

dc_581_12

MTA
DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**Immunmediált gasztroenterológiai kórképek
epidemiológiájának, diagnosztikájának és
patomechanizmusának jellemzői**



Dr. Veres Gábor
Semmelweis Egyetem

Budapest
2012

TARTALOMJEGYZÉK

II.1. GYULLADÁSOS BÉLBETEGSÉG (IBD)	4
II.2. CÖLIÁKIA	17
II.3. ALLERGIÁS KOLITISZ (AC).....	22
II.4. ADAPTÍV ÉS TERMÉSZETES IMMUNITÁS, TOLL-LIKE RECEPTOR (TLR) ÉS INTESZTINÁLIS ALKALIKUS FOSZFATÁZ (IAP).....	23
III.1. GYULLADÁSOS BÉLBETEGSÉG (IBD).....	36
III.2. CÖLIÁKIA.....	38
III.3. ALLERGIÁS KOLITISZ (AC).....	38
IV.1. GYULLADÁSOS BÉLBETEGSÉG (IBD).....	39
IV.1.1. IBD regiszter (HUPIR: Hungarian Pediatric IBD Registry).....	39
IV.1.2. A felső endoszkópia diagnosztikus értékének vizsgálata.....	39
IV.1.3. Infliximab terápiájának prospektív, országos hatásvizsgálata	40
IV.1.4. A mannóz-kötő lektin (MBL) meghatározása	41
IV.1.5. PAB, rPAB, GAB, ASCA és pANCA antitestek meghatározása	41
IV.1.6. Toll-like receptor (TLR) 2, 3 és 4 meghatározás IBD-ben	45
IV.1.7. Az intesztinális alkalikus foszfatáz (iAP) vizsgálata IBD-ben	49
IV.1.8. Immunfenotípus analízis IBD-ben	52
IV.2. CÖLIÁKIA	61
IV.2.1. Klaudin (CLDN) meghatározása 2 különböző duodenális lokalizációban.....	61
IV.2.2. Az iAP intesztinális expressziójának (mRNA és fehérjeszint) és TLR4 kolokalizációjának vizsgálata.....	62
IV.2.3. HSP72 mRNS, fehérje és lokalizáció a cöliákiások duodenumában	62
IV.2.4. Immunfenotípus vizsgálatok cöliákiában.....	64
IV.2.5. Plazminogén hiány és cöliákia a duodenális fekély hátterében	65
IV.3. ALLERGIÁS KOLITISZ.....	66
IV.3.1. Laboratóriumi és kolonoszkópiás vizsgálat AC-ben	66
IV.3.2. Immunfenotipizálás allergiás kolitiszes csecsemők perifériás véréből.....	66
VII.1. GYULLADÁSOS BÉLBETEGSÉG	71

VII.1.1. Az IBD regiszterrel kapcsolatos eredmények (188-191).....	71
VII.1.2. Felső endoszkópia diagnosztikus értékének meghatározása (189).....	75
VII.1.3. Infliximab kezelés országos felmérése terápiareszisztens Crohn-betegségben (192)	78
VII.1.4. MBL szintek, és az MBL deficiencia előfordulása az IBD-s betegekben, valamint ezek összefüggése a szerológiai markerekkel (197).....	79
VII.1.5. A PAB, rPAB, GAB, ASCA és pANCA antitestek prevalenciája és összefüggésük az IBD fenotípusával (198).....	83
VII.1.6. A TLR2, TLR3 és TLR4 expressziójának vizsgálata krónikus gyulladásos bélbetegségben szenvedő (IBD-s) gyermekek kolon nyálkahártyájában (199)..	85
VII.1.7. Az iAP expressziójának vizsgálata gyulladásos bélbetegségben szenvedő (IBD-s) gyermekek kolon nyálkahártyájában (200).....	90
VII.1.8. Immunfenotípusos elemzés aktív és remisszióban levő CD-s gyermekekben (201)	94
VII.2. CÖLIÁKIA	99
VII.2.1. Klaudin (CLDN) expresszió cöliákias gyermekek proximális és disztális duodenumában (202).....	99
VII.2.2. HSP72 expresszió (mRNS és fehérje) és lokalizáció vizsgálata cöliákiasok duodenumában (203).....	102
VII.2.3. Az iAP expressziójának vizsgálata cöliákias gyermekek duodenum nyálkahártyájában (204).....	104
VII.2.4. Cöliákias gyermekek perifériás vérének immunfenotípus elemzése.....	107
VII.2.5. Kóros transzglutamináz és plazminogénhiány a duodenális fekély patomechanizmusában (205).....	113
VII.3. ALLERGIÁS KOLITISZ (AC).....	115
VIII.1. GYULLADÁSOS BÉLBETEGSÉG.....	118
VIII.1.1. Az IBD regiszterrel (HUPIR) kapcsolatos eredmények megbeszélése.....	118
VIII.1.2. A felső endoszkópia diagnosztikus „hozamának” („diagnostic yield”) megbeszélése	121
VIII.1.3. A mannóz-kötő lektin vizsgálata IBD-s gyermekekben.....	124
VIII.1.4. A PAB, rPAB, GAB, ASCA és pANCA antitestek vizsgálata IBD-ben	127
VIII.1.5. A TLR2, TLR3 és TLR4 expressziójának vizsgálata krónikus gyulladásos bélbetegségben szenvedő (IBD-s) gyermekek kolon nyálkahártyájában (199)	130

VIII.1.6. Az iAP expressziójának vizsgálata gyulladásos bélbetegségben szenvedő (IBD-s) gyermekek kolon nyálkahártyájában (200)	133
VIII.1.7. Immunfenotípus elemzés aktív és remisszióban levő CD-s gyermekekben (201)	135
VIII.2. CÖLIÁKIA.....	138
VIII.2.1. Klaudin (CLDN) expresszió cöliákias gyermekek proximális és disztális duodenumában (202).....	138
VIII.2.2. HSP72 expresszió (mRNS és fehérje) és lokalizáció vizsgálata cöliákiasok duodenumában (203).....	140
VIII.2.3. Az intesztinális alkalikus foszfatáz (iAP) expressziójának vizsgálata cöliákias gyermekek duodenum nyálkahártyájában (204)	142
VIII.2.4. Cöliákias gyermekek perifériás vérének immunfenotípus elemzése	143
VIII.2.5. Kóros transzglutamináz és plazminogénhiány a duodenális fekély patomechanizmusában (205).....	145
VIII.3. ALLERGIÁS KOLITISZ	147
XI.1. A TÉZISEK ALAPJÁT ADÓ ELSŐ, VAGY UTOLSÓ SZERZŐS IDEGEN NYELVŰ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE.	154
XI.2. A TÉZISEKHEZ KAPCSOLÓDÓ MAGYAR NYELVŰ PUBLIKÁCIÓK.....	156

ÁBRAJEGYZÉK

1. ábra. Bakteriális sejtfelismerő struktúrák (TLR és MBL) segítségével megvalósuló fagocitózis.	13
2. ábra. Felső endoszkópiánál észlelt fekélyes lézió egy Crohn-beteg gyermek gyomrában. .	15
3. ábra. A cöliákia patomechanizmusának vázlata.	18
4. ábra. Boholyatrófiás és normális duodenális mukóza endoszkópos képe.	19
5. ábra. Sejt-sejtközötti kapcsolóelemek vázlatos ábrázolása.	21
6. ábra. Az adaptív és a veleszületett immunrendszer fontosabb különbségei és sejtes elemei.	24
7. ábra. A TLR4 aktiváció és a következményes hatások vázlatos ábrája.	32
8. ábra. Az intesztinális alkalikus foszfatáz (iAP) lipopoliszacharidot (LPS) detoxifikáló folyamata az ábra bal oldalán (bal oldal: iAP jelenlétében, jobb oldal: iAP nélkül, a pirossal áthúzott nyilak az aktiváció gátlását jelölik).	34
9. ábra. A különböző specifikus immunfluoreszcens mintázatok.	44
10. ábra. A regulátoros T sejtek (Treg) azonosítása.	59
11. ábra. Az áramlási citométeres kiértékelés menete.	60
12. ábra. Az IBD (piros), a kolitisz ulceróza (kék) és a Crohn-betegség (zöld) incidenciája hazánkban 2007 és 2010 között.	72
13. ábra. A portói kritériumok szerint kiemelten javasolt 3 diagnosztikus tényező (felső endoszkópia, terminális ileum intubációja és speciális, vékonybelekre irányuló képalkotó vizsgálat: CT, MRI vagy kontrasztos passzázs) elvégzésének éves gyakorisága hazánkban 2007-2010 között.	72
14. ábra. A TLR2 mRNS expresszió SYBR Green alapú real time RT-PCR-rel történő kimutatásának egy reprezentatív képe.	86
15. ábra. A TLR2 mRNS expressziójának változása a frissen diagnosztizált (fd) IBD-s, illetve a kezelt, relapszusban lévő (r) IBD-s gyermekek, valamint a kontrollok kolon nyálkahártyájában.	87
16. ábra. A TLR4 mRNS expressziójának változása a frissen diagnosztizált (fd) IBD-s, illetve a kezelt, relapszusban lévő IBD-s gyermekek, valamint a kontrollok kolon nyálkahártyájában.	87

17. ábra. A TLR2, TLR3 és TLR4 fehérjeszintek változása a frissen diagnosztizált, illetve a kezelt, relapszusban lévő IBD-s gyermekek, valamint a kontrollok kolon nyálkahártyájában (reprezentatív ábra).	89
18. ábra. A TLR2 fehérje szintjének változása a frissen diagnosztizált, illetve a kezelt, relapszusban lévő IBD-s gyermekek, valamint a kontrollok kolon nyálkahártyájában.	89
19. ábra. A TLR4 fehérje szintjének változása a frissen diagnosztizált, illetve a kezelt, relapszusban lévő IBD-s gyermekek, valamint a kontrollok kolon nyálkahártyájában.	90
20. ábra. Az iAP mRNS expressziós változása kontrollok, Crohn-beteg (CD) gyermekek gyulladt és nem gyulladt, valamint kolitisz ulcerózas (UC) gyermekek gyulladt kolon nyálkahártyájában (real time-PCR).	91
21. ábra. Az iAP fehérjeszintek reprezentatív eredményei a kontrollok, Crohn-beteg (CD) gyulladt és nem gyulladt, valamint kolitisz ulcerózas (UC) gyermekek gyulladt kolon nyálkahártyájában (Western blot).	91
22. ábra. Az iAP fehérjeszintek változása a kontrollok, Crohn-beteg gyermekek (CD) gyulladt és nem gyulladt, valamint kolitisz ulcerózas (UC) gyermekek gyulladt kolon nyálkahártyájában.	92
23. ábra. Az iAP és TLR4 lokalizációja Crohn-beteg (CD), kolitisz ulcerózas (UC) és kontroll gyermekek terminális ileum és kolon nyálkahártyájában.	93
24. ábra. Az adaptív immunitás sejtjes elemeinek prevalenciája Crohn-beteg gyermekekben.	96
25. ábra. A veseszűletett immunitás sejtjes elemeinek prevalenciája Crohn-beteg gyermekekben.	98
26. ábra. A klaudinok expressziójának vizsgálata immunhisztokémiai módszerrel cöliákiasok duodenális mukózájában.	100
27. ábra. A CLDN 2 expressziója cöliákias betegek proximális és disztális duodenumában a kontroll mintákhoz képest.	101
28. ábra. A CLDN 3 expressziója cöliákias betegek proximális és disztális duodenumában a kontroll mintákhoz képest.	101
29. ábra. A HSP72 mRNS expressziója kezeletlen és kezelt cöliákias gyermekek, valamint kontrollok duodenum nyálkahártyájában.	102
30. ábra. A HSP72 fehérje szintje kezeletlen és kezelt cöliákias gyermekek, valamint kontrollok duodenum nyálkahártyájában.	103

31. ábra. A HSP72 lokalizációja kezeletlen és kezelt cöliákiás gyermekek, valamint kontrollok duodenum nyálkahártyájában.	104
32. ábra. Az iAP mRNS expresszió változása kontrollok, újonnan diagnosztizált cöliákiás, valamint gluténmentes diétát tartó cöliákiás (GFD) gyermekek duodenum nyálkahártyájában.	105
33. ábra. Az iAP fehérjeszintek reprezentatív eredményei kontrollok, újonnan diagnosztizált cöliákiás, és gluténmentes étrendet tartó cöliákiás (GFD) gyermekek duodenum nyálkahártyájában (Western blot).	106
34. ábra. Az iAP fehérjeszintek változása kontrollok, újonnan diagnosztizált cöliákiás, és gluténmentes étrendet tartó cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában. ...	106
35. ábra. Az iAP és TLR4 lokalizációja egészséges kontroll, újonnan diagnosztizált cöliákiás és gluténmentes étrendet tartó cöliákiás (GFD) gyermekek duodenum nyálkahártyájában.	107
36. ábra. Az adaptív immunitás sejtjei és korrelációi újonnan kórismézett cöliákiásokban, kezelt, gluténmentes diétát folytatókban (GFD) és kontrollokban (A-D).	109
37. ábra. Az adaptív immunitás sejtjei és korrelációi újonnan kórismézett cöliákiásokban, kezelt, gluténmentes diétát folytatókban (GFD) és kontrollokban (E-H).	110
38. ábra. A veleszületett immunitás sejtjei és korrelációi újonnan kórismézett cöliákiásokban, kezelt, gluténmentes diétát folytatókban (GFD) és kontrollokban (A-D).	112
39. ábra. A veleszületett immunitás sejtjei és korrelációi újonnan kórismézett cöliákiásokban, kezelt, gluténmentes diétát folytatókban (GFD) és kontrollokban (E-H).	113
40. ábra. A-D: Dupla immunfluoreszens vizsgálat a duodenális mukózában.	114
41. ábra. Az immunfenotípus változása allergiás kolitiszben és kontrollban.	117

TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

1. táblázat. A Crohn-betegség montreáli osztályozása (Satsangi, Gut, 2006, ref.27).	6
2. táblázat. Egy éves életkor alatt induló Crohn-betegség differenciáldiagnosztikájában szereplő gyakoribb betegségek.	9
3. táblázat: Gyermekekori IBD-ben előforduló fontosabb extraintesztinális manifesztációk.	9
4. táblázat. Marsh felosztás a cöliákia szövettani értékeléséhez. IEL: intraepiteliális limfociták (ref. 122,123).	20
5. táblázat. A regulátoros T sejtek feltételezett funkciói in vivo és in vitro tanulmányok alapján (ref. 145).	25
6. táblázat. A természetes és indukált regulátoros T sejtek jellemzői (ref. 145).	26
7. táblázat. A Treg- és NKT sejtek összehasonlító elemzése	30
8. táblázat. A Toll-like receptorok (TLR) és legfontosabb kapcsolódó ligandjuk.	31
9. táblázat. A szerológiai vizsgálatba bevont IBD-s betegek fontosabb klinikai adatai.	42
10. táblázat. A PCR-ek során alkalmazott primerszekvenciák és jellemzők.	46
11. táblázat. Az újonnan diagnosztizált Crohn-beteg (CD) és kolitisz ulcerózás (UC) betegek klinikai jellemzői.	50
12. táblázat. A vizsgálatba bevont betegek és egészséges kontrollok klinikai és laboratóriumi adatai.	53
13. táblázat. Az alkalmazott sejtfelszíni és sejten belüli fluoreszcens festékek.	55
14. táblázat. Példa panel összeállításokra BD FACS Aria típusú áramlási citométerre, saját szűrő-beállítással sejtfelszíni és sejten belüli mérésekhez.	58
15. táblázat. Újonnan diagnosztizált cöliakiás (C) és gluténmentes étrendet tartó cöliakiás (GFD) gyermekek klinikai jellemzői.	63
16. táblázat. A vizsgálatban résztvevő betegek és kontrollok adatai.	65
17. táblázat. Az allergiás kolitiszes (AC) gyermekek klinikai, laboratóriumi és endoszkópos jellemzői.	67
18. táblázat. A regisztrált IBD-s betegek makroszkópos és mikroszkópos eltéréseinek előfordulási gyakorisága a felső gasztrointesztinális traktusban.	75
19. táblázat. A felső endoszkópos vizsgálatok szűk megítélése (CD-re jellemző makroszkópos léziók és granulóma), és tág megítélése (összes makroszkópos és hisztológiai elváltozás).	76
20. táblázat. A felső endoszkópiával vizsgált Crohn-betegek betegségaktivitása.	77

21. táblázat. Mannóz-kötő lektin (MBL) szintek Crohn-betegségben (CD), kolitisz ulcerozában (UC) és a kontroll csoportban.	79
22. táblázat. Kolitisz ulcerozás (n=52) gyermekek klinikai fenotípusa és szerológiai státusza a különböző mannóz-kötő lektin (MBL) szint kategóriák szerint.	81
23. táblázat. Crohn-beteg (n=107) gyermekek klinikai fenotípusa és szerológiai státusza a különböző mannóz-kötő lektin (MBL) szint kategóriák szerint.	82
24. táblázat. Különböző szerológiai markerek diagnosztikus értéke a gyulladásos bélbetegségben (IBD) szenvedő gyermekekben. Vastagon szedve a gyakorlati jelentőséggel bíró kombinált alkalmazás.	84
25. táblázat. PAB és rPAB pozitivitás (%) összefüggése a betegség lokalizációjával (L) és viselkedésével (B) Crohn-beteg gyermekekben.	84
26. táblázat. Az adaptív immunitás sejtes elemeinek prevalenciája Crohn-beteg gyermekekben.	95
27. táblázat. A veleszületett immunitás sejteinek prevalenciája Crohn-beteg gyermekekben.	97
28. táblázat. Az adaptív immunitás elemeinek prevalenciája és arányai újonnan kórismézett cöliákiásokban, kezelt, gluténmentes diétát folytatókban (GFD) és kontrollokban.	108
29. táblázat. A veleszületett immunitás elemeinek prevalenciája és arányai újonnan kórismézett cöliákiásokban, kezelt, gluténmentes diétát folytatókban (GFD) és kontrollokban.	111
30. táblázat. Laboreredményeink az allergiás kolitiszes, az eozinofil kolitiszes és a kontroll csoportban.	115
31. táblázat. Immunfenotípus vizsgálati eredmények, és a citokinek prevalenciája allergiás kolitiszben és kontrollokban.	116

