rhTGF- $\beta$  treatment, I observed downregulation of miR-155 in both small intestinal epithelial and primary duodenal fibroblast cells and reduced expression of miR-146a in duodenal fibroblasts. However, rhTGF- $\beta$  had no effect on the expression of miR-122 either in epithelial or in fibroblast cells.

Increased expression of miR-146a and -155 in the inflamed intestinal mucosa of pediatric patients with CD suggests their involvement in the pathomechanism of CD as inflammation-specific markers. Anti-inflammatory rhTGF- $\beta$  is a negative regulator of miR-155 in the small intestinal epithelial and primary duodenal fibroblast cells, and miR-146a in the latter. The recent data provide a baseline to explore the possible use of these miRs as diagnostic markers or their potential role as therapeutic targets.

## 10 Irodalomjegyzék

1. Levine A, Griffiths A, Markowitz J, Wilson DC, Turner D, Russell RK, Fell J, Ruemmele FM, Walters T, Sherlock M, Dubinsky M, Hyams JS. (2011) Pediatric modification of the Montreal classification for inflammatory bowel disease: The Paris classification. *Inflamm Bowel Dis*, 17:1314-1321.
2. Müller KE, Lakatos PL, Arató A, Kovács JB, Várkonyi Á, Szűcs D, Szakos E, Sólyom E, Kovács M, Polgár M, Nemes É, Guthy I, Tokodi I, Tóth G, Horváth Á, Tárnok A, Csozszánszki N, Balogh M, Vass N, Bódi P, Dezsőfi A, Gárdos L, Micskey É, Papp M, Cseh Á, Szabó D, Vörös P, Veres G. (2013) Incidence, Paris Classification, and Follow-up in a Nationwide Incident Cohort of Pediatric Patients With Inflammatory Bowel Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 57:576-582.
3. Bousvaros A, Sylvester F, Kugathasan S, Szigethy E, Fiocchi C, Colletti R, Otley A, Amre D, Ferry G, Czinn SJ, Splawski JB, Oliva-Hemker M, Hyams JS, Faubion WA, Kirschner BS, Dubinsky MC, Merrick M. (2006) Challenges in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 12:885-913.
4. Sauer CG, Kugathasan S. (2009) Pediatric inflammatory bowel disease: highlighting pediatric differences in IBD. *Gastroenterol Clin North Am*, 38:611-628.
5. Iborra M, Bernuzzi F, Correale C, Vetrano S, Fiorino G, Beltrán B, Marabita F, Locati M, Spinelli A, Nos P, Invernizzi P, Danese S. (2013) Identification of serum and tissue micro-RNA expression profiles in different stages of inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol*, 173:250-258.
6. Ruemmele FM, Veres G, Kolho KL, Griffiths A, Levine A, Escher JC, Amil Dias J, Barabino A, Braegger CP, Bronsky J, Buderus S, Martín-de-Carpi J, De Ridder L, Fagerberg UL, Hugot JP, Kierkus J, Kolacek S, Koletzko S, Lionetti P, Miele E, Navas López VM, Paerregaard A, Russell RK, Serban DE, Shaoul R, Van Rheenen P, Veereman G, Weiss B, Wilson D, Dignass A, Eliakim A, Winter H, Turner D, Baumann U, Koletzko B, D'Antiga L, Troncone R, Benninga M, Mearin L, Phillips A. (2014) Consensus guidelines of ECCO/ESPGHAN on the medical management of pediatric Crohn's disease. *J*

- Crohn's Colitis, 8:1179-1207.
7. Escher JC. (2005) Inflammatory bowel disease in children and adolescents: Recommendations for diagnosis - The Porto criteria. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 41:1-7.
  8. Béres NJ, Szabó D, Veres G. (2013) Mikro-RNS potenciális szerepe a kutatásban és a klinikumban. *Gyermekgyógyászat*, 64:165-166.
  9. Veres G. Gasztroenterológia. In: Tulassay T (szerk.), *Klinikai Gyermekgyógyászat*. Medicina, Budapest, 2016: 425-459.
  10. Nagy G, Minik K, Újszászy L. (1994) A gyulladásoos bélbetegségek epidemiológiája Borsod- Abaúj-Zemplén megyében 1963-1992. *Lege Artis Med*, 4:424-430.
  11. Lakatos L, Mester G, Erdelyi Z, Balogh M, Szipocs I, Kamaras G, Lakatos PL. (2004) Striking elevation in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in a province of western Hungary between 1977-2001. *World J Gastroenterol*, 10:404-409.
  12. Martini E, Krug SM, Siegmund B, Neurath MF, Becker C. (2017) Mend Your Fences. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 4:33-46.
  13. Rautava S. (2016) Early microbial contact, the breast milk microbiome and child health. *J Dev Orig Health Dis*, 7:5-14.
  14. Niewiadomski O, Studd C, Wilson J, Williams J, Hair C, Knight R, Prewett E, Dabkowski P, Alexander S, Allen B, Dowling D, Connell W, Desmond P, Bell S. (2016) Influence of food and lifestyle on the risk of developing inflammatory bowel disease. *Intern Med J*, 46:669-676.
  15. Martino JV, Van Limbergen J, Cahill LE. (2017) The Role of Carrageenan and Carboxymethylcellulose in the Development of Intestinal Inflammation. *Front Pediatr*, 5:1-7.
  16. Chassaing B, Koren O, Goodrich JK, Poole AC, Srinivasan S, Ley RE, Gewirtz AT. (2015) Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature*, 519:92-96.
  17. Fava F, Danese S. (2011) Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: Friend of foe? *World J Gastroenterol*, 17:557-566.
  18. Brand S. (2009) Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut*, 58:1152-1167.

19. Sedda S, Marafini I, Dinallo V, Di Fusco D, Monteleone G. (2015) The TGF- $\beta$ /Smad System in IBD Pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis*, 21:2921-2925.
20. Neurath MF. (2014) Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*, 14:329-342.
21. Ventham NT, Kennedy NA, Nimmo ER, Satsangi J. (2013) Beyond gene discovery in inflammatory bowel disease: The emerging role of epigenetics. *Gastroenterology*, 145:293-308.
22. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, Brant SR, Silverberg MS, Taylor KD, Barmada MM, Bitton A, Dassopoulos T, Datta LW, Green T, Griffiths AM, Kistner EO, Murtha MT, Regueiro MD, Rotter JI, Schumm LP, Steinhart AH, Targan SR, Xavier RJ, Libioulle C, Sandor C, Lathrop M, Belaiche J, Dewit O, Gut I, Heath S, Laukens D, Mni M, Rutgeerts P, Van Gossum A, Zelenika D, Franchimont D, Hugot J-P, de Vos M, Vermeire S, Louis E, Cardon LR, Anderson CA, Drummond H, Nimmo E, Ahmad T, Prescott NJ, Onnie CM, Fisher SA, Marchini J, Ghori J, Bumpstead S, Gwilliam R, Tremelling M, Deloukas P, Mansfield J, Jewell D, Satsangi J, Mathew CG, Parkes M, Georges M, Daly MJ. (2008) Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet*, 40:955-962.
23. Aldhous MC, Soo K, Stark LA, Ulanicka AA, Easterbrook JE, Dunlop MG, Satsangi J. (2011) Cigarette smoke extract (CSE) delays NOD2 expression and affects NOD2/RIPK2 interactions in intestinal epithelial cells. *PLoS One*, 6:e24715.
24. Intemann CD, Thye T, Niemann S, Browne ENL, Amanua Chinbuah M, Enimil A, Gyapong J, Osei I, Owusu-Dabo E, Helm S, Rusch-Gerdes S, Horstmann RD, Meyer CG. (2009) Autophagy gene variant IRGM -261T contributes to protection from tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* but not by *M. africanum* strains. *PLoS Pathog*, 5:e1000577.
25. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, Lee JC, Schumm LP, Sharma Y, Anderson CA, Essers J, Mitrovic M, Ning K, Cleynen I, Theatre E, Spain SL, Raychaudhuri S, Goyette P, Wei Z, Abraham C, Achkar J-P, Ahmad T, Amininejad L, Ananthakrishnan AN, Andersen V, Andrews JM, Baidoo L, Balschun T, Bampton PA, Bitton A, Boucher G, Brand S, Buning C, Cohain A, Cichon S, D'Amato M, De Jong D, Devaney KL, Dubinsky M, Edwards C, Ellinghaus D, Ferguson LR, Franchimont D, Fransen K, Geary R,



- Georges M, Gieger C, Glas J, Haritunians T, Hart A, Hawkey C, Hedl M, Hu X, Karlsen TH, Kupcinkas L, Kugathasan S, Latiano A, Laukens D, Lawrance IC, Lees CW, Louis E, Mahy G, Mansfield J, Morgan AR, Mowat C, Newman W, Palmieri O, Ponsioen CY, Potocnik U, Prescott NJ, Regueiro M, Rotter JI, Russell RK, Sanderson JD, Sans M, Satsangi J, Schreiber S, Simms LA, Sventoraityte J, Targan SR, Taylor KD, Tremelling M, Verspaget HW, De Vos M, Wijmenga C, Wilson DC, Winkelmann J, Xavier RJ, Zeissig S, Zhang B, Zhang CK, Zhao H, Silverberg MS, Annese V, Hakonarson H, Brant SR, Radford-Smith G, Mathew CG, Rioux JD, Schadt EE, Daly MJ, Franke A, Parkes M, Vermeire S, Barrett JC, Cho JH. (2012) Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*, 491:119-124.
26. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD, Lee JC, Goyette P, Imielinski M, Latiano A, Lagace C, Scott R, Amininejad L, Bumpstead S, Baidoo L, Baldassano RN, Barclay M, Bayless TM, Brand S, Buning C, Colombel J-F, Denson LA, De Vos M, Dubinsky M, Edwards C, Ellinghaus D, Fehrmann RSN, Floyd JAB, Florin T, Franchimont D, Franke L, Georges M, Glas J, Glazer NL, Guthery SL, Haritunians T, Hayward NK, Hugot J-P, Jobin G, Laukens D, Lawrance I, Lemann M, Levine A, Libioulle C, Louis E, McGovern DP, Milla M, Montgomery GW, Morley KI, Mowat C, Ng A, Newman W, Ophoff RA, Papi L, Palmieri O, Peyrin-Biroulet L, Panes J, Phillips A, Prescott NJ, Proctor DD, Roberts R, Russell R, Rutgeerts P, Sanderson J, Sans M, Schumm P, Seibold F, Sharma Y, Simms LA, Seielstad M, Steinhart AH, Targan SR, van den Berg LH, Vatn M, Verspaget H, Walters T, Wijmenga C, Wilson DC, Westra H-J, Xavier RJ, Zhao ZZ, Ponsioen CY, Andersen V, Torkvist L, Gazouli M, Anagnou NP, Karlsen TH, Kupcinkas L, Sventoraityte J, Mansfield JC, Kugathasan S, Silverberg MS, Halfvarson J, Rotter JI, Mathew CG, Griffiths AM, Gearry R, Ahmad T, Brant SR, Chamaillard M, Satsangi J, Cho JH, Schreiber S, Daly MJ, Barrett JC, Parkes M, Annese V, Hakonarson H, Radford-Smith G, Duerr RH, Vermeire S, Weersma RK, Rioux JD. (2011) Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet*, 43:246-252.
27. Brand S, Brand S. (2013) Moving the genetics of inflammatory bowel diseases from bench to bedside : first steps towards personalised medicine Moving the