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AC	allergiás kolitisz
ADA	adalimumab
ANCA	anti neutrofil citoplazmatikus antitest
AP1	aktivátor protein1
APC	antigén prezentáló sejt
AS	antiszensz
ASA	aminoszalicilsav
ASCA	Saccharomyces cerevisiae elleni antitest
AZA	azatioprin
CD	Crohn-betegség
CLDN	klaudin
CRP	C-reaktív protein
CTLA	citotoxikus T limfocita antigén
DC	dendritikus sejt
DSS	dextrán-szódium szulfát
EC	eozinofil sejtes kolitisz
EIM	extraintesztinális manifesztáció
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	áramlási citométer
Fe	vas
FoxP3	forkhead box P3 transzkripció faktor
FSC	„forward scatter characteristics”, méret szerinti kategorizálás
frIBD	frissen diagnosztizált IBD
GAB	kehelysejt ellenes antitest
GAPDH	glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz
GFD	gluténmentes diéta (gluten free diet)
GI	gasztrointesztinális
GITR	glükokortikoid indukálta tumor nekrosis faktor receptor gén
HC	hematokézia
IAP	intesztinális alkalikus foszfatáz
iTreg	indukálható regulátoros T sejt

HIF	hipoxia-indukálta faktor
HSP	hősokk fehérje (heat-shock protein)
H. pylori	Helicobacter pylori
Ht	hematokrit
HUPIR	Magyar IBD regiszter (Hungarian Pediatric IBD Registry)
iAP	intesztinális alkalikus foszfatáz
IBD	gyulladásos bélbetegség (inflammatory bowel disease)
IBD-U	nem besorolható IBD (IBD unclassified)
ICAM	intercelluláris adhéziós molekula
IEL	intraepiteliális limfociták
IFN-γ	interferon-gamma
IFX	infliximab
IPEX	immun diszreguláció, poliendokrinopátia, enteropátia, X-kromoszómához kapcsolt szindróma
IQR	inter-kvartilis tartomány
Ig	immunglobulin
IL	interleukin
IRAK1	IL-1-receptorhoz kapcsolt kináz
KO	génkiütött (knock out)
LBP	LPS kötő fehérje
LNH	limfonoduláris hiperplázia
LPC	lamina propria sejt
LPS	lipopoliszacharid (endotoxin)
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MBL	mannóz-kötő lektin (mannose binding lectin)
MICA	MHCI polipeptid-rokon szekvencia A
MyD88	mieloid differenciálódási 88. faktor
NK	természetes ölő sejt (natural killer cell)
NKT	természetes ölő T sejt (natural killer T cell)
NNL	nagy nagyítású látótér
nTreg	természetes regulátoros T sejt
OGD	özofago-gasztroduodenoszkópia
p	perianális
PAB	pankreász ellenes antitest

rPAB	rekombináns pankreász ellenes antitest
PBMC	perifériás vér mononukleáris sejt
PCDAI	gyermekkori CD aktivitási index (pediatric Crohn disease activity index)
PLT	trombocita (platelet)
PSC	primer szklerotizáló kolangitisz
RCD	refrakter cöliákia
RETF	Real time PCR-fluoreszcens rezonancia energia transzfer
rIBD	relapszusban levő IBD
RT-PCR	real-time reverse transcription polymerase chain reaction
SGK	szérum- és glükokortikoid-regulációs kináz
SSC	granuláltság szerinti kategorizálás (side scatter characteristics)
Tc	citotoxikus T sejt
TCR	T sejt receptor
TG	transzglutamináz
TGF	transzformáló növekedési faktor
TIR	Toll/IL-1R domén
TIRAP	TIR domén tartalmú adaptor fehérje
TRAF	TNF receptor-asszociált faktor
Th	T helper sejt
TLR	Toll-like receptor
TNBS	trinitrobenzén-szulfonsav
TNF-α	tumor nekrosis faktor alfa
Treg	regulátoros T sejt
UC	kolitisz ulceróza
WFH	testsúly a hosszhoz viszonyítva (weight for height)
WT	vad típus (wild type)

I. ELŐZMÉNYEK ÉS IRÁNYVONALAK

Tudományos fokozatomat (Ph.D.) 2004-ben szereztem, cöliákiás és ételallergiás betegek mukózájában citokinek- és adhézions molekulák expresszióját elemeztem. Vizsgálataim alapján megállapítottam, hogy késői immunreakciót mutató ételallergiás betegek lamina propriájában fehérje- és mRNS szinten is **IFN- γ** dominancia mutatkozott, a fokozott **kriptaproliferáció** és **HLA-DR** expresszió mellett (1). Ezen kívül az adhézions molekulák közül az **ICAM-1** és a limfociták mukózális „hazatéréséért” felelős **alfa4béta7** expresszió volt emelkedett (1). A látott kép részben emlékeztetett a cöliákia kezdeti stádiumára, a látens fázisra, azonban az észlelt immunhisztológiai eltérések segítségével attól könnyen elkülöníthető, jelezve munkám gyakorlati jelentőségét. Érdekes megfigyelés volt az ételallergiás gyermekek duodenumában észlelt **limfonoduláris hiperplázia**, amely a magas **$\gamma\delta$ T** sejtszámmal együtt az orális tolerancia csökkenésére utal (2). Ebből az eredményből levonhattuk azt a következtetést, hogy amennyiben felső endoszkópiás vizsgálatnál látjuk a limfonoduláris hiperpláziát, akkor gondoljunk táplálékallergia lehetőségére, még akkor is, ha a rutin szövettani vizsgálat normális, sem boholykárosodás, sem eozinofil infiltráció nem észlelhető.

Ezt követően kutatói munkám egy része továbbra is az immunmediált gasztroenterológiai kórképek patomechanizmusának megismerésére irányult, hiszen a **cöliákia** egy olyan immunmediált kórkép, ahol egyedülálló módon ismert a kiváltó ok, a glutén (3,4). Ez modellként szolgálhat más immunmediált betegségek tanulmányozásához is. A kórkép patomechanizmusában fontosak a sejtkapcsoló struktúrák károsodásai, azon belül a **klaudinok** (CLDN) expressziója (5,6). Meglepő módon cöliákiásokban újabban ismeretlen eredetű eróziókat, fekélyes elváltozásokat írtak le, melynek patológiája ismeretlen (7).

A másik kórkép, az ételallergia, különösen a csecsemőkori véres székllettel jelentkező formának (AC: **allergiás kolitisz**) gyakorisága egyre növekszik, de szerencsére a betegség lefolyása általában kedvező (8). Ez a speciális allergiás entitás kezdetben nem különíthető el a ritka, csecsemőkorban jelentkező gyulladásos bélbetegségtől, így ennek a betegségnek a tanulmányozása igen nagy gyakorlati jelentőséggel bír mindkét kórkép szempontjából.

A cöliákia és az AC mellett - a Ph.D. fokozatom megszerzése után – kutatásom középpontjába a **gyulladásos bélbetegség (IBD)** került. Az IBD jelenleg az egyik legfontosabb gasztroenterológiai kórkép világszerte, amit jól mutat, hogy 6 évvel ezelőtt az első IBD konferencián kb. 500 szakember vett részt, idén (2012. február) pedig több mint

4200 fő. Az IBD előtérbe kerülését az magyarázza, hogy a kórkép oka részleteiben nem ismert, terápiája nem megoldott és gyakorisága egyre növekszik (9). A nyugati országokban az incidencia és prevalencia is jelentősen növekedett az elmúlt ötven évben: felnőttkori Crohn-betegségben (CD) a két érték: $6-15/10^5$ és $50-200/10^5$, kolitisz ulcerózában (UC) pedig $8-14/10^5$ és $120-200/10^5$ (10). A közelmúltban megjelent prospektív vizsgálatok azt mutatták, hogy mind az USA-ban (Wisconsin), mind Svédországban (Stockholm) a gyermekkori CD incidenciája kétszerese volt az UC-nek (11, 12). Bár az IBD a köztudatban elsősorban a felnőtteket érintő kórfolyamat, a betegségek 10-25%-a gyermekkorban kezdődik (13). A gyulladásos bélbetegségek kb. 1-2%-a egy évesnél fiatalabb gyerekekben, csecsemőkben kezdődik. Ennek az a kiemelt jelentősége, hogy kezdetben ezeket a csecsemőket tévesen **allergiás kolitisznek** (AC) gondolják, hiszen teljesen hasonló prezentációs tünetek, laboreltérések, endoszkópos kép és szövettani eltérés lehet jelen (14).

A **gyermekkori IBD előfordulása** is a felnőttkorihoz hasonlóan emelkedő tendenciát mutat, de hazai adatok nem ismeretesek. Említésre méltó egy 1688 betegre kiterjedő svájci vizsgálat, amely nem támasztotta alá azt a hipotézist, hogy az IBD megjelenésének kezdete korábbi életszakaszra tolódott volna, hanem valóban gyakoribbá váltak a megbetegedések: gyermekkorban és felnőttkorban egyaránt (15). Magyarországon prospektív, az egész országra kiterjedő epidemiológiai adatok korábban nem voltak ismeretesek, ismeretlen továbbá nemzetközi szinten is, hogy a diagnosztikában mi a **felső endoszkópia** igazi szerepe, milyen a betegek aktivitási indexének változása a kezelés függvényében, és milyen a kórkép pontos lefolyása.

Az IBD diagnózisát nem lehet egy paraméterre alapozva felállítani. A kórismézést a klinikai, endoszkópos, képalkotó, laboratóriumi és szövettani adatok együttes értékelése alapján, nem ritkán csak hosszabb megfigyelési idő után mondhatjuk ki. Éppen ezért fontos, különösen gyermekkorban olyan kevésbé invazív (szerológia-vérvétel) markerek kutatása, ami megbízható diagnosztikai kompetenciával bírhat. Szerológiai vizsgálatok közül említésre méltó a **mannóz-kötő lektin (MBL)** elemzése, melynek a patomechanizmusában betöltött szerepét feltételezik, de gyermekkori prospektív vizsgálat még nem történt. Az MBL a természetes immunitás eleme, amely a komplement rendszer segítségével, az opszonizációval fokozza az adott mikroorganizmus fagocitózist (16). Új ismeret, hogy az MBL a TLR-hez hasonlóan intracelluláris szignációs szerepet tölt be, így feltételezhető, hogy az IBD patomechanizmusában szerepet játszik, hasonlóan az **intesztinális alkalikus foszfatázhoz (IAP)** (17).

Sajnos az IBD pontos oka nem ismert, de úgy tűnik, hogy genetikai hajlam, trigger faktorok, illetve környezeti tényezők hatására egy abnormális, krónikus immunválasz generálódik, mely a saját bélflóra elleni tolerancia részleges elvesztéséhez vezet (18). Ebben az immunfolyamatban a veleszületett (természetes: innate), és az adaptív immunrendszer működési zavarát tételezik fel (19). Újabban a **regulátoros T sejtek** (Treg) központi szerepe került előtérbe, bár gyermekkori adatok nem ismeretesek (20). Szintén ismeretlen, hogy a természetes-veleszületett immunválaszban a **Toll-like receptorok** (TLR) milyen szerepet töltenek be az IBD patomechanizmusában (21).

Doktori téziseim alapjául szolgáló kutatásaim tehát 3 immunmediált gasztroenterológiai kórkép vizsgálataival kapcsolatosak: az IBD-vel, a cöliákiával és az allergiás kolitisszel.

II. BEVEZETÉS

II.1. GYULLADÁSOS BÉLBETEGSÉG (IBD)

A gyulladásos bélbetegség (IBD) két fő formája a Crohn-betegség (CD) és a kolitisz ulceróza (UC), melynek diagnózisa sokszor nehéz, de a klinikai, endoszkópos, radiológiai, laboratóriumi és szövettani kép együttes eredménye alapján általában felállítható. Az egyre gyakrabban kórismézésre kerülő betegségcsoport etiológiája máig ismeretlen, multifaktoriálisnak tekinthető, melyben genetikai hajlam, trigger faktorok, illetve környezeti tényezők hatására abnormális, krónikus immunválasz generálódik (22).

A felnőtt-, és a gyermekkori IBD alapvető jellemzői megegyeznek, de az életkori különbségek miatt is sok az eltérés. Felnőttkori UC-ban gyakoribb a rektum illetve a bal kolonfél izolált érintettsége, míg gyermekkorban a kiterjedt kolitisz dominál. A fő tünetek gyermek- és felnőttkorban lényegileg azonosak, de gyermekek közt gyakoribbak az atípusos esetek, sokszor általános, illetve extraintesztinális tünetekkel, növekedési visszamaradással indul a kórkép (24). Gyermekkorban rendkívüli jelentőségű a megfelelő hossznövekedés, csont- és súlygyarapodás. Növekedési zavar a gyermekkori CD-ben 85%-ban, UC-ban pedig 65%-ban igazolható (25-27).

Az IBD epidemiológiája

A gyermekkori epidemiológiai adatok összehasonlító értékelését nehezíti, hogy a különböző felmérésekben a gyermekkor felső határaként különböző életkorokat adnak meg (15-21 év). A két legfontosabb adat, hogy a gyermekkori IBD incidenciája fokozatosan növekszik, és a CD incidenciája egyre több felmérésben meghaladja az UC-t. Az Észak-Franciaországban végzett összehasonlító elemzés (1988-1999) megállapította, hogy a gyermekkori CD incidenciája 2,1-ről 2,6-ra ($/10^5$) nőtt, miközben az UC gyakorisága nem változott (28). A Cseh Köztársaságban 1990-ben a CD incidenciája a 15 éves életkor alatti gyermekekben $0,25/10^5$ volt, 2001-ben pedig már $1,25/10^5$ (29). A legújabb epidemiológiai felmérések alapján a gyermekkori IBD incidenciája leginkább a 10 éves életkor alatt növekszik, mégpedig évi 7,6%-kal (5-9 év között), és évi 5%-kal (0-4 év között). Ebben a kanadai hosszú távú felmérésben (1991-2008) a gyermekkori IBD prevalenciája 42,1-ről (1994) 56,3-ra emelkedett (2005). Ehhez hasonlóan, a 100 000 gyermekre vonatkoztatott incidencia 9,5-ről (1994) 11,4-re (2005) növekedett (30), amit további vizsgálatok is megerősítettek (31,32).

Hazánkban az IBD incidenciája, klinikai prezentációja, aktivitási jegyei, laboratóriumi eltérései és terápiás ismérvei ismeretlenek voltak. Téziseim egyik pillérét a prospektív, országosan szervezett gyermek IBD regiszter adja, amit 2007 januárjától szerveztem és működtetek, sokak segítségével.

Genetikai- és környezeti tényezők IBD-ben

Általánosságban elmondható, hogy a genetikai tényezők jelentősége CD-ben nagyobb, mint UC-ben. A gyermekek 20-35%-ánál lehet pozitív családi anamnézist igazolni (33). Az IBD-vel kapcsolatos ismereteink közül jelenleg legnagyobb jelentőségű a 16. kromoszómán levő NOD2/CARD15, a DLG5 és az autofágiával kapcsolatos polimorfizmusok (ATG16L1 és IRGM) (34-44). Az IBD elmúlt 3 évtizedben megfigyelt rohamos növekedésének hátterében környezeti tényezők is állnak, hiszen ilyen rövid idő alatt a genomban nem jöhetnek létre ekkora mértékű, utódokra örökíthető változások (45-48).

Másfelől első pillantásra genetikailag determináltak látszó jegyek hátterében is gyakran környezeti faktorok állnak. A szülőket és gyerekeiket egyaránt érintő családkutatások megállapították, hogy a gyermekeknél jóval fiatalabb életkorban kórismézik a kórképet, mint a szüleiknél, vagyis gondolhatnánk, ez genetika: CD-ben 17,5 évvel, UC-ben pedig 16 évvel korábban állítják föl a diagnózist. Azonban ennek hátterében elsősorban nem genetikai tényezők állnak, hiszen ekkor markánsabb különbség lenne az IBD két formája között (CD-ben erősebb genetikai hatás). Valójában arról lehet szó, hogy az elmúlt évtizedekben gyökeresen megváltozott környezeti tényezők a gyerekeket már a megszületésüktől érintik, míg a szüleik a káros faktorokkal csak később érintkeztek (inverz korreláció a diagnózis felállításának éve és a születési év között) (49).

Crohn-betegség (CD)

A CD olyan krónikus gyulladásos betegség, mely a béltraktus bármely területén kialakulhat. Az UC összefüggő, folytonos kiterjedésével ellentétben a CD szegmentális elhelyezkedésű, az érintett bélszakaszok között gyulladásától megkímélt részekkel. A betegség korábbi elnevezésének megfelelően (ileitis terminális) a leggyakrabban érintett bélszakasz az ileum terminális része (önállóan vagy a kolonnal együtt). A közhiedelemmel ellentétben az eredeti „ileitis terminális” elnevezés nem az ileum disztális, terminális végét jelentette, hanem a kórkép – akkori – súlyos, sokszor végzetes (terminális) kimenetelét. Izolált vékonybél érintettség 10-20%-ban, ileokolitisz 40-60%-ban, izolált kolitisz 20-30%-ban fordul elő. Bár fontos kiemelni, hogy a 10 éves életkor alatti (korai kezdetű) CD többsége izolált kolon

érintettséget mutat. Gyermekkorban a „panentericus” fenotípus (L3+L4: felső gasztrointesztinális és ileokolikus érintettség) dominanciája észlelhető. Izolált felső gasztrointesztinális érintettség ugyanakkor csak 1-2 % alatt figyelhető meg. A montreáli osztályozás (27) a lokalizáción és a betegség jellegén kívül a betegek életkorát is figyelembe veszi (**1. táblázat**). A CD-s gyermekek nagyobb részében gyulladásos-szövődménymentes betegségforma van jelen (B1), de szövődményként szűkület, fisztula, tályog alakulhat ki (B2-B3). A betegség diagnózisakor és a nyomon követésénél is nagyon fontos a megfelelő kategorizálás, mert ennek terápiás és prognosztikai következményei vannak. Például L2 lokalizációnál jóval ritkábban kell számolni sztenózissal, vagy perianális komplikációval, ellentétben az L1 vagy L3 esetekkel.