- genetics of inflammatory bowel diseases from bench to bedside : first steps towards personalised medicine. 2013:1531-1534.
28. Chong S, Vickaryous N, Ashe A, Zamudio N, Youngson N, Hemley S, Stopka T, Skoultschi A, Matthews J, Scott HS, de Kretser D, O'Bryan M, Blewitt M, Whitelaw E. (2007) Modifiers of epigenetic reprogramming show paternal effects in the mouse. *Nat Genet*, 39:614-622.
  29. Mattick JS, Makunin I V. (2006) Non-coding RNA. *Hum Mol Genet*, 15 Spec No:R17-29.
  30. Bhartiya D, Scaria V. (2016) Genomic variations in non-coding RNAs: Structure, function and regulation. *Genomics*, 107:59-68.
  31. Coskun M, Bjerrum JT, Seidelin JB, Nielsen OH. (2012) MicroRNAs in inflammatory bowel disease - pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *World J Gastroenterol*, 18:4629-4634.
  32. Raisch J, Darfeuille-Michaud A, Nguyen HTT. (2013) Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer. *World J Gastroenterol*, 19:2985-2996.
  33. Molnár V, Bakos B, Hegyesi H, Falus A. (2008) Nem kódoló genom és mikroRNS-ek: Új fejezet a genetika történetében. *Lege Artis Med*, 18:591-597.
  34. Adolph T-E, Niederreiter L, Blumberg RS, Kaser A. (2012) Endoplasmic reticulum stress and inflammation. *Dig Dis*, 30:341-346.
  35. Nahid MA, Satoh M, Chan EKL. (2011) Mechanistic role of microRNA-146a in endotoxin-induced differential cross-regulation of TLR signaling. *J Immunol*, 186:1723-1734.
  36. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LAJ. (2005) Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol*, 5:446-458.
  37. Shishodia S, Aggarwal BB. (2002) Nuclear factor-kappaB activation: a question of life or death. *J Biochem Mol Biol*, 35:28-40.
  38. Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, Baltimore D. (2006) NF- $\kappa$ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci*, 103:12481-12486.
  39. Quinn EM, Wang JH, O'Callaghan G, Redmond HP. (2013) MicroRNA-146a Is Upregulated by and Negatively Regulates TLR2 Signaling. *PLoS One*, 8:4-10.
  40. Krishnan J, Selvarajoo K, Tsuchiya M, Lee G, Choi S. (2007) Toll-like receptor signal transduction. *Exp Mol Med*, 39:421-438.

41. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. (2007) MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104:1604-1609.
42. Chen Y, Wang C, Liu Y, Tang L, Zheng M, Xu C, Song J, Meng X. (2013) MiR-122 targets NOD2 to decrease intestinal epithelial cell injury in Crohn's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 438:133-139.
43. Merkerova M, Belickova M, Bruchova H. (2008) Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages. *Eur J Haematol*, 81:304-310.
44. Wu H, Neilson JR, Kumar P, Manocha M, Shankar P, Sharp PA, Manjunath N. (2007) miRNA profiling of naïve, effector and memory CD8 T cells. *PLoS One*, 2.
45. Du C, Liu C, Kang J, Zhao G, Ye Z, Huang S, Li Z, Wu Z, Pei G. (2009) MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Immunol*, 10:1252-1259.
46. Cobb BS, Nesterova TB, Thompson E, Hertweck A, O'Connor E, Godwin J, Wilson CB, Brockdorff N, Fisher AG, Smale ST, Merckenschlager M. (2005) T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer. *J Exp Med*, 201:1367-1373.
47. Pekow JR, Kwon JH. (2012) MicroRNAs in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 18:187-193.
48. Szebeni B, Veres G, Dezsöfi A, Rusai K, Vannay Á, Mraz M, Majorova E, Arató A. (2008) Increased expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol*, 151:34-41.
49. Runtsch MC, Round JL, O'Connell RM. (2014) MicroRNAs and the regulation of intestinal homeostasis. *Front Genet*, 5:1-10.
50. Das LM, Torres-Castillo MDLA, Gill T, Levine AD. (2013) TGF- $\beta$  conditions intestinal T cells to express increased levels of miR-155, associated with down-regulation of IL-2 and *itk* mRNA. *Mucosal Immunol*, 6:167-176.
51. Chassin C, Hempel C, Stockinger S, Dupont A, Kübler JF, Wedemeyer J, Vandewalle A, Hornef MW. (2012) MicroRNA-146a-mediated downregulation of IRAK1 protects mouse and human small intestine against ischemia/reperfusion injury. *EMBO Mol Med*, 4:1308-1319.
52. Ye D, Guo S, Al-Sadi R, Ma TY. (2011) MicroRNA regulation of intestinal

- epithelial tight junction permeability. *Gastroenterology*, 141:1323-1333.
53. Kohei B. (2009) Review Transforming growth factor- b signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. *Proc Jpn Acad*, 85:314-323.
  54. Monteleone G, Boirivant M, Pallone F, MacDonald TT. (2008) TGF- $\beta$ 1 and Smad7 in the regulation of IBD. *Mucosal Immunol*, 1:S50-S53.
  55. Levine A, Koletzko S, Turner D, Escher JC, Cucchiara S, de Ridder L, Kolho K-L, Veres G, Russell RK, Paerregaard A, Buderus S, Greer M-LC, Dias JA, Veereman-Wauters G, Lionetti P, Sladek M, Carpi JM de, Staiano A, Ruemmele FM, Wilson DC. (2013) The ESPGHAN Revised Porto Criteria for the Diagnosis of Inflammatory Bowel Disease in Children and Adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 58:1.
  56. Shaoul R, Rimar Y, Toubi A, Mogilner J, Polak R, Jaffe M. (2005) Crohn's disease and recurrent appendicitis: A case report. *World J Gastroenterol*, 11:6891-6893.
  57. Keljo DJ, Markowitz J, Langton C, Lerer T, Bousvaros A, Carvalho R, Crandall W, Evans J, Griffiths A, Kay M, Kugathasan S, LeLeiko N, Mack D, Mamula P, Moyer MS, Oliva-Hemker M, Otley A, Pfefferkorn M, Rosh J, Hyams JS. (2009) Course and treatment of perianal disease in children newly diagnosed with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 15:383-387.
  58. Cosnes J, Cattan S, Blain A, Beaugerie L, Carbonnel F, Parc R, Gendre J-P. (2002) Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 8:244-250.
  59. Amil-Dias J, Kolacek S, Turner D, Pærregaard A, Rintala R, Afzal NA, Karolewska-Bochenek K, Bronsky J, Chong S, Fell J, Hojsak I, Hugot J-P, Koletzko S, Kumar D, Lazowska-Przeorek I, Lillehei C, Lionetti P, Martin-de-Carpi J, Pakarinen M, Ruemmele FM, Shaoul R, Spray C, Staiano A, Sugarman I, Wilson DC, Winter H, Kolho K-L. (2017) Surgical Management of Crohn Disease in Children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 64:818-835.
  60. Bequet E, Sarter H, Fumery M, Vasseur F, Armengol-Debeir L, Pariente B, Ley D, Spyckerelle C, Coevoet H, Laberenne JE, Peyrin-Biroulet L, Savoye G, Turck D, Gower-Rousseau C. (2017) Incidence and Phenotype at Diagnosis of Very-early-onset Compared with Later-onset Paediatric Inflammatory Bowel Disease: A Population-based Study [1988-2011]. *J Crohns Colitis*, 11:519-526.
  61. Chandrakasan S, Venkateswaran S, Kugathasan S. (2017) Nonclassic

- Inflammatory Bowel Disease in Young Infants: Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-Linked Syndrome, and Other Disorders. *Pediatr Clin North Am*, 64:139-160.
62. Hyams JS, Ferry GD, Mandel FS, Gryboski JD, Kibort PM, Kirschner BS, Griffiths AM, Katz AJ, Grand RJ, Boyle JT. (1991) Development and validation of a pediatric Crohn's disease activity index. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 12:439-447.
  63. Turner D, Griffiths AM, Walters TD, Seah T, Markowitz J, Pfefferkorn M, Keljo D, Waxman J, Otley A, LeLeiko NS, Mack D, Hyams J, Levine A. (2012) Mathematical weighting of the pediatric Crohn's disease activity index (PCDAI) and comparison with its other short versions. *Inflamm Bowel Dis*, 18:55-62.
  64. Sandhu BK, Fell JM, Beattie RM, Mitton SG, Wilson DC, Jenkins H. (2010) Guidelines for the Management of Inflammatory Bowel Disease in Children in the United Kingdom. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 50:S1-S13.
  65. Mack DR, Langton C, Markowitz J, LeLeiko N, Griffiths A, Bousvaros A, Evans J, Kugathasan S, Otley A, Pfefferkorn M, Rosh J, Mezoff A, Moyer S, Oliva-Hemker M, Rothbaum R, Wyllie R, delRosario JF, Keljo D, Lerer T, Hyams J. (2007) Laboratory values for children with newly diagnosed inflammatory bowel disease. *Pediatrics*, 119:1113-1119.
  66. Bonneau J, Dumestre-Perard C, Rinaudo-Gaujous M, Genin C, Sparrow M, Roblin X, Paul S. (2015) Systematic review: New serological markers (anti-glycan, anti-GP2, anti-GM-CSF Ab) in the prediction of IBD patient outcomes. *Autoimmun Rev*, 14:231-245.
  67. Kovács M, Müller KE, Papp M, Lakatos PL, Csöndes M, Veres G. (2014) New serological markers in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 20:4873-4882.
  68. Soubières AA. (2016) Emerging role of novel biomarkers in the diagnosis of inflammatory bowel disease. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*, 7:41.
  69. Szűcs D. (2013) A széklet calprotectin-vizsgálat jelentősége gyermekkorban. *Gyermekgyógyászati Továbbképző Szle*, 18:13-15.
  70. Bor R, Fábián A, Szepes Z. (2016) Role of ultrasound in colorectal diseases. *World J Gastroenterol*, 22:9477-9487.
  71. Kovacs M, Muller KE, Arato A, Lakatos PL, Kovacs JB, Varkonyi A, Solyom E, Polgar M, Nemes E, Guthy I, Tokodi I, Toth G, Horvath A, Tarnok A, Tomsits