1. táblázat. A Crohn-betegség montreáli osztályozása (Satsangi, Gut, 2006, ref.27).

GI: gasztrointesztinális érintettség, p: perianális

Életkor			
A1	16 év alatt		
A2	17-40 év között		
A3	40 év felett		
Lokalizáció			
L1	terminalis ileum	L1+L4	terminális ileum+felső GI
L2	kolon	L2+L4	kolon+felső GI
L3	ileokolon	L3+L4	ileokolon+felső GI
L4	felső GI	-	-
Jelleg / „Behaviour”			
B1	nem penetráló, nem sztenotizáló	B1p	nem penetráló, nem sztenotizáló+perianális betegség
B2	sztenotizáló	B2p	sztenotizáló+perianális betegség
B3	penetráló	B3p	penetráló+perianális betegség

Ezt a montreáli klasszifikációt módosították a közelmúltban Párizsban, tovább hangsúlyozva a gyerek- és felnőttkori különbségeket (50). Ennek értelmében az A1 csoportot két részre osztották (10 év alatti és fölötti korosztályra, A1a és A1b), valamint az L4 lokalizációt is, annak megfelelően, hogy a felső GI traktus érintettsége a Treitz-szalagtól proximálisan vagy disztálisan helyezkedik el (L4a és L4b). G0 és G1 kategóriaként külön jelölik, hogy a

betegnek van-e növekedési elmaradása. Ennek a párizsi klasszifikációnak a validálása, széles körű gyakorlati bevezetése a jövőben várható.

Mivel a CD aktivitásának meghatározása kulcsfontosságú a diagnózis elején, valamint változása korrelál a hatékony terápiával, fontos ennek részletes ismertetése. Gyermekkorban a CD aktivitásának jellemzésére használt mutató a PCDAI (Gyermekekori CD aktivitási index) **(1. melléklet a Függelékben)**. Az értékelés (0-100 pont) főbb ismérvei a következők: betegek aktivitása, fizikális állapota, a széklet száma és minősége, növekedés elmaradás/fogyás, bizonyos laboratóriumi eltérések, perianális elváltozások és az extraintesztinális manifesztációk jelenléte (51). A PCDAI érték 10 alatt remisszióra, 30 fölött kifejezett aktivitásra, 40 fölött pedig súlyos állapotra utal. A PCDAI érték csökkenése a terápia sikerességére is utal.

Kolitisz ulceróza (UC)

Az UC a vastagbél megbetegedése, bár mikroszkóposan érintheti a GI traktus egyéb területét. A gyulladás a mukózát érinti, mely folyamatos, a rektumban kezdődik és különböző fokban proximálisan terjed. A kiterjedés alapján az UC három típusa különböztethető meg: proktitisz (E1), bal oldali kolitisz (E2) és extenzív kolitisz (E3). A 2011-ben publikált párizsi klasszifikáció egy E4-es terminust is bevezetett, amely a flexura hepaticától proximális érintettséget jelöli (pankolitisz). Ennek azonban nincs nagy gyakorlati jelentősége, mert terápiás konzekvenciával nem bír, az E3 és az E4 egyforma kezelést igényel. Ekkor került bevezetésre az S1 elnevezés is, amely arra utal, hogy az UC-s gyermeknek legalább egyszer súlyos kolitisze zajlott (rosszabb jövőbeli prognózis) (50).

Általánosságban elmondható, hogy az UC-s gyermekek legnagyobb részében extenzív vagy pankolitisz áll fenn a diagnózis felállításakor (E3,E4), míg felnőttekben a gyulladás főleg a rektumra és a bal kolonfélre lokalizálódik (E1, E2). Néhány betegben a gyulladás a terminális ileumot is érintheti („backwash ileitis”), mely megnehezítheti az UC elkülönítését a CD-től, de itt ez főként mikroszkópikus mértékű. A klasszikus nézet szerint UC-ben a rektum mindig érintett. Néhány tanulmány azonban rektális megkíméltségről („rectal sparing”) számol be UC-s gyermekekben (52). A montreáli klasszifikáció 2 szempont szerint, a kiterjedés és a súlyosság alapján osztályozza a betegeket. Gyermekeknél a betegség súlyosságának, aktivitásának a megítélésére ennél jobban alkalmazható a gyermekekori kolitisz ulceróza aktivitási index (PUCAI) **(2. melléklet a Függelékben)** (53). Az értékelés (0-85 pont) főbb szempontjai: a hasi fájdalom intenzitása, a rektális vérzés mennyisége, a széklet száma és minősége, az éjszakai székürítés és a betegek aktivitása (53,54). Súlyos UC-ben, az indulás

utáni 5. napon mért 45 fölötti PUCAI érték rossz prognózisra utal, akár kolektómiát is előrevetíthet.

Nem besorolható IBD (IBD-U)

Az IBD-s betegek egy részében a klinikai, endoszkópos és hisztológiai kép alapján nem lehet a CD vagy az UC definitív diagnózisát felállítani (nem besorolható IBD, IBD-U: unclassified). Egyes tanulmányok szerint az IBD-U prevalenciája gyermekekben magasabb (15-20%), mint felnőttekben (5-15%), így jelentősége is nagyobb a gyermekpopulációban (55). Egy tanulmányban 74 IBD-U-s gyermek kezdeti kivizsgálásakor 80%-ban találtak pankolitist, a 20%-ban észlelt bal oldali kolitisz pedig 6 éven belül pankolitisszé progrediált. A későbbiekben a betegek egyharmadában UC-t vagy CD-t diagnosztizáltak, kétharmadában pedig IBD-U maradt a diagnózis a 7 éves követési idő alatt (56). Az IBD-U általában fiatal életkorban jelentkezik, agresszív betegség-fenotípust mutat, súlyos kolitisszel, rapid progresszióval.

Korai kezdetű IBD

Az allergiás kolitisszal történő differenciáldiagnosztikai nehézségek miatt részletesen kell ismertetni a korai kezdetű (5 év alatti) IBD-t, amely a gyermekkori gyulladásos bélbetegség sajátos formája. Ebben a formában a kisgyermekek jelentős részének a CD kórismézésekor colon érintettsége (kb. 90%) és perianális betegsége van. Érdekes megfigyelés, hogy amennyiben 5 év alatt IBD-t kórisméznek és a gyermeknek növekedési/súlygyarapodási elmaradása is van, akkor az igen nagy valószínűséggel *nem* UC. Philadelphiai IBD centrumban 82 gyermeket követtek nyomon, akiknél 5 évnél fiatalabb életkorban történt az IBD kórismézése (35 CD, 30 UC és 17 IBD-U) (57).

Különös diagnosztikus és terápiás nehézséggel jár az **1 éves életkor alatt** induló IBD (IBD-s gyermekek kb. 1%-a). Enyhébb esetben a legtöbbször még anyatejjel táplált csecsemő hematokéziájának (friss véres széklet) hátterében – infekció kizárása után – először általában allergiás kolitist vélelményeznek, és a terápia sikertelensége, illetve a hosszabb távú nyomon követés vezet a helyes diagnózishoz. Az előbb említett kórképeken kívül a differenciáldiagnosztikában még szóba jövő betegségeket a **2. táblázat** foglalja össze. Rendkívül érdekes az a megfigyelés, hogy a csecsemőkori fisztulás, tályogos, fekélyes bélgyulladásnál kóros Interleukin-10 receptoreltérésre is gondoljunk, mert ez a kórkép megtevesztésig hasonlít a CD-re, még granulóma is előfordulhat benne (58).

2. táblázat. Egy éves életkor alatt induló Crohn-betegség differenciáldiagnosztikájában szereplő gyakoribb betegségek.

- Fertőzés (CMV, Clostridium difficile, E. histolytica, TBC)
- Allergiás kolitisz
- Eozinofil sejtes kolitisz
- Szerzett/kongenitális immunhiány
- Krónikus granulomás betegség (CGD)
- Glikogenózis 1/b típus
- Interleukin-10 receptor rendellenesség

Extraintesztinális tünetek IBD-ben

A CD (fogyás, hasfájás, növekedésbeli elmaradás, elmaradt pubertás, hematokézia) és az UC (hasfájás, véres hasmenés) jól ismert, kardinális tüneteinek kívül az extraintesztinális manifesztációs (EIM) jegyeket emelem ki, egyrészt azért, mert gyakori differenciáldiagnosztikai problémát jelentenek, másrészt az IBD regiszterünkkel (HUPIR) is kapcsolatos, hiszen korábban ennek gyakorisága nem volt ismert hazánkban. Nem egységes kritériumok alapján az EIM előfordulása felnőttkori IBD-ben 6-50%, gyermekekben 10-80% is lehet (59). A legfontosabb extraintesztinális manifesztációkat a **3. táblázat** tartalmazza.

3. táblázat: Gyermekkori IBD-ben előforduló fontosabb extraintesztinális manifesztációk.

- **Bőr:** eritéma nodórum, pioderma gangrenózum, metasztatikus CD
- **Száj, szájüreg:** keilitisz, sztomatitisz, afta
- **Szem:** uveitisz, episzkleritisz
- **Ízületek:** artritisz, spondilitisz ankilóza
- **Máj:** primer szklerotizáló kolangitisz (PSC), hepatitisz, epekő
- **Vese:** vesekő, hidronefrózis
- **Általános és egyéb:** pubertás tarda, osteoporózis, növekedésbeli elmaradás, trombózis, pankreatitisz

Az IBD diagnosztikája

Terjedelmi korlátok miatt döntően csak azokat a diagnosztikus elemeket ismertetem részletesen, amelyek közvetlenül kapcsolódnak az értekezés eredményeihez.

Szerológiai vizsgálatok

A „rutin” laboratóriumi-, képkotó- és székletvizsgálatokon kívül az IBD diagnosztikájában bizonyos szerológiai vizsgálatok segíthetnek. A legtöbb ismeret az **ASCA** (*Saccharomyces cerevisiae* elleni antitest) és a **pANCA** (perinukleáris antineutrofil citoplazmatikus antitest) antitestekkel kapcsolatosak. A pANCA leggyakrabban UC-ben, az ASCA pedig CD-ben van jelen (60). A korábbi tanulmányok a pANCA szenzitivitását 57-83%, specificitását 65-93% közöttinek találták az UC-s gyermekekben, míg az ASCA szenzitivitása 44-76%, specificitása 88-95% közötti volt retrospektíven a CD-s gyermekekben (61-65). A pANCA ugyanakkor a CD-s gyermekek 25%-ban is kimutatható, hiszen L2 érintettségben pozitív lehet. PANCA-pozitivitás egyéb kolitiszekben (pl. kollagén vagy eozinofil kolitisz) is észlelhető. Az ASCA jelenlétét pedig más autoimmun és gasztrointesztinális betegségekben (pl. cöliákia, cirrózis, mukoviszcidózis) is leírták. Ezek a szerológiai markerek IBD irányú szűrővizsgálatra alacsony szenzitivitásuk miatt nem alkalmasak. A vizsgálatok kombinációja viszont segíthet a CD és UC differenciáldiagnosztikájában, amennyiben a hagyományos vizsgálati módszerekkel a diagnózis nem egyértelmű. Kiemelésre érdemes, hogy sem az ASCA, sem pedig a pANCA negativitás nem zárja ki az IBD diagnózis felállítását, ugyanakkor az antitestek jelenléte sem jelent egyértelműen IBD-t. Az IBD-vel kapcsolatos szerológiai markerek ugyanakkor összefüggést mutathatnak a betegség fenotípusával és lefolyásával, ezáltal fontos, nem-invazív prognosztikai szerepük lehet, amelynek különösen gyermekkorban lehet kiemelt jelentősége. Ennek megfelelően az ASCA antitestek jelenléte összefüggést mutat a fiatalabb életkorral a betegség kezdetekor (66), az ileális érintettséggel, a penetráló és sztenotizáló betegséggel (67), valamint a sebészi beavatkozások emelkedett rizikójával, nem csak felnőttkori, hanem gyermekkori CD-ben is (68). Ugyanakkor fiatalabb életkorban az antitestek általában ritkábban kimutathatóak, ezáltal kevésbé szenzitívek, különösen 5 éves életkor alatt.

Új típusú antitestek: PAB és GAB

A közelmúltban az ASCA és pANCA antitesteken kívül néhány új típusú antitestet is leírtak, és fölvetették esetleges szerepüket az IBD diagnosztikájában. Az újabban felfedezett pankréász ellenes (PAB), és kehelysejt ellenes [antibodies against goblet cells (GAB)] autoantitestekről még viszonylag kevés adat áll rendelkezésre, releváns gyermekkori adat pedig egyáltalában nem ismert.

Pankreász ellenes antitestek (PAB)

Felnőtt IBD-s betegekben végzett tanulmányok alapján a PAB specificitása CD-ben magas (92-95%), de szenzitivitása alacsony (27-39%). UC-ben még alacsonyabbnak (0-5%) találták a PAB antitestek előfordulását (69,70). A PAB genetikai eredetére utalhat, hogy emelkedett prevalenciáját találták az IBD-s betegek első fokú rokonaiban (71). Két, napjainkban identifikált proteoglikán (CUZD1 és GP2) – célantigénként (rekombináns pankreász antigén 1 és 2: rPAG1 és rPAG2) történő – alkalmazása egy új módszert jelent az IBD szerológiai diagnózisában, amit vizsgálatainkban mi is felhasználtunk (72,73). A PAB antitesteket és a CD fenotípusát vizsgálva, egy belga tanulmányban a PAB antitestek jelenléte negatívan korrelált a szűkülettel járó CD-vel (71). Ezzel ellentétben más európai közleményekben magasabb PAB prevalenciát figyeltek meg a sztenózissal járó és penetráló fenotípus esetén (70,74,75). Kiemelésre érdemes, hogy a PAB pozitivitás jellemző volt a perianális betegségekre, valamint az extraintesztinális szövődmények (arthritis, szem- és bőrmifesztációk) fennállására is (70).

Kehelysejt ellenes antitestek (GAB)

A GAB antitestek jelenlétét 28-30 %-os előfordulással írták le felnőttkori UC-ben, és 20%-ban figyelték meg az IBD-s betegek első fokú rokonaiban (69). Néhány tanulmányban azonban ettől eltérő, ritkább előfordulásról számolnak be (70). Az eltérések magyarázata valószínűleg az eltérő kimutatási módszerből eredeztethető (ELISA illetve immunfluoreszcens módszer). A kehelysejtek mucintermelésével egyrészt viszkózus anyagként van jelen, másrészt nem specifikus védelmet nyújt a különböző mikrobák megkötésével, így szerepet játszik a normál bakteriális flóra fenntartásában. Az eddigi tanulmányok nem tudtak összefüggést kimutatni a GAB antitestek jelenléte és a klinikai tünetek, a terápia, a sebészi beavatkozás szükségessége, illetve az extraintesztinális mifesztációk között (70). Ezidáig a PAB, rPAB és GAB antitestek vizsgálatáról nem állt rendelkezésre nagyobb esetszámú, prospektív tanulmány gyermekkori IBD-ben, ugyanakkor a specificitás és szenzitivitás adatok ellentmondásosak még felnőttkori IBD-ben is.

Mannóz-kötő lektin (MBL)

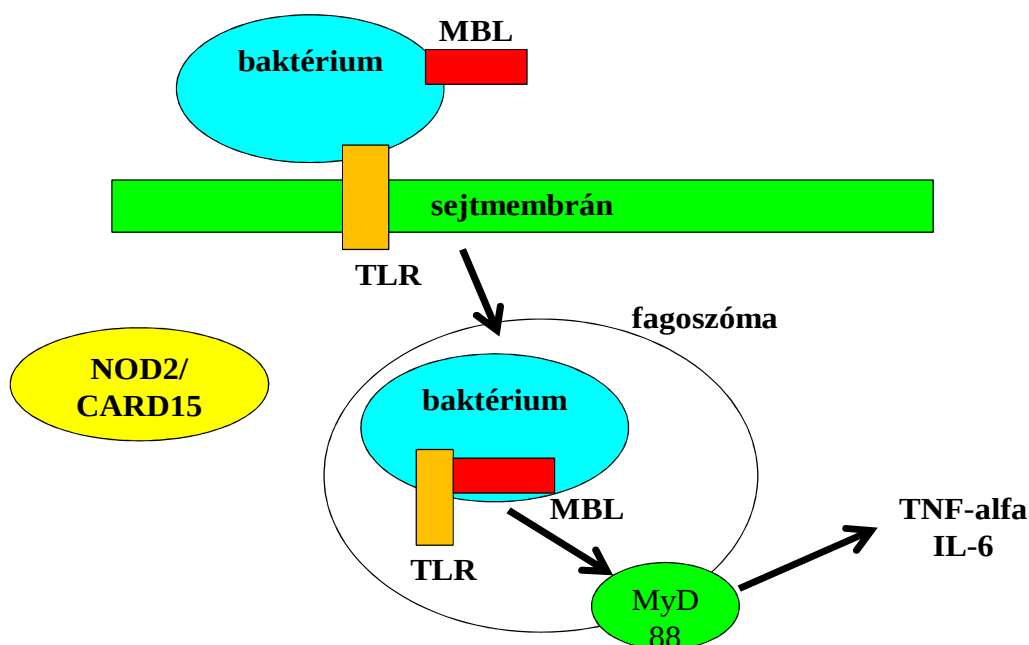
A mannóz kötő lektin (MBL) egy szolubilis szérumfehérje, a fertőző ágensekkel szemben az első védelmi vonalat jelentő veleszületett immunitás fontos eleme. Az MBL mintázatfelismerő molekula, vagyis antitesttel történő kapcsolódás nélkül, a patogénekre jellemző molekuláris mintázat felismerése révén képes a komplement rendszert aktiválni. A

különböző kórokozók sejtfelszínén specifikusan előforduló mannóz és N-acetilglükózamin cukorkomponenshez hozzákötődve (direkt opszonizáció) elősegíti azok fagocitózisát (76). Az MBL elsődlegesen a májban szintetizálódik, de az MBL2 gén extrahepatikus transzkripcióját kimutatták a vékonybélben is (77). Kiemelésre érdemes, hogy az MBL molekula az apoptotikus és nekrotikus sejtekhez kötődve elősegíti azok makrofágok általi eliminációját, valamint TLR-koreceptorként direkt intracelluláris jelátvitelben is szerepet játszik (78,79).