- E, Csozszánszky N, Balogh M, Vass N, Bodi P, Dezsofi A, Gardos L, Micskey E, Papp M, Szucs D, Cseh A, Molnar K, Szabo D, Veres G. (2012) Diagnostic yield of upper endoscopy in paediatric patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. Subanalysis of the HUPIR registry. *J Crohn's Colitis*, 6:86-94.
72. So H, Ye BD, Park YS, Kim J, Kim JS, Moon W, Lee K-M, Kim YS, Keum B, Kim S-E, Kim KO, Kim ES, Lee CK, Hong SP, Im JP, Koo JS, Choi CH, Shin JE, Lee BI, Huh KC, Kim Y-H, Kim H-S, Park YS, Han DS, Korean Association for the Study of Intestinal Diseases. (2016) Gastric lesions in patients with Crohn's disease in Korea: a multicenter study. *Intest Res*, 14:60-68.
73. Borrelli O, Cordischi L, Cirulli M, Paganelli M, Labalestra V, Uccini S, Russo PM, Cucchiara S. (2006) Polymeric diet alone versus corticosteroids in the treatment of active pediatric Crohn's disease: a randomized controlled open-label trial. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 4:744-753.
74. Werkstetter KJ, Schatz SB, Alberer M, Filipiak-Pittroff B, Koletzko S. (2013) Influence of exclusive enteral nutrition therapy on bone density and geometry in newly diagnosed pediatric Crohn's disease patients. *Ann Nutr Metab*, 63:10-16.
75. Seymour ML, Binion DG, Compton SJ, Hollenberg MD, MacNaughton WK. (2005) Expression of proteinase-activated receptor 2 on human primary gastrointestinal myofibroblasts and stimulation of prostaglandin synthesis. *Can J Physiol Pharmacol*, 83:605-616.
76. Béres NJ, Szabó D, Kocsis D, Szűcs D, Kiss Z, Müller KE, Lendvai G, Kiss A, Arató A, Sziksz E, Vannay Á, Szabó AJ, Veres G. (2016) Role of Altered Expression of miR-146a, miR-155, and miR-122 in Pediatric Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*, 22:327-335.
77. Chen X, Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X. (2008) Characterization of microRNAs in serum : a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. 2008:997-1006.
78. Wu F, Zikusoka M, Trindade A, Dassopoulos T, Harris ML, Bayless TM, Brant SR, Chakravarti S, Kwon JH. (2008) MicroRNAs Are Differentially Expressed in Ulcerative Colitis and Alter Expression of Macrophage Inflammatory Peptide-2 $\alpha$ . *Gastroenterology*, 135:1624-1635.
79. Takagi T, Naito Y, Mizushima K, Hirata I, Yagi N, Tomatsuri N, Ando T, Oyamada Y, Isozaki Y, Hongo H, Uchiyama K, Handa O, Kokura S, Ichikawa

- H, Yoshikawa T. (2010) Increased expression of microRNA in the inflamed colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol*, 25:S129-S133.
80. Balzola F, Bernstein C, Ho GT, Lees C. (2011) Identification of restricted subsets of mature microRNA abnormally expressed in inactive colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease: Commentary. *Inflamm Bowel Dis Monit*, 11:126-127.
  81. Schaefer JS, Attumi T, Opekun AR, Abraham B, Hou J, Shelby H, Graham DY, Streckfus C, Klein JR. (2015) MicroRNA signatures differentiate Crohn's disease from ulcerative colitis. *BMC Immunol*, 16:5.
  82. Lin J, Welker NC, Zhao Z, Li Y, Zhang J, Reuss SA, Zhang X, Lee H, Liu Y, Bronner MP. (2014) Novel specific microRNA biomarkers in idiopathic inflammatory bowel disease unrelated to disease activity. *Mod Pathol*, 27:602-608.
  83. Zahm AM, Thayu M, Hand NJ, Horner A, Leonard MB, Friedman JR. (2011) Circulating MicroRNA Is a Biomarker of Pediatric Crohn Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 53:26-33.
  84. Zahm AM, Hand NJ, Tsoucas DM, Guen CL Le, Baldassano RN, Friedman JR. (2014) Rectal microRNAs are perturbed in pediatric inflammatory bowel disease of the colon. *J Crohn's Colitis*, 8:1108-1117.
  85. Koukos G, Polytarchou C, Kaplan JL, Morley-Fletcher A, Gras-Miralles B, Kokkotou E, Baril-Dore M, Pothoulakis C, Winter HS, Iliopoulos D. (2013) MicroRNA-124 regulates STAT3 expression and is down-regulated in colon tissues of pediatric patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 145:842-852.e2.
  86. Koukos G, Polytarchou C, Kaplan JL, Oikonomopoulos A, Ziring D, Hommes DW, Wahed R, Kokkotou E, Pothoulakis C, Winter HS, Iliopoulos D. (2015) A microRNA signature in pediatric ulcerative colitis: deregulation of the miR-4284/CXCL5 pathway in the intestinal epithelium. *Inflamm Bowel Dis*, 21:996-1005.
  87. Rusca N, Monticelli S. (2011) MiR-146a in Immunity and Disease. *Mol Biol Int*, 2011:1-7.
  88. Faraoni I, Romana F, Cardone J, Bonmassar E. (2009) miR-155 gene : A typical multifunctional microRNA. *BBA - Mol Basis Dis*, 1792:497-505.

89. Kanaan Z, Rai SN, Eichenberger MR, Barnes C, Dworkin AM, Weller C, Cohen E, Roberts H, Keskey B, Petras RE, Crawford NPS, Galandiuk S. (2012) Differential MicroRNA expression tracks neoplastic progression in inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer. *Hum Mutat*, 33:551-560.
90. Svrcek M, El-Murr N, Wanherdrick K, Dumont S, Beaugerie L, Cosnes J, Colombel JF, Tiret E, Fléjou JF, Lesuffleur T, Duval A. (2013) Overexpression of microRNAs-155 and 21 targeting mismatch repair proteins in inflammatory bowel diseases. *Carcinogenesis*, 34:828-834.
91. Günaltay S, Nyhlin N, Kumawat AK, Tysk C, Bohr J, Hultgren O, Hultgren Hörnquist E. (2014) Differential expression of interleukin-1/Toll-like receptor signaling regulators in microscopic and ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*, 20:12249-12259.
92. Fasseu M, Treton X, Guichard C, Pedruzzi E, Cazals-Hatem D, Richard C, Aparicio T, Daniel F, Soule J-C, Moreau R, Bouhnik Y, Laburthe M, Groyer A, Ogier-Denis E. (2010) Identification of restricted subsets of mature microRNA abnormally expressed in inactive colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *PLoS One*, 5.
93. Sun W, Sheng Y, Chen J, Xu D, Gu Y. (2015) Down-Regulation of miR-146a Expression Induces Allergic Conjunctivitis in Mice by Increasing TSLP Level. *Med Sci Monit*, 21:2000-2007.
94. Alexander M, Hu R, Runtsch MC, Kagele DA, Mosbrugger TL, Tolmachova T, Seabra MC, Round JL, Ward DM, O'Connell RM. (2015) Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin. *Nat Commun*, 6:7321.
95. Landy J, Ronde E, English N, Clark SK, Hart AL, Knight SC, Ciclitira PJ, Al-Hassi HO. (2016) Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 22:3117-3126.
96. Chung J, Jeong SH, Lee SM, Pak JH, Lee GH, Jeong J, Kim J. (2017) Expression of MicroRNA in Host Cells Infected with *Helicobacter pylori*. 11:392-400.
97. Verma P, Pandey RK, Prajapati P, Prajapati VK. (2016) Circulating microRNAs: Potential and emerging biomarkers for diagnosis of human infectious diseases. *Front Microbiol*, 7:1-7.



98. Shiota S, Yamaoka Y. (2014) Biomarkers for Helicobacter pylori infection and gastroduodenal diseases. *Biomark Med*, 8:1127-1137.
99. Zahm AM, Menard-Katcher C, Benitez AJ, Tsoucas DM, Le Guen CL, Hand NJ, Friedman JR. (2014) Pediatric eosinophilic esophagitis is associated with changes in esophageal microRNAs. *AJP Gastrointest Liver Physiol*, 307:G803-G812.
100. Thomas X. Lu, Joseph D. Sherrill, Ting Wen, Andrew J. Plassard, John A. Besse, Juan Pablo Abonia, James P. Franciosi, Philip E. Putnam, Michael Eby, Lisa J. Martin, Bruce J. Aronow and ME, Rothenberg. (2012) MicroRNA signature in patients with eosinophilic esophagitis, reversibility with glucocorticoids, and assessment as disease biomarkers. *J Allergy Clin Immunol*, 129:1-24.
101. Lu TX, Rothenberg ME. (2013) Diagnostic, functional, and therapeutic roles of microRNA in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 132:3-13; quiz 14.
102. Kiss Z, Beres NJ, Sziksz E, Tel B, Borka K, Arato A, Szabo AJ, Veres G. (2017) Specific MicroRNA Pattern in Colon Tissue of Young Children with Eosinophilic Colitis. *Int J Mol Sci*, 18.
103. Biancheri P, Giuffrida P, Docena GH, MacDonald TT, Corazza GR, Di Sabatino A. (2014) The role of transforming growth factor (TGF)-beta in modulating the immune response and fibrogenesis in the gut. *Cytokine Growth Factor Rev*, 25:45-55.
104. Li C, Kuemmerle JF. (2014) Mechanisms that mediate the development of fibrosis in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 20:1250-1258.
105. Principi M, Giorgio F, Losurdo G, Neve V, Contaldo A, Di Leo A, Ierardi E. (2013) Fibrogenesis and fibrosis in inflammatory bowel diseases: Good and bad side of same coin? *World J Gastrointest Pathophysiol*, 4:100-107.
106. Feagins LA. (2010) Role of transforming growth factor- $\beta$  in inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. *Inflamm Bowel Dis*, 16:1963-1968.
107. Monteleone G, Caruso R, Pallone F. (2012) Role of Smad7 in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*, 18:5664-5668.
108. Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, McKenzie C, Steer HW, MacDonald TT. (2001) Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*, 108:601-609.
109. Monteleone G, Di Sabatino A, Ardizzone S, Pallone F, Usiskin K, Zhan X,

- Rossiter G, Neurath MF. (2016) Impact of patient characteristics on the clinical efficacy of mongersen (GED-0301), an oral Smad7 antisense oligonucleotide, in active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 43:717-724.
110. Ippolito C, Colucci R, Segnani C, Errede M, Girolamo F, Virgintino D, Dolfi A, Tirotta E, Buccianti P, Di Candio G, Campani D, Castagna M, Bassotti G, Villanacci V, Blandizzi C, Bernardini N. (2016) Fibrotic and Vascular Remodelling of Colonic Wall in Patients with Active Ulcerative Colitis. *J Crohns Colitis*, 10:1194-1204.
  111. Segain J-P, Raingeard de la Bletiere D, Sauzeau V, Bourreille A, Hilaret G, Cario-Toumaniantz C, Pacaud P, Galmiche J-P, Loirand G. (2003) Rho kinase blockade prevents inflammation via nuclear factor kappa B inhibition: evidence in Crohn's disease and experimental colitis. *Gastroenterology*, 124:1180-1187.
  112. Cheung KSC, Sposito N, Stumpf PS, Wilson DI, Sanchez-Elsner T, Oreffo ROC. (2014) MicroRNA-146a regulates human foetal femur derived skeletal stem cell differentiation by down-regulating SMAD2 and SMAD3. *PLoS One*, 9:e98063.
  113. Li J, Huang J, Dai L, Yu D, Chen Q, Zhang X, Dai K. (2012) miR-146a, an IL-1beta responsive miRNA, induces vascular endothelial growth factor and chondrocyte apoptosis by targeting Smad4. *Arthritis Res Ther*, 14:R75.
  114. Xiao B, Zhu E-D, Li N, Lu D-S, Li W, Li B-S, Zhao Y-L, Mao X-H, Guo G, Yu P-W, Zou Q-M. (2012) Increased miR-146a in gastric cancer directly targets SMAD4 and is involved in modulating cell proliferation and apoptosis. *Oncol Rep*, 27:559-566.
  115. Ji H, Li Y, Jiang F, Wang X, Zhang J, Shen J, Yang X. (2014) Inhibition of transforming growth factor beta/SMAD signal by MiR-155 is involved in arsenic trioxide-induced anti-angiogenesis in prostate cancer. *Cancer Sci*, 105:1541-1549.
  116. Kong W, Yang H, He L, Zhao J, Coppola D, Dalton WS, Cheng JQ. (2008) MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Mol Cell Biol*, 28:6773-6784.
  117. Wang S-C, Lin X-L, Li J, Zhang T-T, Wang H-Y, Shi J-W, Yang S, Zhao W-T, Xie R-Y, Wei F, Qin Y-J, Chen L, Yang J, Yao K-T, Xiao D. (2014) MicroRNA-122 triggers mesenchymal-epithelial transition and suppresses hepatocellular carcinoma cell motility and invasion by targeting RhoA. *PLoS One*, 9:e101330.