Az MBL2 gén 1-es exonjának három eltérő polimorfizmusa (az 52, 54, 57-es kodonban) van a legnagyobb hatással az MBL plazmaszintjére és aktivitására (80). Az MBL szérum szint 5-10000 ng/ml között individuálisan változhat, de az MBL szint minden személyben genetikailag meghatározott, gyakorlatilag stabil az élet folyamán, kivéve kisdedkorban és időskorban. Születéskor az MBL szint kb. 2/3-a a felnőttkorinak, ami a későbbiekben emelkedik, majd egy kisebb csökkenés mutatható ki idősebb korban (81).

Az átlagpopulációban az MBL deficiencia (<100 ng/ml) előfordulási aránya 8-10 %, míg az alacsony MBL szint (<500 ng/ml) prevalenciája a 40%-ot is elérheti (82). Az MBL deficiencia összefüggést mutat a fertőzésekkel szembeni fogékonysággal, illetve az infekciók súlyosságával, különösen gyermekekben és immunkomprimált betegekben (83). Ezen kívül az MBL hiány szerepet játszhat immunmediált gasztroenterológiai kórképekben, így cöliákiában és IBD-ben is (84,85).

Az MBL szerepe IBD-ben nem egyértelmű. Felnőttekben végzett vizsgálatok az MBL variánsok (mutáció az 52, 54 és 57 kodonban) ritkább előfordulását igazolták UC-s betegekben, CD-s és kontroll egyénnel összehasonlítva (86). Más tanulmány ezzel ellentétben az 54-es kodon szignifikánsan gyakoribb mutációit, és ehhez társulva alacsonyabb MBL szinteket talált UC-s betegekben a kontrollokhoz képest (87). IBD-s felnőttekben végzett vizsgálatokban nem találtak szignifikáns különbséget az MBL gén mutációi, és az MBL deficiencia előfordulásában az IBD-s betegek, illetve a kontroll személyek között (88). Gyermekkorban végzett hasonló tanulmányok nem állnak rendelkezésre, csupán egy kis esetszámú vizsgálatot publikáltak a közelmúltban. Itt szignifikánsan gyakoribb MBL2 variánsok (MBL deficienciáért felelős tényező) előfordulását találták lengyel CD-s gyermekekben, UC-s, vagy kontroll gyermekekhez viszonyítva (CD:30-, UC:26 beteg) (89).



1. ábra. Bakteriális sejtfelismerő struktúrák (TLR és MBL) segítségével megvalósuló fagocitózis.

A bakteriális mintázatot felismerő 2 legfontosabb elem a sejtfelszínen levő TLR és a citoszólban található NOD2/CARD15. Előbbi az MBL-lel fokozza a bakteriális fagocitózist és a következményes gyulladásos aktivitást. A MyD88 aktiváció eredményeként TNF-alfa és IL-6 elválasztás fokozódik.

A korábban leírtak szerint az MBL molekula szerepet játszik a veleszületett immunvédekezésben, mint mintázatfelismerő receptor beindítja a gyulladásos kaskádöt. Új ismeret, hogy az MBL a TLR-hez hasonlóan intracelluláris szignációs szerepet tölt be, így jogosan tételezhető föl, hogy szerepet játszik az IBD patomechanizmusában. Ezt a gondolatot támasztja alá egy olyan közelmúltban megjelent közlemény, mely leírja, hogy az MBL a TLR2-vel és TLR6-tal együtt a Gram-pozitív baktériumok felszínén található lipoteikolsavhoz kötődve fokozza a nukleáris faktor (NF)- κ B aktivációt, és a citokin választ. Ez a folyamat elősegíti a bakteriális fagocitózist, melynek hiányos működése a korábban leírtak szerint fontos pathomechanikai tényező lehet IBD-ben (**1. ábra**). Erre utalhat egy nagy esetszámú felnőtt IBD-s betegekben végzett kutatásunk is, ahol összefüggést mutattunk ki az MBL deficiencia és a TLR4 variáns genotípus között CD-s betegekben (88). Ezek az adatok arra

utalnak, hogy az MBL a TLR-ok jelrendszerén keresztül befolyásolni képes a veleszületett immunválaszt, így különösen gyermekekben érdemes ezt vizsgálni.

Széklet kalprotektin vizsgálata IBD-ben

A székletmarkerek használata egy non-invazív módszert jelent a diagnosztikában, amely érthető módon gyermekkorban kiemelten fontos. Az új típusú székletmarkereknek elvi alapja az, hogy a gyulladt bélmukózán fölszaporodó leukociták a székletben megjelennek (90-93). A kalprotektin gyorseszteszt diagnosztikus megbízhatóságát és összehasonlító elemzését prospektíven, nagyobb esetszámú vizsgálatban még nem elemezték.

Endoszkópos jellemzők IBD-ben

A szerológiai vizsgálatokhoz hasonlóan a képalkotó eljárásokat is csak röviden, a tézisekhez szorosan kapcsolódva ismertetem.

Az IBD diagnózisának „gold standard”-jét az endoszkópiás vizsgálat és a szövettan adja. **CD-ben** a legkorábban látható endoszkópos elváltozás az aftoid fekély, amit csecsemőkori allergiás kolitiszben is láthatunk. A súlyosabb formára jellemzőek az ép szélű, mély, hosszanti fekélyek és az utcakő-rajzolat. Fissúra, fisztula, striktúra és sztenózis is jelen lehet. Izolált ileum gyulladás a kolon érintettsége nélkül a CD-s gyermekek 10-20%-ában fordulhat elő. A szegmentális érintettség és a rektum megkíméltsége szintén CD-re utal. Gyakori az ileocökális billentyűn látható fekély. Szövettani vizsgálatnál 25-65%-ban kimutatható a granulóma, bár még ez sem csak a CD-re jellemző fenomén. **UC-ben** típusos endoszkópos kép a diffúz eritéma, a sérülékeny és granuláris mukóza, az elmosódott érhalózat, és a csökkent hausztráció. Súlyos formában az egész kolon csöszzerű, fibrotikusan átalakult. Szövettanára a kriptadestrukció és a kriptatályog jellemző (40%), de utóbbi a CD tizedében is előfordulhat.

A felső endoszkópia jelentősége IBD-ben

Értekezésem szempontjából kiemelt fontosságú a felső endoszkópia, hiszen IBD regiszterünk (HUPIR) segítségével nemzetközileg is fontos megállapításokat sikerült igazolni.

A 2005-ben publikált „Portói kritériumok” szerint a felső endoszkópiás vizsgálatot minden IBD-re gyanús gyermeknél el kell végezni, kivéve egyértelműen disztális UC-ben (94). Ez egy diagnosztikus javaslat, de ennek validálása még nem történt meg. Nem ismert, hogy tényleg fontos-e a felső endoszkópia, s ha igen, milyen mértékben? Mekkora a diagnosztikus „hozadéka” („diagnostic yield”)? Például, ha az alsó endoszkópiánál látszik a CD-re jellemző fekély, akkor már tudjuk a diagnózist; az esetleg gyomorban, duodénumban a felső endoszkópia során talált fekély már nem ad hozzá semmi információt. Kiemelésre érdemes, hogy a döntő a makroszkópos kép, vagyis a többé-kevésbé specifikus CD eltérések: afta, fekély, erózió, utcakőrajzolat jelenléte (**2. ábra**). Egy körülírt eritéma, gyulladás még nem specifikusan jellemző CD-re, így ha felső endoszkópiás vizsgálatnál ezt látjuk, még lehet UC is. Ez lehet a magyarázata annak, hogy számos UC-ben szenvedő gyermekekben és felnőttekben is jelen lehetnek a felső gasztrointesztinális traktust érintő endoszkópos és hisztológiai eltérések, de ezek nem CD specifikusak és enyhék, hasonlóan a korábban ismertetett „backwash” ileitiszhez (95-98).



2. ábra. Felső endoszkópiánál észlelt fekélyes lézió egy Crohn-beteg gyermek gyomrában.

Felnőtt CD-s betegekben 7-9% között mutattak ki makroszkópos, felső endoszkópiás vizsgálatnál látható eltéréseket (99,100). Természetesen mikroszkópos elváltozást ennél magasabb arányban, több mint 70%-ban lehet megfigyelni. Egy multicentrikus felmérésben CD-s gyermekekben a gasztroduodenális érintettség jelenléte az életkorral emelkedett, 0-5 év között 5%, 6-12 év között 10%, 13-17 év között 13% volt (101). Izolált nyelőcső érintettséget

a CD-s gyermekek 20%-ban írtak le (102). Kiemelésre érdemes, hogy ebben a retrospektív felmérésben a vizsgált populációban a kontroll CD-hez (nyelőcső érintettség nélkül) képest szignifikánsan magasabb volt az aktivitási index (PCDAI: 40 vs. 24), gyakoribb volt a penetráló típus (B3: 12% vs. 2%) és a perianális lézió (51% vs. 33%). Ezek az adatok is arra utalnak, hogy a lokalizáció hatással bír a „viselkedésre” (B3) és a prognózisra.

Összefoglalva: a felső endoszkópia akkor hasznos a gyakorlatban, amikor az alsó endoszkópiánál nem lehet eldönteni, hogy a látott kép UC, vagy a CD vastagbélre lokalizált formája-e. Ez az esetek mintegy 15-20%-a gyermekekben, és 5-15%-a felnőtt betegekben (103). Itt a definitív diagnózis felállítását segítheti a felső endoszkópia. Bár az imént hangsúlyoztam, hogy az adekvát CD makroszkópos kép a döntő (afta, fekély, erózió, utcakörrajzat), a felső endoszkópiánál kimutatott, de az alsón hiányzó granulóma (szövettan) a kivételt jelenti (104). Ebben az esetben a szövettani vizsgálat segíti a differenciáldiagnosztikában a CD kórismézését.

Az IBD terápiája

A gyermekkori IBD terápiájának részletes ismertetésére nemzetközi és hazai publikációk is rendelkezésünkre állnak, itt most csak célzottan, az értekezés eredményeivel kapcsolatos biológiai terápiás intervenciókat (influximab, adalimumab) összegzem (105-107).

Mivel az IBD pontos kiváltó oka ismeretlen, ezért kezelése sem megoldott. A kezelésben korszakos jelentőségű volt a CD patomechanizmusában kulcsszerepet betöltő TNF-alfa elleni influximab (anti-TNF-alfa) kezelés bevezetése, amely 2007 márciusa óta hazánkban is elérhető.

A TNF-alfa főként makrofágok és aktivált T-sejtek által termelt 26 kD-os citokin, mely először a sejtmembránban jelenik meg. Innen egy TNF-alfa konvertáló enzim hasítja le a 17 kD-os szolubilis formát, melyből három molekula trimert alkotva kötődik a célsejthez.

Ezt a folyamatot gátolja meg az influximab (IFX), ami egy olyan kimera IgG1 monoklonális antitest, amely 75%-ban humán és 25%-ban egér komponensű, és specifikusan kötődik a humán TNF-alfához (108). Az IFX féléletideje a szérumban 9.5 nap, ez magyarázza a hetekig tartó remissziós hatást (109). Bár korábban már közöltek kisebb esetszámú, kedvező kimenetelű munkákat az IFX adását követően CD-s gyermekekben, az első prospektív, randomizált vizsgálatot 2006-ban publikálták, REACH study néven (110).

Ebben a multicentrikus tanulmányban az IFX kezelést a konvencionális terápiára rezisztens CD gyermekekben alkalmazták. A 10. héten történt állapotfelmérés szerint a betegek 88%-a (99/112) reagált kedvezően a terápiára és 59%-a (66/112) került remisszióba. Az IFX kedvező

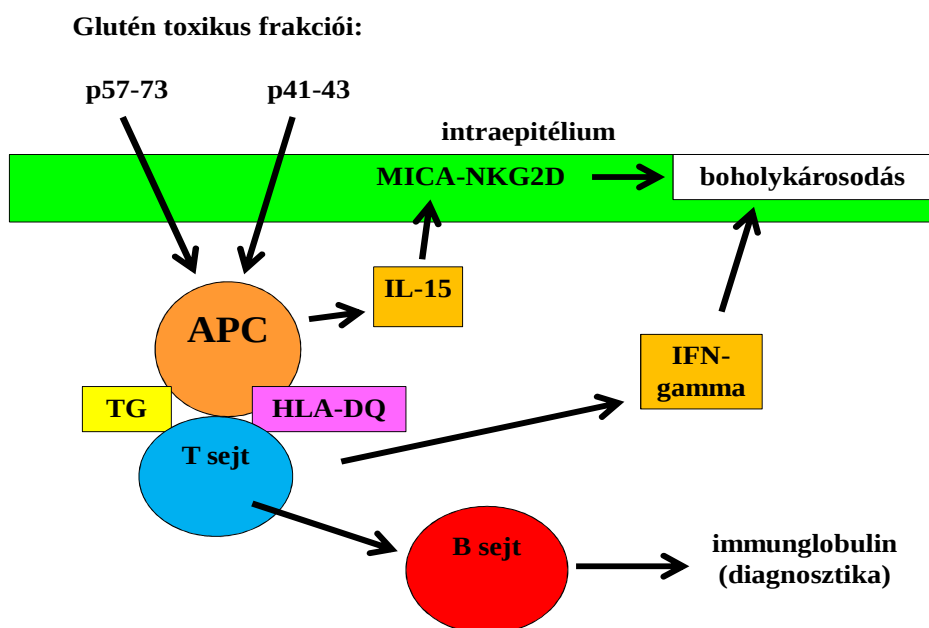
hatását fisztulás betegeknél is leírták (111). Újabban számoltak be az anti-TNF-alfa kezelés teljes mértékben humanizált kezelési formájáról (adalimumab: ADA) nagyobb esetszámú, kontrollált vizsgálat formájában (112). Ebbe az „IMAgINE” elnevezésű vizsgálatba 192 CD gyermeket vontak be, akiknek PCDAI indexe nagyobb volt, mint 30, és hagyományos kezelésük nem volt hatékony. Az indukciós kezelést követően a 4. héten 52 gyermek került remisszióba (27,7%). Ezt követően, a kéthetente adott fenntartó kezelés mellett a betegek 33,5%-a volt remisszióban a 26. héten.

Hazánkban elsőként számoltunk be egy terápiarezisztens CD beteg sikeres ADA kezelésről, valamint az IFX kezelés hatékonyságáról országos szinten.

II.2. CÖLIÁKIA

A cöliákia olyan egyedülálló autoimmun kórkép, ahol ismert a trigger faktor, az autoantigén. Ugyanis a cöliákia egy olyan immunmediált szisztémás kórkép, melyet a búzában, árpában, rozsban jelen lévő glutén és a kapcsolódó prolaminek váltanak ki genetikailag fogékony egyéneknél (113). Ha ezt nem tudnánk, akkor a gluténmentes diéta helyett a klinikai tünetek orvoslására ugyanúgy immunszuppresszív gyógyszereket adnánk, mint pl. IBD-ben.

A kórkép patomechanizmusára jellemző, hogy a transzglutamináz (szöveti, kettes típus) által modifikált glutén peptideket a HLA-DQ2 és DQ8 molekulák mutatják be genetikailag fogékony egyéneknél az antigén-prezentáló sejteken. A cöliákia patomechanizmusának vázlatát az **3. ábra** mutatja be. A betegségre specifikusan jellemző transzglutamináz kiterjedt szűrése miatt egyre gyakrabban kórismézik a cöliákiát, melynek prevalenciája 1% körül van (1:70-1:200) (114). Bár a szerológiai vizsgálattal kiszűrt egyének többségénél szükséges a diagnózis bizonyítására a felső endoszkópia (boholykárosodás igazolása a szövettanon), bizonyos konstellációnál (típusos klinikai tünetek, HLA-DQ2, -DQ8 hordozás, endomíziális antitest pozitivitás) ettől el lehet tekinteni (115).

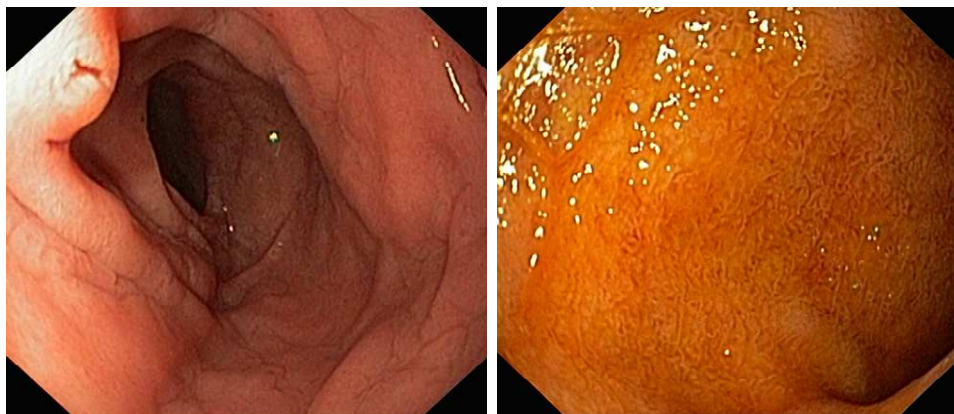


3. ábra. A cöliákia patomechanizmusának vázlata.

A béllumenben lebomló glutén bizonyos szegmensei ellenállnak a proteolízisnek. A p57-73 szegmens a szöveti transzglutamináz (TG) által negatív töltésekben gazdagodik, így már tud az antigén prezentáló sejt (APC) HLA-DQ struktúrájához kötődve T sejtet aktiválni. Ez egyrészt az interferon-gamma (IFN-gamma) termelése révén boholykárosodást indít, másrészt a B sejtek aktiválásának eredményeként a diagnosztikában kulcsfontosságú antitesteket termel. A p41-43 toxikus szegmens az APC IL-15 elválasztását fokozza, amely az intraepiteliális kompartmentben levő MICA-NKG2D interakció révén direkt citotoxikus hatású.

Korábban a cöliákia igen gyakran malabszorpciós tünetekkel, jelentős fogyással, növekedési elmaradással jelentkezett. Napjainkban is látunk ilyen eseteket, de a transzglutamináz-szűrésnél diagnosztizált betegek kb. 80%-a tünetmentes, vagy enyhe hasfájásos panaszai vannak (116). Kiemelésre érdemes, hogy a súlyos-, vagy enyhe hasi tünetek miatt a betegek jelentős része extraintesztinális panaszokkal jelentkezik, így izolált vashiány, tünetmentes transzamináz emelkedés, osteoporózis, meddőség, központi idegrendszeri érintettség (cerebelláris ataxia, szkizofrénia) és autoimmun miokarditisz háttérében igazolható a cöliákia (117, 118). Külön említést érdemel a glutén által kiváltott extraintesztinális tünet, a dermatitisz herpetiformis (Dühring-kór), amely normális intestinális morfológia mellett hólyagos elváltozást okoz a bőrön. Ebben a körképben az autoantigén nem a kettes típusú transzglutamináz, hanem a hármas típus. Ennek felfedezése egy magyar munkacsoport nevéhez fűződik (Sárdi M, Kárpáti S) (119).

A cöliákia kórismézése után a tünetek a gluténmentes étrend (GFD) bevezetését követően javulnak. A GFD egész életen át tartandó, szigorú diéta, melyet sokszor nehéz betartani, különösen pubertás korban és utána. Így annak ellenére, hogy elvileg a GFD megoldja a cöliákia terápiáját, az alternatív kezelési utak kutatása jelentős tudományos ágat jelentenek. Ezen kívül modellül szolgálnak más immunmediált kórkép patomechanizmusának tanulmányozására, hiszen itt ismert a kiváltó faktor, a glutén (120).



4. ábra. Boholyatrófiás és normális duodenális mukóza endoszkópos képe

A bal oldali képen látható cöliákiás gyermeknél végzett endoszkópián jól látszik a súlyos boholyatrófia, a redők elsimultak, mukózális barázdák, mozaicitás ábrázolódik. A jobb oldali képen egy ép duodenális mukóza látható, szép boholymintázattal.

A cöliákia makroszkópos és mikroszkópos képe

Bár a szövettani vizsgálat fontos eleme a diagnosztikának, az endoszkópos vizsgálatnál sokszor már látható a boholyatrófia (**4. ábra**). Továbbra sem eldöntött, hogy a proximális, vagy a disztális duodénumból vett biopsziás minta jelzi megbízhatóbban a boholykárosodást cöliákiában (121). Vizsgálataink egy része ennek a kérdésnek a tisztázására irányul. Mivel az összehasonlító szövettani elemzésnél a cöliákia súlyosságának megítélésére a Marsh felosztás használatos (122,123), ezt részletesen ismertetem a **4. táblázatban**.

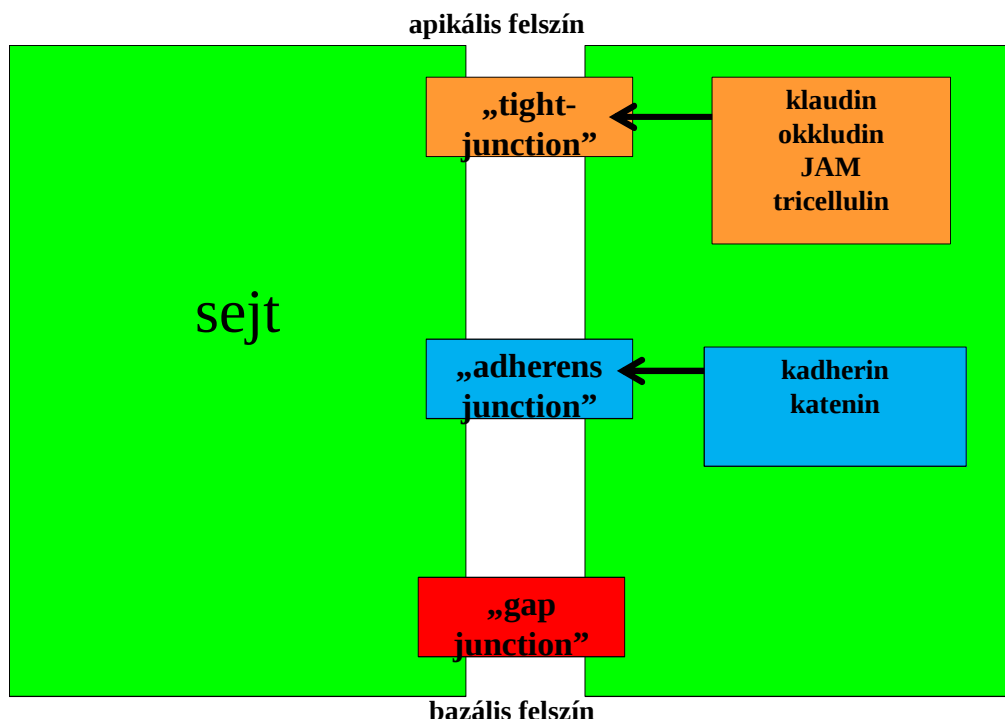
4. táblázat. Marsh felosztás a cöliákia szövettani értékeléséhez. IEL: intraepiteliális limfociták (ref. 122,123).

	IEL / 100 enterocita	Kripta hiperplázia	Boholy
0	<30	Nincs	Normális
1	>30	Nincs	Normális
2	>30	Fokozott	Normális
3a	>30	Fokozott	Enyhe atrófia
3b	>30	Fokozott	Közepes atrófia
3c	>30	Fokozott	Súlyos atrófia

Cöliákia és a mukózális barrier. Klaudinok.

Számos immunmediált gasztroenterológiai kórképben fontos patomechanikai elem az intraepiteliális kompartment sejtes összekötőelemeinek a károsodása. A mukózális barrier felbomlása bakteriális transzlokációt, idegen fehérje influxot engedélyezhet, gyulladásos citokin kaszkádot indukálhat. Cöliákiában a mukózális integritás zavart szenved, megnövekszik a bél permeabilitása, így indokoltnak éreztük, hogy olyan strukturális elemeket vizsgáljunk cöliákiás gyermekekben, amelyek kulcsszerepet töltenek be a mukózális védőgát épségének fenntartásában.

A barriert alkotó elemek komplex struktúrák, melyek legalább 50-féle fehérjéből tevődnek össze, biztosítják a sejt-sejt kapcsolatot és fenntartják a paracelluláris teret. Ezek a sejtkapcsoló struktúrák transzmembrán fehérjéből állnak, amiket aktin filamentumok horgonyoznak ki a citoskeletális elemekhez. A sejtek között, az apikális felszínhez közeli kapcsolódást „tight junction”-nak nevezik, amelynek 24 alcsoportja ismert. Ennek az összekötő struktúrának legfontosabb komponenseit az okkludinok mellett a klaudinok (CLDN) adják (**5. ábra**). Fiziológiai körülmények között a bélben a CLDN 1, 3, 4, 5 és 8 csökkenti a paracelluláris permeabilitást, a CLDN 2 töltésszelektív paracelluláris pórusokat képez (124). Mivel a daganatok patomechanizmusában fontos tényező a sejt-sejt közötti kóros kapcsolódás, nem meglepő, hogy CLDN vonatkozásában a legtöbb adat innen ered (125). Cöliákiában eddig CLDN vizsgálat nem történt.



5. ábra. Sejt-sejtközötti kapcsolóelemek vázlatos ábrázolása.

Az apikális felszínhez közel található „tight junction” alkotóelemei az okkludin, klaudin, tricellulin és a JAM (junkcionális adhézis molekulák). A bazális felszínhez közel található a „gap junction” és közöttük az „adherens junction”. Utóbbiak legfontosabb kapcsolófehérjei a kadherine és kateninek.

Hősök fehérje72 (HSP72)

Munkacsoportunk a közelmúltban vizsgálta a mukózális integritásban szerepet játszó hipoxia-indukálta faktor-1alfa (HIF-1alfa), és a szérum- és glükokortikoid-regulációs kináz1 (SGK1), valamint a hozzá kapcsolódó jelátviteli útvonalakat cöliákiás gyermekek duodenális mukózájában. Eredményeink szerint a HIF-1alfa és az SGK1 expresszió fokozott volt az újonnan diagnosztizált cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában a kontrollhoz, és a GFD-csoporthoz képest, hozzájárulva a mukózális nyálkahártya épségének visszaállításához, és az intraepiteliális apoptózis csökkentéséhez (126,127).

Ebbe a gondolatmenetbe illik bele a HSP72 vizsgálata, melyet először a hőmérséklet emelkedésére indukálódó molekuláris chaperonként írták le (128,129). Később igazolták, hogy számos más fiziológiai és patológiai stresszfaktor képes indukálni a HSP72 szintézisét. A HSP72 érdemben befolyásolhatja a különböző biológiai funkciókat, mint például a gyulladásos és apoptotikus folyamatokat. A fokozott HSP72 expresszió révén egyre több fehérje jut a véráramba, majd a molekulák hozzákötődnek az antigén prezentáló sejtekhez (APC) és proinflammatorikus citokinek, kemokinek és reaktív oxigén gyökök felszabadulását

indukálják (130). Jelenlegi kutatások szerint a HSP72 azoknak a TLR-eknek a ligandjai lehet, melyek a veleszületett immunrendszer védekező mechanizmusának kulcsfontosságú szereplői. A HSP72 immunregulációs hatását főleg azáltal fejtheti ki, hogy kötődni tud az APC felszínén található TLR2 és TLR4-hez (131). Itt jegyezném meg, hogy a HSP72 expresszió mellett a TLR2 és TLR4 mukózális megjelenését is elemeztük, cöliákiában és IBD-ben egyaránt. Kiemelésre érdemes, hogy humán kolon caco-2/bbe sejteknél kimutatták azt is, hogy ha a sejtek HSP72 expressziója alacsony, akkor korábban bekövetkezik a kaszpáz-9 aktivációja, az apoptózis egyik korai kulcsmozzanata (132). Ez arra utal, hogy a HSP72 antiapoptotikus hatása révén is protektív tényezővel bírhat (133).

II.3. ALLERGIÁS KOLITISZ (AC)

Az általunk vizsgált harmadik immunmediált betegségcsoport a csecsemőkori allergiás kolitisz (AC), amelynek gyakorisága egyre növekszik, és a cöliákiához, vagy az IBD-hez hasonlítva nagyságrenddel kevesebb információval rendelkezünk a patomechanizmusát illetően (134). Az AC mindkét fenti betegséggel valamiféle kapcsolatot mutat: a cöliákiához hasonlóan táplálék okozza a panaszt, és kezdetben a kórképet nem lehet elkülöníteni az IBD-től.

Típusos esetben az AC-s csecsemőnél a következő történettel találkozunk a gyakorlatban: egészségesnek imponáló, érett, jól fejlődő, gyarapodó súlyú, pár hónapos csecsemő, akinél fő tünet a székletben, illetve a széklet felszínén megjelenő piros vércsíkok, vérpöttyök. A széklettenyésztés rendszerint negatív, és a puha, anyatejes székletű csecsemőnél nem látunk físzúrát. Az AC kizárásos kórkép, vagyis az infekció és a físzúra kizárása után a hematokéziás csecsemőnek nagy valószínűséggel AC-je van (135). A kórképre jellemző specifikus, illetve a noninvazív diagnosztikus módszerek hiánya miatt nehéz meghatározni, hogy mennyi az AC valódi prevalenciája. A csekély számú közlemény adatai alapján valószínűsíthető, hogy a tartós hematokézia oka a csecsemő szervezetébe (leggyakrabban a szoptatáskor) jutó fehérjékre adott allergiás reakció (136,137). Az infantilis fehérje intoleranciát leggyakrabban a tehéntejfehérje váltja ki, hiszen számos esetben a csecsemő ezzel a fehérjével találkozik először élete folyamán (szoptatás, tápszer/táplálék) (138). Az esetek egy részében ez így van, de a mindennapi gyakorlatban igen gyakran találkozunk olyan szoptatott csecsemővel, akinél a hematokézia nem múlik el, annak ellenére, hogy az édesanya szigorú tejmentes diétát folytat. Sokszor a permanens hematokézia nem szűnik meg annak ellenére sem, hogy a mater multiplex eliminációs diétát tart (tojás, szója, mogyorófélék). Egy,

a közelmúltban közölt finn vizsgálat is beszámol olyan AC-s csecsemőkről, akiknél csupán 18%-ban lehetett igazolni a tejallergiát (139). Sajnos a fiatal életkor miatt sem a specifikus IgE, sem a prick-teszt nem használható az adott ételallergia igazolására (139).

Ameddig a csecsemők szépen fejlődnek, nincsen hiánytünetük, komolyabb kóros laboreltérésük, addig a kolonoszkópiás vizsgálattal lehet várakozni. A nemzetközi protokollok alapján maximum 4 hétig érdemes az édesanyának az eliminációs étrendet folytatni (140). Amennyiben például a 4 hetes anyai tejmentes étrend ellenére továbbra is fennáll a véres széklet a csecsemőnél, akkor ezt nem a tejfehérje okozza!

Egy hónapnál hosszabb ideig tartó hematokéziánál érdemes elvégezni a kolonoszkópiát, egyrészt azért, hogy igazoljuk az AC-t a jellegzetes makroszkópos jegyek alapján (limfonoduláris hiperplázia: LNH, eritémás udvarral övezett afta), másrészt, hogy kizárjuk a hematokézia egyéb, ritkább okait (polip, hemangióma, angiodiszlázia). Bár a csecsemőkori IBD rendkívül ritka, kezdetben sem a klinikai kép, sem a laboratóriumi vizsgálatok, sem a kolonoszkópiás kép nem tudja a két kórképet (AC és IBD) elkülöníteni.

Az AC-n belül a szövettani vizsgálat alapján egy súlyosabbnak vélt formát lehet elkülöníteni, amit eozinofil sejtes kolitisznek (EC) neveznek. Az AC és EC megkülönböztetésére használt, jelenleg érvényben lévő diagnosztikus kritérium csak szövettani vizsgálat során állítható fel, mely szerint AC-ről van szó amennyiben ≥ 6 eozinofil/NNL (nagy nagyítású látótér) látható, ha azonban ez a szám ≥ 20 , úgy EC-ként tartják számon a kórképet (141).

A nemzetközi szakirodalomban még nem volt olyan vizsgálat, amely prospektív módon az AC és az EC összehasonlító vizsgálatát célozta volna. Ennek megfelelően vizsgálatunk erre a problémakörre is irányulni fog.

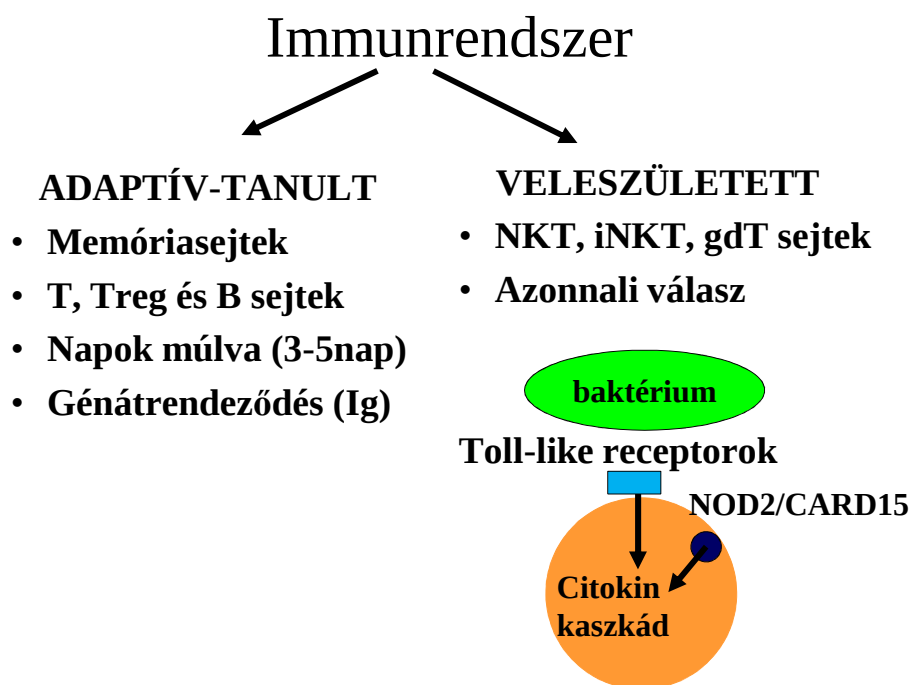
II.4. ADAPTÍV ÉS TERMÉSZETES IMMUNITÁS, TOLL-LIKE RECEPTOR (TLR) ÉS INTESZTINÁLIS ALKALIKUS FOSZFATÁZ (IAP)

A bevezetés eddigi részében a 3 immunmediált kórképet ismertettem részletesen, előrevetítve olyan szerológiai elemeket (MBL, PAB, GAB) és sejtkapcsoló struktúrákat (CLDN), amelyeket majd az adott kórképeknél vizsgálni fogunk. A bevezetés utolsó részében azokat az alap kutatásomban szereplő elemeket összegzem, amelyek a természetes immunrendszerrel kapcsolatosak, és IBD-s, cöliákiás és allergiás kolitiszes csecsemők mukózájában vagy vérében vizsgáltuk.