118. Pathak S, Grillo AR, Scarpa M, Brun P, D'Inca R, Nai L, Banerjee A, Cavallo D, Barzon L, Palù G, Sturniolo GC, Buda A, Castagliuolo I. (2015) MiR-155 modulates the inflammatory phenotype of intestinal myofibroblasts by targeting SOCS1 in ulcerative colitis. *Exp Mol Med*, 47:e164.
119. Min M, Peng L, Yang Y, Guo M, Wang W, Sun G. (2014) MicroRNA-155 Is Involved in the Pathogenesis of Ulcerative Colitis by Targeting FOXO3a. *Inflamm Bowel Dis*, 20:652-659.

## 11 Saját publikációk jegyzéke

### 11.1 A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

1. **Dániel Szűcs**, Nóra J. Béres, Réka Rokonyay, Kriszta Boros, Katalin Borka, Zoltán Kiss, András Arató, Attila J. Szabó, Ádám Vannay, Erna Sziksz, Csaba Berecki and Gábor Veres. (2016) Increased duodenal expression of miR-146a and -155 in pediatric Crohn's disease. *World J Gastroenterol*, 22: 6027–6035. IF: 3,365 (JCR, 2016)
2. Nóra Judit Béres, Dolóresz Szabó, Dorottya Kocsis, **Dániel Szűcs**, Zoltán Kiss, Katalin Eszter Müller, Gábor Lendvai, András Kiss, András Arató, Erna Sziksz, Ádám Vannay, Attila J. Szabó, Gábor Veres. (2016) Role of altered expression of miR-146a, miR-155 and miR-122 in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Disease*, 22:327-35. IF: 4,525 (JCR, 2016)
3. **Szűcs Dániel**, Várkonyi Ágnes, Béres Nóra Judit, Szabó Dolóresz, Boros Kriszta Katinka, Arató András, Veres Gábor. (2014) Mikro-RNS-ek diagnosztikai jelentősége gyulladákos bélbetegségben. *Gyermekgyógyászat*, 65:160-165.
4. **Szűcs Dániel**. (2013) A széklet calprotectin-vizsgálat jelentősége gyermekkorban. *Gyermekgyógyászati Továbbképző Szemle*, 18:13-15.

### 11.2 A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk

1. Kovács M, Müller KE, Arató A, Várkonyi Á, Dezsőfi A, **Szűcs D**, Tomsits E, Tóth G, a Magyar Gyermekek IBD regiszter résztvevői Veres G. (2010) A felső endoszkópia jelentősége a gyermekkori gyulladákos bélbetegségben (IBD) szenvedő gyermekekben. *Gyermekgyógyászat* 61:98-104.
2. Szakál O, Király A, **Szűcs D**, Katona M, Boda D, Tálosi GJ. (2012) Measurement of gastric-to-end-tidal carbon dioxide difference in neonates requiring intensive care. *Mat Fet Neonat Med*, 25: 1791–1795

3. Marta Kovacs, Katalin Eszter Muller, Andras Arato, Peter Laszlo Lakatos, Judit B. Kovacs, Agnes Varkonyi, Eniko Solyom, Marianne Polgar, Eva Nemes, Ildiko Guthy, Istvan Tokodi, Gergely Toth, Agnes Horvath, Andras Tarnok, Erika Tomsits, Noemi Csozszánszky, Marta Balogh, Noemi Vass, Piroska Bodi, Antal Dezsofi, Laszlo Gardos, Eva Micskey, Maria Papp, **Daniel Szucs**, Aron Cseh, Kriszta Molnar, Doloresz Szabo, Gabor Veres on behalf of the Hungarian IBD Registry Group (HUPIR). (2012) Diagnostic yield of upper endoscopy in paediatric patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. Subanalysis of the HUPIR registry. *J. Crohn's Colitis*, 6: 86–94.
4. Katalin E. Müller, Péter L. Lakatos, András Arató, Judit B. Kovács, Ágnes Várkonyi, **Dániel Szűcs**, Erzsébet Szakos, Enikő Sólyom, Márta Kovács, Marianne Polgár, Éva Nemes, Ildikó Guthy, István Tokodi, Gergely Tóth, Ágnes Horváth, András Tárnok, Noémi Csozszánszki, Márta Balogh, Noémi Vass, Piroska Bódi, Antal Dezsőfi, László Gárdos, Éva Micskey, Mária Papp, Áron Cseh, Dolóresz Szabó, Péter Vörös, Hungarian IBD Registry Group (HUPIR), and Gábor Veres. (2013) Incidence, Paris classification, and follow-up in a nationwide incident cohort of pediatric patients with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 57:576-82
5. Dolóresz Szabó, Éva Hosszú, András Arató, Katalin Eszter Müller, Nóra Béres, Péter László Lakatos, Mária Papp, Antal Dezsőfi, Attila J Szabó, Dániel Szűcs, Gabor Veres. (2015) Seasonal variability of vitamin D and bone metabolism in infliximab-treated paediatric Crohn's disease. *Dig Liver Dis*, 47:652-7
6. Müller KE, Lakatos PL, Kovacs JB, Arato A, Varkonyi A, Nemes E, Tarnok A, Toth G, Papp M, Solyom E, Horvath A, Guthy I, Kovacs M, Hungarian IBD Registry Group (HUPIR): Arato A, Dezsofi A, Cseh A, Voros P, Szabo D, Polgar M, Balogh M, Bodi P, Czelecz J, Szigeti K, Csozszanszki N, Tomsits E, Gardos L, Tomcsa G, Harangi F, Schultz K, Kis I, Micskey E, Pollak E, Rosta I, Szakos E, Szabados K, Szathmari E, Tamas K, Tokodi I, Toth A, Vajdovich E, **Szucs D**, Vass N, Veres G. (2016) Baseline characteristics and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 62: 50-55

### *11.3 Könyvfejezet*

1. Szűcs D. (2016) Gastritis. Hypertrophias gastropathia. Peptikus fekélybetegség (PUD). *Helicobacter pylori*. In: Tulassay T (szerk.), *Klinikai Gyermekgyógyászat*. Medicina, Budapest, 2016: 440-444.