Természetes és adaptív immunitás

Az immunrendszert két fő csoportra lehet osztani, veleszületett (természetes, naív) immunitásra, és adaptív (tanult) immunrendszerre (142,143). Bár a felosztás mesterkélt, és számos olyan sejtes elem ismert, amely átfedést mutat a 2 csoport között, néhány sajátosság alapján jól elkülöníthető (6. ábra).

Míg az adaptív immunrendszer sejtes elemeinek bonyolult működéséről szóló ismeretek régóta gyűlnek, addig a természetes immunitás csak az elmúlt évtizedben került a kutatások fókuszába (144). Az alábbiakban a fontosabb sejtes komponenseket ismertetem, kiemelve a regulátoros T sejteket (Treg).



6. ábra. Az adaptív és a veleszületett immunrendszer fontosabb különbségei és sejtes elemei.

Treg: regulátoros sejtek, iNKT: invariáns természetes T ölüsejtek, gdT: gamma/delta T sejt. Az ábra rajzos része vázlatosan bemutatja a veleszületett immunrendszer bakteriális membránfelismerő sejt felszíni- (Toll-like receptorok) és intracelluláris (NOD2/CARD15) elemeit.

Regulátoros T sejtek (Treg)

Az adaptív immunitás egyik „karmester” szerepet betöltő elemei a Treg sejtek, annak ellenére, hogy humán perifériás vérmintában arányuk csak kb. 1-2%-a az összes leukocitáknak. A Treg képes más immunsejtek működését gátolni, és így szabályozni az

immunválaszt, az immunhomeosztázis egyik fontos fenntartója (144). Emelkedett számukat számos rosszindulatú daganatos betegségben (hasnyálmirigy-, tüdő-, mellrák) leírták, míg alacsony számuk, ill. alulműködésük több autoimmun kórképben (szklerózis multiplex, 1-es típusú diabétesz) ismert. A legfontosabb Treg funkciókat az **5. táblázat** tartalmazza.

5. táblázat. A regulátoros T sejtek feltételezett funkciói in vivo és in vitro tanulmányok alapján (ref. 145).

1.	Autoimmun folyamatok gátlása saját tolerancia kialakításával
2.	Allergiás típusú immunfolyamatok gátlása
3.	Orális tolerancia kialakítása
4.	Anyai tolerancia indukciója a magzattal szemben
5.	Kórokozó indukálta immunfolyamatok gátlása
6.	Az effektor immunműködés szabályozása az immunválaszban
7.	Kis affinitású autoreaktív limfociták gátlása
8.	Effektor immunválasz módosítása
9.	Kommenzális baktériumok védelme a fokozott immunválasz ellenében

A Treg sejteket 2 csoportra lehet osztani, CD4 és CD8 Treg sejtekre. Előbbiek kialakulásuk alapján két típusra bonthatóak, a természetes, „naturális” Treg-ekre (**nTreg**), amelyek folyamatosan expresszálnak CD25-öt és FoxP3 (forkhead box P3) transzkripciós faktort, valamint az úgynevezett indukált Treg-ekre (**iTreg**). Az nTreg-ek a CD4 pozitív sejtpopuláció átlagosan 5-10%-át alkotják, a timuszból származnak, és nagy mennyiségben expresszálnak az IL2 receptort (CD25), valamint intracellulárisan a FoxP3 transzkripciós faktort (146). Az iTreg-ek szintén a timuszból fejlődnek, de CD4, CD25 és FoxP3 pozitív sejtekké valamilyen adekvát antigén hatásra, citokin stimuláció következtében (TGFβ, IL4, IL10) válnak (147). Az nTreg és iTreg sejtek fontosabb paramétereit a **6. táblázat** tartalmazza. Kiemelésre érdemes, hogy az iTreg két csoportjában a Tr1 FoxP3 negatív (FoxP3⁻) hatása és aktivációja IL10 dependens. Ezzel ellentétben a Th3 indukált regulátoros T sejtek FoxP3 pozitívak (FoxP3⁺), és számukra a kulcscitokin a gátló hatású TGFβ.

6. táblázat. A természetes és indukált regulátoros T sejtek jellemzői (ref. 145)

CTLA4: citotoxikus T limfocita antigén4, GITR: glükokortikoid indukálta tumor nekrozis faktor receptor gén, FoxP3: forkhead box P3 transzkripció faktor, TGF: transzformáló növekedési faktor; APC: antigén prezentáló sejt, IL: interleukin.

	Természetes Treg (nTreg)	Indukált Treg (iTreg)	
	<i>nTreg</i>	<i>Tr1</i>	<i>Th3</i>
Fenotípus	CD4 ⁺ CD25 ^{int/high} , CD127 ^{low}	CD4 ⁺ CD25 ⁻	CD4 ⁺ CD25 ⁺
Egyéb markerek	CTLA4 ⁺ , GITR ⁺ , FoxP3 ⁺ , CD127 ^{low}	CD25 ^{low-variable} , CD45RB ^{low} , FoxP3 ⁻	CD25 ^{low-variable} , CD45RB ^{low} , FoxP3 ⁺
Hatásmechanizmus	kontaktus függő, granzim B-függő, TGFβ termelő	citokinek révén, IL10 termelő	TGFβ termelő
Célsejtek	APC és effektor T sejtek	effektor T sejtek	nem ismert
In vivo szerep	autoreaktív T sejtek gátlása	mukózális immunitás, gyulladásos válasz	mukózális immunitás, gyulladásos válasz
In vivo aktiváció	IL2 hatására	IL10 hatására	TGFβ hatására

A regulátoros T sejtek azonosítása és működése

Flow-citometriás vizsgálataink eredményeinek megértéséhez szükséges ismerni azokat a markereket, amelyek a Treg sejtek identifikálásra szolgálnak. Ezek alapvetően aktivációs markerek (CD25: IL-2R, CTLA-4, GITR, LAG-3, CD127: IL-7R és a FoxP3), hiszen a szuppresszor hatás létrejöttéhez szükséges a sejtek előzetes aktivációja. Közülük a FoxP3 a jelenleg leginkább elfogadott Treg marker, annak ellenére, hogy a Treg-ek kis százaléka FoxP3-ra negatív. A FoxP3 leginkább az alfa/béta T sejtekre jellemző, míg a B sejtekben, gamma/delta T sejtekben, NK sejtekben, makrofágokban és dendritikus sejtekben (DC) alig detektálható. Fontos kiemelni, hogy a klasszikus Treg markerrel, a CD25-tel nem teljes az átfedés, mert a nyirokcsomókban és a lépben kimutathatók CD25⁻FoxP3⁺ sejtek is. Másfelől a Treg sejtek nem mindegyike expresszál FoxP3-at, hasonlóan az IL10 indukálta és IL10-et is termelő Tr1 típusú Treg sejtekhez (**6. táblázat**). Ezzel összefüggésben kimutatták, hogy bizonyos tartós citokin hatásokra képesek a Treg sejtek T helper sejtekké alakulni, és ekkor a FoxP3 pozitivitásuk megszűnhet (148).

Mivel a FoxP3 intracelluláris marker, élő sejtek izolálására nem alkalmas, hiszen azonosításához a sejtet fixálni és permeabilizálni kell. Korábban a CD4⁺CD25^{high} sejtkeként azonosították a Treg-eket, ami kb. 90%-ban volt megbízható, de előnye, hogy élő sejtek detektálását is lehetővé tette. Fontos kiemelni, hogy a CD25 az IL2 receptor alfa lánc, s mivel az IL2 szükséges feltétel a T sejtek klonális expansziójához, minden aktivált T sejtre jellemző (149). Klinikai gyakorlati szempontból fontos megemlíteni, hogy egerekben a Scurfy, míg emberekben az IPEX nevű tünetegyüttest (immun diszreguláció, poliendokrinopátia, enteropátia, X-kromoszómához kapcsolt szindróma) okozza a FoxP3 mutációja (150).

A Treg-ek képesek számos immunsejt (CD4⁺, CD8⁺ limfociták, NK és NKT sejtek, B sejtek és APC-k) aktivációját, proliferációját és effektor funkcióját, így citokin termelését is szabályozni (151). Hatásmechanizmusuk részleteiben nem ismert teljesen, de az bizonyos, hogy a CTLA4 függő szuppresszió központi elem. Ezt támasztja alá, hogy a FoxP3⁺ Treg sejtek eleve nagy számban expresszálnak CTLA4-et, és a FoxP3 fokozza ennek az expresszióját. Másrészt CTLA4 gátlásával IBD és cukorbetegség indukálható állatmodellben. Érdekes módon CTLA4 hiányos állatmodellekben a FoxP3 hiányhoz hasonló betegségek indukálhatóak. Ez a CTLA4 dependens gátló hatás a Treg és az APC kölcsönhatás következtében valósul meg. Az APC felszínén (leginkább éretlen DC) levő CD80/86 komponenshez a Treg sejtek CTLA4 markerükkel kapcsolódnak és az APC citokintermelését befolyásolják. Mivel értekezésemben a Toll-like receptorok (TLR) kiemelt helyen szerepelnek, fontos megjegyezni, hogy a TLR-Treg kölcsönhatásban az APC-k aktivációja gátolja a Treg sejtek szuppresszor hatását, így képes aztán a patogén specifikus, TLR mediált immunválasz kialakulni (151).

Sejtes elemek a veleszületett és az adaptív immunitásban (Treg sejteken kívül)

A Treg sejtek hálózatban működnek a veleszületett és az adaptív immunitás sejtes elemeivel együtt. Előbbi kategóriába tartoznak az APC sejtek, vagyis a dendritikus sejtek (DC, mieloid és plazmocitoid) és a monociták (makrofágok), valamint a hízósejtek és a granulociták is. Az adaptív immunitás elemei a T (CD4, T helper és CD8, citotoxikus T) valamint a B sejtek. A két immunrendszer határán állnak, ill. inkább a veleszületett csoportba sorolhatók a természetes ölő (NK) sejtek, a természetes ölő T sejtek (NKT), valamint az olyan speciális csoportba tartozó T sejtek, mint a gamma/delta T sejtek. Utóbbi sejtek cöliákiában megemelkednek és számuk - különös módon a GFD bevezetése után sem normalizálódnak.

A Treg sejtek ezen sejtekre való hatása csak részben ismert, mi a flow-citometriás munkánk során az eddigi irodalom alapján a limfocita aktivációban felmerült célsejteket vizsgáltuk. Ezeket röviden ismertetem a következőkben.

Dendritikus sejtek (DC)

A DC sejtek a legfőbb antigén prezentáló sejtek (APC), vagyis az antigén feldolgozására és bemutatására szolgáló sejtek. Így nem meglepő, hogy a szervezet olyan pontjain helyezkednek el, ahol az antigénnel közvetlenül találkozhatnak (kültakaró, légzőrendszer, tápcsatorna). Aktiválódásuk után a nyirokcsomókba vándorolnak, ahol a T és B sejtekkel kapcsolódva az adaptív immunválasz elindításában játszanak szerepet. Azonosításukban segít, hogy erősen expresszálják a HLA-DR aktivációs markert, és számos limfocita érési markert nem lehet rajtuk kimutatni (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 és CD56).

A DC sejteket két csoportra lehet osztani, az egyik a **mieloid DC (mDC, DC1)**, a másik a **plazmocitoid DC (pDC, DC2)** (152). A mDC-k a monocitákhoz hasonlóak, IL-12 termelésre képesek, és két alcsoportjuk van: a gyakoribb és legfőbb aktivátorként működő mDC1, és a nagyon ritka, feltehetőleg sebfertőzésekben szerepet játszó mDC2. A pDC-k a plazmasejthez hasonlitosak, korábban az interferon-alfa (IFN α) termelő képességük alapján interferon produkáló sejtnek nevezték őket.

Az **mDC** sejtekre jellemző, hogy a CD11c integrin mellett TLR2-t és TLR4-et is expresszálnak. A később részletesebben is ismertetésre kerülő TLR-ek a természetes immunitás komponensei, olyan sejtmembránon átérő molekulák, melyek nem katalitikus receptor résszel, és az IL-1 receptorral egyező citoplazmatikus doménnel is rendelkeznek. Az aktivált Treg sejtek képesek ezt a TLR függő mDC aktivációt szupprimálni. Ezt a hatást egyrészt a kostimulátoros molekulák fokozott expressziójával, másrészt a gyulladásos citokinek gátlása révén érik el. Másfelől kimutatták, hogy bakteriális LPS vagy DNS hatására (TLR4 vagy TLR9 közvetítésével) Treg jelenlétében is bekövetkezik a T sejt aktiváció (153). Fontos megjegyezni, hogy a TLR-ek nem csak az APC-ken, hanem mind a hagyományos, mind a regulátoros T sejteken is megtalálhatóak. A TLR2 kapcsolat a szuppresszor hatást átmenetileg csökkenti: a TLR2 interakció múltával a Treg sejtek visszanyerik szuppresszor aktivitásukat.

A **pDC-k** az mDC-kkel szemben CD11c-t, vagy a monocitákkal szemben CD14-et nem expresszálnak, de CD123-at (IL-3R) igen. Kiemelt szerepet játszanak az immunológiai tolerancia létrejöttében, így az orális tolerancia kialakításában is, hiszen pDC nélkül a bejuttatott antigénekkal szemben nem alakul ki a T sejt mediálta tolerancia (154,155).

Újabb adatok alapján a Treg és a DC sejtek között egy bidirekcionális kapcsolat van. Egyfelől a Treg sejtek és DC-k együtt tenyésztése során a DC-k CD80 és CD86 T sejt kostimulátoros ligandjának expressziója csökken, míg az immunszuppresszív hatású B7-H3 és B7-H4 expressziója fokozódik, így a Treg-ek a DC-k érését gátolják. Treg hiányában a DC-k IL6 proinflammatorikus citokint termelnek, míg Treg-ek jelenlétében immunszuppresszív hatású IL10-et. Másfelől a pDC képes a Treg sejtek serkentésére és így a perifériás tolerancia kialakítására, hiszen ezek a sejtek képesek a $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ sejtek indukálására, és így T sejt populációk aktivációjának gátlására. Ugyanezt a hatást váltja ki a pDC-k IL10 (gátló citokin) termelése is (156).

Monociták markerei és aktiválódásuk

A monociták a perifériás vérben csak rövid ideig vannak jelen, a szövetekben dendritikus sejtekké vagy makrofágokká alakulnak át. Fő feladatuk az antigén prezentáción kívül, a citokin termelés és a fagocitózis. Ellentétben a DC-vel, a monociták felszínén korlátozott a kostimulátoros molekulák expressziója, ezért az effektor és memória T sejteket citokinek révén stimulálják. A humán monociták legnagyobb mértékben a TLR2 és TLR4-et expresszálják, előbbi peptidoglikán, míg utóbbi LPS ligandja révén indukálja a monocitákat és serkenti gyulladásos citokinjeik exkrécióját (157,158).

NK és NKT sejtek

Az NK és NKT sejtek a veleszületett immunitás elemei; mások szerint a természetes és adaptív immunitás határán helyezkednek el, mindenesetre kapcsolatot teremtenek a két rendszer között. Az NK sejtek nevüket onnan kapták, hogy képesek aktiváció nélkül is elpusztítani a sajátot jelentő MHC-I mintázattal nem rendelkező sejteket. Mindkét sejtípus azonosításában segít az NK asszociálta marker, a CD161. A nevéből adódóan, az NKT sejtre a TCR marker, a CD3 is jellemző. Utóbbi a CD161-gyel az MHC-szerű CD1d által bemutatott glikolipideket ismeri fel. A CD1d függő NKT-k egy része félig-invariáns TCR-t (invariáns alfa láncot) hordoz, amely a törzsfejlődés során érintetlen maradt, ezért ezeket a sejteket iNKT sejteknek is nevezik (159). Az NK sejtek a természetes immunrendszer effektor sejtjei, a különböző kórokozók, és a megváltozott saját sejtek eliminációjában vesznek részt (160,161).

A Treg-hez hasonlóan az NKT sejtek jelentőségét számos autoimmun és daganatos folyamatban leírták már: állatmodellben az NKT sejtek kivédtek a csontvelő transzplantáció után a „graft versus host” betegséget, továbbá az asztma patomechanizmusában is fontos

sejttípusnak tűnnek (162). Számos hasonlóság mellett azonban különböző eltérések is igazolhatók a két sejt között (163,164), ezeket a **7. táblázatban** foglaltam össze.

7. táblázat. A Treg- és NKT sejtek összehasonlító elemzése

Treg: regulátoros T sejt, NKT: természetes öló T sejt, TCR: T sejt receptor

	Treg	NKT
Autoimmun folyamatok gátlása	igen	igen
Malignus sejtek eliminációja	igen	igen
Kiemelt Bcl2 mediált antiapoptózis	nem	igen
Antigén bemutatás	MHC-II	CD1d (MHC-I-szerű)
TCR készlet	változatos	konzervatív
Antigén felismerő képesség	diverziós, kiterjed	glikolipidre korlátozódik

Thelper (Th) és Tcitotoxikus limfociták (Tc)

Az effektor T sejtek részletes ismertetése, citokintermelése számos publikációban megtalálható (165,166). Itt csak a flow-citometriás vizsgálatunkkal kapcsolatos fontosabb jegyeket ismertetem.

Az effektor T sejtek két típusa a CD4 és CD8 expresszió alapján a T helper, (Th) illetve a citotoxikus T (Tc) sejt (167). A Th sejtek prekursor sejtjei a naív T sejtek (Th0), amelyek addig illethetők ezzel a névvel, amíg antigénnel nem találkoznak. A két sejtcsoport a CD45 segítségével különíthető el (naív T: CD45RA, memória T: CD45R0). Utóbbiból hiányzik 3 exon (RA, RB és RC), így a citoplazmatikus doménje egy tirozin kináz defoszforilálásával annak aktiválódását okozza. A naív T sejtek megfelelő stimulusra Th1 vagy Th2 irányba differenciálódhatnak. Ezeket a sejteket nem a CD markerük, hanem az általuk termelt citokinek alapján lehet elkülöníteni (168).

Toll-like receptorok (TLR)

Bár a bevezetés korábbi részeiben érintettem több helyen a TLR családot, mivel a TLR expressziót mindhárom betegségcsoportban vizsgáltuk, itt külön is összegzem a fontosabb tudnivalókat.

A Toll-like receptorok (TLR) a természetes immunválaszban töltnek be fontos szerepet, képviselőik a transzmembrán receptorcsaládba tartoznak, alapvető fontosságúak a mikróbák felismerésében és az antimikrobiális gének indukciójában (169). A TLR-eket először 1996-ban írták le, a *Drosophila* Toll-receptoráról kapták a nevüket. Ebben az egyedben a Toll-receptor a *Drosophila* embrió dorzoventrális polarizációjáért felelős, továbbá a gombafertőzés elleni védelemben is fontos szerepet tölt be. Egy évvel később azonosították a TLR emlősökben megtalálható formáját, majd a TLR család tagjainak száma gyorsan szaporodott: jelenleg 13 tagja ismert (TLR1-TLR13), melyeket kapcsolódó ligandjukkal együtt a **8. táblázatban** ismertetnek.

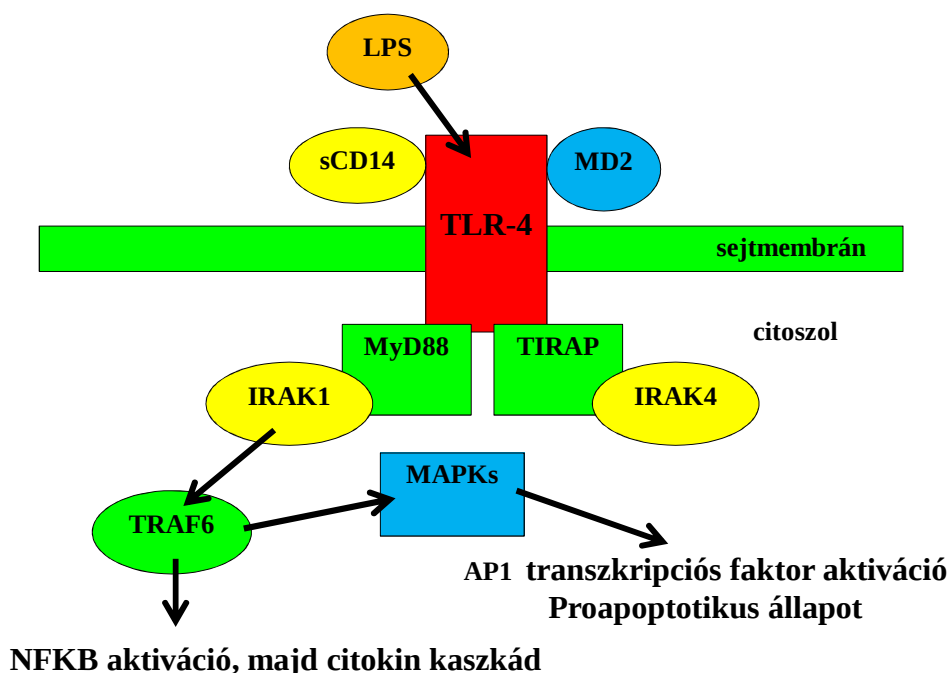
Az emlősökben megtalálható TLR-ek I-es típusú transzmembrán receptorok, három fő részből állnak: egy extracelluláris, leucinban gazdag ismétlődésekből álló doménből, amely a ligandumok megkötéséért felelős, egy transzmembrán régióból, valamint egy intracelluláris, konzervatív, ún. Toll/IL-1R (TIR) doménből, amely jelátviteli folyamatok indukciójához szükséges.

8. táblázat. A Toll-like receptorok (TLR) és legfontosabb kapcsolódó ligandjuk.

Vastag betűvel jelölve az általunk vizsgált TLR receptorok.

Toll-like receptorok (TLR)	Kapcsolódó ligand
TLR1	lipoproteinek
TLR2	lipoproteinek
TLR3	dupla láncú RNS
TLR4	lipopoliszacharid (LPS)
TLR5	flagellin
TLR6	lipoproteinek
TLR7	szimpla láncú RNS
TLR8	szimpla láncú RNS
TLR9	CpG DNS szegmens
TLR10	nem ismert (PamCSK ?)
TLR11	uropatogén ligand
TLR12	nem ismert
TLR13	nem ismert

A TLR-k ún. alarmírozó szignálokat ismernek fel, amelyek mikrobiális, vagy sérülés-asszociált molekuláris mintázatok. Az összes TLR (kivéve a TLR3), a MyD88 adapter proteinen keresztül aktiválja a jelátviteli utakat, bár ismertek MyD88-független útvonalak is. A MyD88-on keresztüli kapcsolódás számos jelátviteli utat generálhat, így az IRAK, TAK1, TRAF6 utat, különböző transzkripciós faktorokat aktiválva (NF κ B, CREB, STAT, AP1, Elk-1). Ezeknek a folyamatoknak a döntő többsége arra irányul, hogy a gazdaszervezet homeosztázisát fenntartsák a környezeti támadásokkal szemben (170). Az aktivációs utak sematikus irányait a **7. ábra** mutatja be.



7. ábra. A TLR4 aktiváció és a következményes hatások vázlatos ábrája.

A TLR4 komplexhez (sCD14 és MD2) kötődő lipopoliszacharid (LPS) két adaptormolekulát vonz a membránhoz (MyD88: mieloid differenciálódási 88 fehérje és TIRAP: TIR domén tartalmú adaptor fehérje). A MyD88 számos közbülső lépés után az IRAK1 (IL-1-receptorhoz kapcsolt kináz) közvetítésével aktiválja a TRAF6-ot (TNF receptor-asszociált faktor 6), amely fehérje foszforiláció, és következményes degradáció után lehetővé teszi az NF κ B (nukleáris faktor kappa béta) nukleáris transzlokációját. Ennek proinflammációs citokintermelés lesz a következménye. Másfelől a TRAF6 felől kiinduló MAPKs (mitogén-aktivált protein kináz) aktiváció az AP1 (aktivátor protein 1) transzkripciós faktort aktiválja a nukleuszban, amely proapoptotikus állapothoz vezet.

Mivel az IBD patomechanizmusának egyik fontos eleme a mukózális immunrendszernek a kommenzális flórára adott hiperergiás reakciója, logikus föltevés, hogy ebben a folyamatban a TLR fontos szerepet játszhat. Korábban ilyen irányú vizsgálatot még nem végeztek. A 13 tagú

TLR receptorcsaládból leginkább a TLR2 és TLR4 szerepe valószínűsíthető, hiszen a normális bélnyálkahártya kis koncentrációban eleve expresszálja a TLR2 és TLR4 receptorokat (171). Ismert továbbá, hogy aktív IBD-ben a TLR4 gén variáns alléljai előmozdítják az LPS receptor működészavarát (172). További additív tényező, hogy az IBD patogenézisében szereplő kulcsitokinek (TNF α és IFN γ) a TLR4 expresszió növekedését okozzák (173,174).

Intesztinális alkalikus foszfatáz (iAP)

Az alkalikus foszfatáz (ALP) egy gyakran vizsgált enzim a mindennapi laboratóriumi gyakorlatban. Olyan glikoprotein, amely oldékony homodimerként kering a vérben, majd egy glikozil-foszfatidil-inozitol nyúlvánnyal rögzül a sejtmembrán külső részéhez. Így alakul ki a sejtmembránhoz horgonyzott forma, melyet egy specifikus foszfolipáz D szabályoz. Az ALP molekula számos szövetben előfordul (bél, máj, csont, vese, placenta és placenta-szerű ALP), melyek szerkezetben, molekulaméretben és izoelektromos pontban különböznek egymástól (175).

Az ALP gén a 1p36-p84 lókuszon kódolja a humán nem-szövetspecifikus ALP-t, amiből a csont, máj és vese izoformák erednek. Különbözőségüket a poszttranszlációsan hozzáadott glikánmolekulák adják. Az ALPI gén a 2q34-q37 lókuszon az intesztinális ALP (iAP) izoenzimet kódolja. Az iAP glikozilációja az endoplazmás retikulumban zajlik, majd a Golgi-készüléken keresztül a sejtmembránba kerül. Ennek mukózális expresszióját fogjuk vizsgálni IBD-s és cöliákiás gyermekekben (176).

Az iAP enzim a bélbolyhok mikrovillus felszínéhez kihorgonyzott fehérje, amely az enterocitán belül-, és bazolaterálisan is megjelenhet (177-179). A vastagbél iAP aktivitásának felmérésére ezidáig nem történtek vizsgálatok.

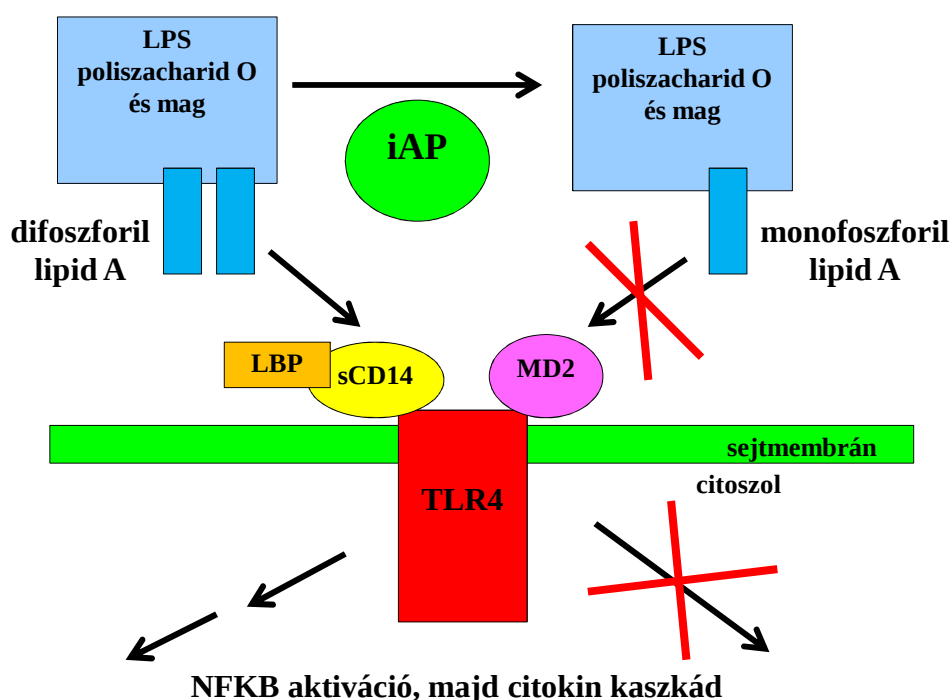
A lipopoliszacharid (LPS) detoxifikálása az iAP által

Kutatásunk szempontjából az iAP legfontosabb funkciója, hogy segít fenntartani a mukózális integritást, így a bél fontos mukózális védelmi tényezője. Ugyanis az iAP detoxifikálni képes a Gram-negatív baktériumok külső membránjának alkotórészét, az LPS-t, amely a TLR4 ligandja. Az LPS a baktériumok külső membránjának legfőbb alkotóeleme, és különböző fertőzések, sokkos állapotok elindítója.

A korábban részletesen leírtak szerint a TLR4 központi szerepet játszik a baktériumok felismerésében és a megfelelő immunválaszok kiváltásában. Expressziója nagymértékben szabályozott a kontrollálhatatlan gyulladásos reakciók kivédése miatt. Fiziológias

körülmények között a szervezet nem válaszol az intesztinális lumenben nagy koncentrációban megjelenő LPS-re, amelynek hátterében az itt levő iAP aktivitás állhat. Ugyanis az iAP az LPS-t hidrolízis révén detoxifikálja, így a TLR-függő gyulladásos válaszok nem aktiválódnak. További védelmi tényező, hogy TLR4 expressziója térben is szabályozott, ugyanis az enterociták apikális felszínén csak kismértékben detektálható, így csökkenti a gyulladásos kaszkádot elindító TLR4-LPS interakciót (180,181).

Az iAP hatásának mechanizmusát a **8. ábra** mutatja és magyarázza.



8. ábra. Az intesztinális alkalikus foszfatáz (iAP) lipopoliszacharidot (LPS) detoxifikáló folyamata az ábra bal oldalán (bal oldal: iAP jelenlétében, jobb oldal: iAP nélkül, a pirossal áthúzott nyilak az aktiváció gátlását jelölik).

Az LPS egy „lipid A” részhez kapcsolódó poliszacharid magból, és O-specifikus poliszacharid régióból áll. A „lipid A” régió felelős az LPS toxikus hatásáért. Az iAP defoszforilálja a difoszforilált „lipid A” részt, így abból egy nem toxikus, monofoszforilált LPS-származék keletkezik. Ezáltal az LPS nem tudja beindítani a TLR4-MyD88-függő jelátviteli utat (TLR: Toll-like receptor, LBP: LPS kötő fehérje, NFκB: nukleáris kappaB).

A TLR4 komplexen kívül a HSP 70 és 90, valamint a kemokin receptor 4 és a növekedési differenciálódási faktor 5 is képes az LPS-t megkötni. Másfelől az LPS TNF-α szekréció indukálására is képes, így beindíthatja az adaptív immunválaszt is (182).

IAP fehérje meghatározás eddig még sem cöliákiában sem IBD-ben nem történt, annak ellenére, hogy az iAP bélgyulladásban betöltött jótékony szerepét számos állatmodellben

igazolták. Terápiás lehetőségre utal, hogy iAP tablettá adása csökkentette a dextrán-szódium szulfát (DSS)-indukálta kolitiszes egérmódelben a bélgyulladást. Eddig összesen egy-egy tanulmány jelent meg az iAP-pal kapcsolatban, amely csak az enzim aktivitását vizsgálta IBD-ben (183) és cöliákiában (184).

III. CÉLKITŰZÉSEK

III.1. GYULLADÁSOS BÉLBETEGSÉG (IBD)

Elsődleges célom volt, hogy megszervezzek és elindítsak egy olyan **prospektív, országos lefedettséget mutató IBD regisztert**, amely valamennyi, hazánkban kórismézett gyermeket rögzít és nyomon követ. Ebben az epidemiológiai és antropometriai adatokon kívül, az aktivitási indexet, a laboratóriumi- és diagnosztikai elemeket, valamint a terápiás intervenciót is rögzítjük. Ezek az országos gyermek IBD regiszter által nyert eredmények adják téziseimnek egyik fontos tudományos forrását. Kiemelt jelentőségű, hogy minden betegre visszakérdezzünk, hogy helyes volt-e a diagnózis, továbbá minden beteget hosszútávon nyomonkövetünk: a diagnózis után 3 hónappal, majd évente rögzítjük az antropometriai-növekedési értékeket, az aktivitást indexet és a terápiát. Ilyen országos, prospektív, részletes regiszter nemzetközi szinten sem ismeretes.

Célom volt továbbá a felső endoszkópiás vizsgálat valós jelentőségének meghatározása a Crohn-betegség diagnosztikájában.

- A felső endoszkópiánál látott típusos makroszkópos eltérések (afta, fekély, erózió, utcakörnyezet) diagnosztikus hozamának megítélése („diagnostic yield”).
- Az endoszkópos és hisztológiai léziók, valamint ezek összefüggésének vizsgálata a betegség aktivitással, és a laboratóriumi paraméterekkel a felső endoszkópiával vizsgált IBD-s betegekben.
- A betegség lokalizáció, a betegség aktivitás és a laboratóriumi paraméterek vizsgálata a felső endoszkópiával vizsgált CD-s betegekben.

Ezen kívül országos szinten a terápiarezisztens CD-s gyermekek kezelésében az **anti-TNFalfa kezelés (infliximab: IFX)** sajátosságainak felmérése.

Továbbá a gyermekkori IBD diagnosztikájában szerepet játszható, új típusú **szerológiai markerek (MBL, PAB, GAB)** elemzése, fenotípussal, aktivitási index-szel és extraintesztinalis tünetekkel történő korrelációs vizsgálata.

- Az MBL szintek, és az MBL deficiencia előfordulásának meghatározása, valamint ezek összefüggésének vizsgálata a szerológiai markerekkel IBD-s betegekben.
- Az MBL szintek, a klinikai fenotípus, a laboratóriumi értékek és az aktuális aktivitási index közötti összefüggés vizsgálata IBD-ben.

- A PAB, rPAB és GAB antitestek diagnosztikus pontosságának, és a szerotípus-fenotípus összefüggésnek vizsgálata.
- NOD2/CARD15 genotípus, a szérum autoantitestek, és a fenotípus összefüggésének összehasonlító elemzése CD-ben.