## 12 Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Katona Márta professzor asszonynak és Dr. Túri Sándor professzor úrnak, hogy a Szegedi Tudományegyetem Gyermekklinikáján kezdhettem el gyermekorvosi pályámat.

Köszönettel tartozom Dr. Várkonyi Ágnes professzor asszonynak, hogy a gyermekgasztroenterológia útjára terelt, és valódi mentorként egyengette (egyengeti) utamat.

Köszönöm Dr. Szabó Attila professzor úrnak és Dr. Bereczki Csaba tanár úrnak, hogy lehetővé tették számomra, hogy a két intézet kapcsolatát mélyítve a kutatómunkát az I. Sz. Gyermekgyógyászati Klinikán végezzem.

Köszönettel és hálával tartozom Dr. Veres Gábor professzor úrnak, hogy témavezetőként és második mentoromként nemcsak a tudományos, de a klinikai szakmai életben is mindig türelemmel, barátián és készségesen áll segítségemre.

Köszönöm Dr. Arató András professzor úrnak, hogy a munka elkezdésekor segítségemre volt.

Messzemenően hálás vagyok Dr. Béres Nórának türelméért, kitartásáért, segítségéért és nem utolsó sorban szakmai útmutatásáért.

Köszönöm Dr. Vannay Ádámnak, Dr. Sziksz Ernának, Dr. Kiss Zoltánnak, valamint a kutatólabor munkatársainak önzetlen segítségüket és tanácsaikat.

Köszönöm a Gyermekklinikán dolgozó munkatársaimnak a támogatásukat.

Külön köszönet barátaimnak, Dr. Orosz Lászlónak és Dr. Rácz Gábornak a dolgozat elkészítésében nyújtott segítségükért.

Végezetül köszönöm szüleimnek és bátyámnak, hogy lehetővé tették számomra az orvosi egyetem elvégzését, és hogy végtelenül türelmes támogatással mindig mellettem állnak. Köszönöm feleségemnek és gyermekeimnek a szeretetteljes törődést a hosszú munkanapokon is.

### 13 Ábrajegyzék

1. ábra. A jelentősebb pro- és anti-inflammatorikus citokinek az IBD patomechanizmusában. ....	14
2. ábra. Az IBD patomechanizmusa jelen elképzelések szerint, sematikusán ábrázolva. ....	15
3. ábra. Az elmúlt közel 30 év kutatási mérföldkövei a CD genetikájában. ....	16
4. ábra. Az IBD patogenezisében szerepet játszó ismert génlókuszok a betegség progressiójában játszott szerepük, valamint az immunrendszerben elfoglalt helyük alapján. ....	18
5. ábra. A mikroRNS bioszintézinek menete. ....	20
6. ábra. CD-re jellemző szövettani eltérések. ....	35
7. ábra. A miR-146a expressziója CD-s gyermekek duodenum (A) és colon (B) nyálkahártyájában. ....	45
8. ábra. A miR-155 expressziója CD-s gyermekek duodenum (A) és colon (B) nyálkahártyájában. ....	46
9. ábra. A miR-122 expressziója CD-s gyermekek duodenum (A) és colon (B) nyálkahártyájában. ....	47
10. ábra. A miR-146a expressziója rhTGF- $\beta$ -val kezelt vékonybél epitél sejtekben. ....	48
11. ábra. A miR-155 expressziója rhTGF- $\beta$ -val kezelt vékonybél epitél sejtekben. ....	49
12. ábra. A miR-146a expressziója rhTGF- $\beta$ -val kezelt duodenum fibroblasztokban. ....	50
13. ábra. A miR-155 expressziója rhTGF- $\beta$ -val kezelt duodenum fibroblasztokban. ....	51
14. ábra. A miR-122 expressziója rhTGF- $\beta$ -val kezelt duodenum fibroblasztokban. ....	52
15. ábra. A transzformáló növekedési faktor (TGF)- $\beta$ által, a mikroRNS (miR)-146a, -155, és -122 keresztül a gyulladási folyamatban befolyásolt gének és folyamatok. ....	60
16. ábra. A transzformáló növekedési faktor (TGF)- $\beta$ és a mikroRNS (miR)-146a, -155, és -122 hatásmechanizmusának kapcsolódási pontjai sematikusán ábrázolva. ....	61



## 14 Táblázatjegyzék

1. táblázat. A Párizsi Klasszifikációs rendszer .....	28
2. táblázat. CD-ben előforduló makroszkópos és mikroszkópos eltérések a módosított “Portói” kritériumrendszer szerint. ....	36
3. táblázat. A CD beteg és kontroll gyermekek klinikai adatai és laboratóriumi paraméterei.....	41
4. táblázat. A legfontosabb eddigi közlemények a miR-146a, -155, és -122 felnőttkori gyulladásos bélbetegségben betöltött szerepéről. ....	63
5. táblázat. Eddigi közlemények a miR-146a, -155, és -122 gyermekkori gyulladásos bélbetegségben betöltött szerepéről. ....	66