A gyulladásos bélbetegség patomechanizmusának tanulmányozására IBD-s gyermekek vastagbél-mukózájában a természetes immunitásban szerepet játszó Toll-like receptorok (TLR), és az intesztinális ALP (iAP) elemzése:

1/a. A TLR2, TLR3 és TLR4 expressziójának vizsgálata IBD-s gyermekek kolon nyálkahártyájában

- Változik-e a TLR2, TLR3 és TLR4 mRNS expresszió, valamint a fehérjeszint az IBD-s gyermekek kolon nyálkahártyájában, a nem IBD-s kontrollokhoz képest?
- Van-e különbség a frissen diagnosztizált IBD-s gyermekek, valamint a kezelt, relapszusban lévő IBD-s gyermekek kolon nyálkahártyájának TLR2, TLR3 és TLR4 mRNS expressziójában és fehérjeszintjeiben?
- Kimutatható-e különbség a frissen diagnosztizált IBD-s gyermekek, valamint a kezelt, relapszusban lévő IBD-s gyermekek kolon nyálkahártyájának gyulladásban lévő, illetve gyulladásban nem lévő szakaszán a TLR2, TLR3 és TLR4 mRNS expresszióban, valamint fehérjeszintjeiben?
- Van-e különbség a CD-s, illetve UC-s gyermekek kolon nyálkahártyájának TLR2, TLR3 és TLR4 mRNS expressziójában, valamint fehérjeszintjeiben?

1/b. Az iAP expressziójának, és az iAP-TLR4 lokalizációjának vizsgálata gyulladásos bélbeteg (IBD-s) gyermekek kolon nyálkahártyájában

- Kimutatható-e különbség az iAP mRNS expressziójában, valamint fehérjeszintjeiben CD-s és UC-s gyermekek gyulladt vastagbél nyálkahártyájában, nem IBD-s kontrollhoz képest?
- Megfigyelhető-e különbség az iAP mRNS expressziójában és fehérjeszintjében CD-s gyermekek gyulladt, és nem-gyulladt kolon nyálkahártyája között?
- Különbözik-e az iAP, és a TLR4 lokalizációjában a CD-s és UC-s gyermekek mukózája, a kontroll csoporthoz képest?

Immunfenotípus eltérések (**adaptív és veleszületett immunitás**) vizsgálata újonnan diagnosztizált, még nem kezelt CD-s gyermekek perifériás vérében, valamint konvencionális terápiában és biológiai terápiában (IFX) részesülő betegeken.

III.2. CÖLIÁKIA

Kutatásunk fontos elemét képezte a **klaudinok (CLDN)** közül a 2, 3 és 4 összehasonlító elemzése a duodenum proximális és disztális régiójában. Immunhisztológiai módszerekkel kívántuk eldönteni, hogy a proximális, vagy a disztális duodenum jelzi megbízhatóbban a cöliákiasokban a boholatrófiát.

Ezen kívül **iAP** és **HSP72** elemzést terveztünk újonnan kórismézett, majd diétázó cöliákiasok duodenumában mRNS- és fehérjeszinten. Célunk volt még a fehérjék intramukózális lokalizációjának meghatározása is:

- Hogyan változik az iAP és a HSP72 mRNS expressziója és fehérjeszintje cöliákias gyermekek duodenum nyálkahártyájában nem cöliákias kontrollokhoz viszonyítva?
- Van-e különbség az újonnan diagnosztizált és a gluténmentes diétát tartó cöliákias gyermekek duodenumának iAP és HSP72 expressziójában mRNS és fehérjeszinten?
- Megfigyelhető-e különbség az iAP/HSP72 és a TLR4 lokalizációjában újonnan diagnosztizált, valamint gluténmentes diétát tartó cöliákias gyermekek duodenumában, a kontroll csoporthoz képest?

Immunfenotípus eltéréseket (**adaptív és veleszületett immunitás**) is szeretnénk volna meghatározni újonnan diagnosztizált, még nem kezelt cöliákias gyermekek perifériás vérében, majd ezek változását gluténmentes diétát tartó betegeken. Továbbá a cöliakiában megjelenő **fekély** egyik patomechanikai faktorának (plazminogénhiány) elemzését is.

III.3. ALLERGIÁS KOLITISZ (AC)

Célkitűzések közé tartozott az AC-re jellemző laboratóriumi eltérések elemzése, a kolonoszkópiánál látott makroszkópos- és mikroszkópos kép vizsgálata. Ezen kívül immunfenotípus eltérések (**adaptív és veleszületett immunitás**) vizsgálata hematokéziás AC-s csecsemők perifériás vérében, majd ugyanott, a panaszok megszűnése után.

IV. BETEGCSOPORTOK ÉS MÓDSZEREK

IV.1. GYULLADÁSOS BÉLBETEGSÉG (IBD)

IV.1.1. IBD regiszter (HUPIR: Hungarian Pediatric IBD Registry)

2007. január elsejétől hazánkban megszerveztem és elindítottam egy prospektív gyermek IBD regisztert, melyben a mai napig 27 intézmény (klinika, kórház, gasztroenterológiai rendelő) vesz részt, biztosítva az országos lefedettséget. A résztvevő intézményekben minden újonnan kórismézett IBD-ben szenvedő gyermekről egy 76 paraméterre kiterjedő adatlapot kellett kitölteni. Az adatlap egyrészt epidemiológiai- és antropometriai adatokra, családi anamnézisre, vezető panaszokra, extraintesztinális tünetekre, másrészt a képalkotó diagnosztikára (ultrahang, passzázsvizsgálat, CT, MRI), harmadrészt részletes endoszkópos és szövettani eredményekre kérdez rá. Ezen kívül rögzítésre kerültek (2008. márciusától) alapvető laboratóriumi eredmények és aktivitási indexek (PCDAI, PUCAI), valamint a kezdeti terápia is (**3. melléklet a Függelékben**). Az IBD diagnosztikája a bevezetésben leírt módon, a 2005-ben publikált portói kritériumok alapján történt (94). A lokalizációt a montreáli kritériumok alapján határoztuk meg, amennyiben biztonsággal megtörténtek azok a diagnosztikai vizsgálatok (felső endoszkópia, terminalis ileum intubációja), amelyek ezt lehetővé teszik.

A 27 intézményen kívül személyesen, telefonon és e-mail segítségével felkerestünk olyan felnőtt gasztroenterológusokat is, akik esetleg 18 év alatti adolescens gyermekeket kórismezhetnének ezzel a diagnózissal. Az IBD **extraintesztinális manifesztációjának** meghatározásához 148 gyermeket vontunk be. A nyomonkövetésre használt adatlapot a **4. melléklet a Függelékben** tartalmazza.

Az incidencia számításához szükséges demográfiai adatokat a Központi Statisztikai Hivataltól kaptuk.

IV.1.2. A felső endoszkópia diagnosztikus értékének vizsgálata

A fent részletezett HUPIR adatlapjainak segítségével a felső endoszkópiás vizsgálatban 237 IBD-s gyermeket vizsgáltunk prospektív módon. Ugyanis a 2007-2009 közötti időszakban a HUPIR adatbázisa alapján felső endoszkópiát 237 (56%) betegnél [fiú/lány arány:125/112, átlagos életkor: 13,2 év (tartomány: 1,2-18 év)] végeztek, 176 gyermeknél CD, 48 gyermeknél UC, és 13 gyermeknél IBD-U volt a diagnózis.

A betegeknel rögzítésre került az endoszkópos (normális, abnormális) és a hisztológiai (normális, abnormális, granuloma) kép, illetve a képalkotó vizsgálatoknál (normális, abnormális) kimutatott eltérés a felső gasztrointesztinális traktus minden régiójában (nyelőcső, gyomor, duodenum). Az adatlapon megkérdeztük a regisztráló orvosokat, hogy segített-e a felső endoszkópia a diagnózis felállításában. A kérdőíven az észlelt endoszkópos vagy hisztológiai eltérés pontos leírására is lehetőség volt. A válaszok közül CD-ben diagnosztikus segítségnek fogadtuk el az afta, erózió, ulcus, utcakőrajzat endoszkópos (makroszkópos) képet, és a granuloma hisztológiai diagnózist. Kiemelésre érdemes, hogy amennyiben a makroszkópos eltérések közül az eritémát (fokális vagy diffúz), a hisztológiai elváltozások közül a krónikus gyulladást, fokális antrum gastritist és boholyatrófiát jelölték meg diagnosztikus segítségként, ezt az értékelésnél nem vettük figyelembe, mivel ezeket nem tekintettük CD-re specifikus elváltozásoknak. A felső endoszkópia diagnosztikus értékét a felső gasztrointesztinális traktusban észlelt releváns makroszkópos eltérések (erózió, fekély, afta vagy utcakőrajzat), valamint a granuloma jelenléte alapján értékeltük azon vastagbél lokalizációjú CD-s betegekben, akiknél nem állt fenn terminális ileum érintettség és nem észleltünk a vastagbélben CD-re specifikus elváltozást. Értelemszerűen a kolon granulomás betegeket ebből a szempontból nem vettük figyelembe, mivel ezekben az esetekben a felső endoszkópia nem nyújtott diagnosztikus segítséget, hiszen ekkor a diagnózis a kolon granuloma alapján CD volt.

IV.1.3. Infliximab terápiájának prospektív, országos hatásvizsgálata

A terápiarezisztens CD-s gyermekek kezelésében 2007 márciusa óta hazánkban is elérhető az **anti-TNFalfa kezelés (IFX: infliximab)**. Egy prospektív vizsgálat keretében az IFX terápia sajátosságait is felmértük országos szinten, a kezdetektől (2007. március) a 2008. december 31-ig terjedő időszakban. Ebben az időintervallumban országosan 23 súlyos, a hagyományos terápiára rezisztens CD gyermek részesült IFX terápiában. A betegek az indukciós kezelés során protokoll szerint 5mg/ttkg infliximab infúziót kaptak a 0., a 2. és a 6. héten. Az IFX terápia kezdetekor (0. hét) és a kezelés 6. hetében rögzítettük a betegek PCDAI értékét. A nemzetközi kritériumok értelmében terápiás válasznak a PCDAI-nak a 0. hétről a 6. hétre történő legalább 15 pontos csökkenését tekintettük (110). A CD remissziójának a PCDAI 10, illetve ezen érték alá történő csökkenését tartottuk. A kezelés hatékonyságán kívül rögzítettük a terápia kapcsán fellépő szövődményeket is. Akutnak tekintettük a 24 órán belüli, későinek pedig az ezen túl jelentkező szövődményt.

IV.1.4. A mannóz-kötő lektin (MBL) meghatározása

A vizsgálatba 107 gyermekkorai kezdetű CD-s [fiú/lány arány:64/43, átlagos életkor: 14,1 év (tartomány: 5,3-20 év)] és 52 UC-s [fiú/lány arány:22/30, átlagos életkor: 14,0 év (tartomány: 6-19,7 év)] gyermeket vontunk be. A kontroll csoport 95 gyermekből állt, átlagos életkorban és nemi megoszlásban a fenti csoportoktól nem különbözött.

Az MBL meghatározáshoz ELISA technikát használtunk, melynek részletes leírására hivatkozok (185). A mikrotiter lemezeket (Greiner Bio-One, Mosonmagyaróvár) egy éjszakára 4 °C-on 1 µg/ml monoklonális egér antihuman MBL antitesttel (klón131-1, Mab 131-1; BioPorto Diagnostics A/S, Gentofte, Dánia) fedték Tris-pufferelt fiziológiás sóoldatban (TBS). A szérumokat 3 hígításban (1:5, 1:25, 1:125) 90 percig 37 °C-on nedves kamrában inkubálták az MBL standard sorozat hígításokkal együtt (BioPorto Diagnostics A/S). A standard fiola 1000 abszorbancia egység (AU) MBL-t tartalmazott, mely a gyári leírás szerint 3200 ng/ml oligomerizált MBL-nek felelt meg. Háromszori átmosás után, a biotinált (kovalens kötéssel kapcsolódó) Mab131-1-t 1:6000 arányban hígították TBS/0,05% Tween és 0,25 µM EDTA (TBS-T-EDTA) oldattal 7,5 pH-n, majd 90 percre 37°C-on nedves kamrába került és a következő mosási lépés következett. Az avidin-biotinált peroxidáz komplexet (Vectastain, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) 1:1000 arányban hígították és 30 percre nedves kamrába került. A színreakció tetrametil-benzidin dihidrochloriddal (TMB, Sigma Aldrich, Schnelldorf, Németország) fejlődött ki, 2 M kénsav (H₂SO₄) hozzáadásával állították le és 450 nm-en Infinite 200 microtiter lemez olvasót használva olvasták le (Tecan, Austria GmbH, Salzburg, Austria). Az eredmények kiszámítása Magellan software program alkalmazásával a Marquardt görbe illeszkedését nézve történt. A detektálás alsó határa 4,86 ng/ml volt. Az MBL meghatározás a Debreceni Egyetem Klinikai Kutató Centrumában történt vak módon: a betegek diagnózisát, vagy más klinikai paraméterét nem ismerték.

IV.1.5. PAB, rPAB, GAB, ASCA és pANCA antitestek meghatározása

A vizsgálatba 103 gyermekkorai kezdetű CD-s [fiú/lány arány:63/40, átlagos életkor:13,9 év (tartomány:5,3-19,6 év)] és 49 UC-s [fiú/lány arány:22/27, átlagos életkor:12,5 év (tartomány:6-19,7 év)] gyermeket vontunk be. A vizsgálatba bevont IBD-s betegek fontosabb klinikai adatait a **9. táblázat** tartalmazza.

A kontroll csoport 104, korban és nemi megoszlásban a betegektől nem különböző gyermekből állt. A kontrollokat (MBL kontrollok is) igen enyhe gasztrointesztinalis

panaszok, hasfájás és étvágytalanság miatt vizsgáltuk. Valamennyi beteg panasza funkcionális volt, a laboratóriumi vizsgálatok nem mutattak eltérést, beleértve a CRP és vérkép vizsgálatot, valamint a transzglutamináz elleni, és az endomízium elleni antitest meghatározást is. Továbbá a controlok családi anamnézisében nem szerepelt autoimmun betegség (pl. cöliákia), vagy gyulladásos bélbetegség (IBD).

9. táblázat. A szerológiai vizsgálatba bevont IBD-s betegek fontosabb klinikai adatai.

CD: Crohn betegség, UC: kolitisz ulceróza, Felső GI: felső gasztrointesztinális

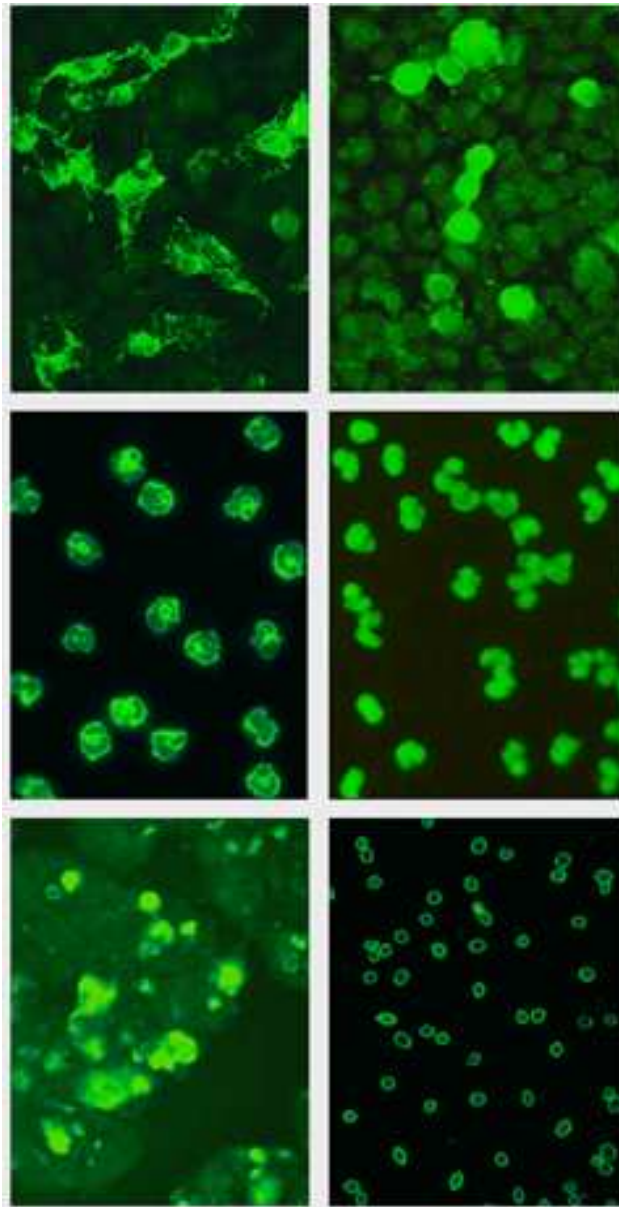
	CD n=103	UC n=49
Fiú/lány	63/40 (61/39%)	22/27 (45/55%)
Életkor (év)	13,9 (tartomány: 5,3-19,6)	12 (tartomány: 6-19,7)
Betegségtartam (év)	1,5 (tartomány: 0,5-11)	2,3 (tartomány: 0,5-13,4)
Lokalizáció		
	Ileum (L1): 17/103 (16,5%)	Proktitisz (E1): 4/49 (7,1%)
	Kolon (L2): 30/103 (29,1%)	Bal oldali kolitisz (E2): 15/49 (35,8%)
	Ileokolon (L3): 56/103 (54,4%)	Extenzív kolitisz (E3): 33/49 (57,1%)
	Felső GI (+L4): 24/103 (23,3%)	
Viselkedés ("behaviour")		
	Gyulladásos (B1): 63/103 (61,2%)	
	Sztenotizáló (B2): 18/103 (17,5%)	
	Penetráló (B3): 27/103 (26,2%)	
Perianális betegség	21/103 (20,4%)	

A szerológiai vizsgálatba bevont IBD-s betegek adatainak ismérvei megegyeztek a IV/1.1. paragrafusban leírtakkal (HUPIR adatlap). A tanulmányba történő bevonás feltétele volt, hogy a diagnózis felállításától legalább 1 év elteltjen. A vérminták levétele prospektíven történt az MBL, valamint a PAB, rPAB, GAB, ASCA és pANCA antitestek, a vérkép és a CRP meghatározására. Vértételkor a betegeknél részletes fizikális vizsgálat, és betegség aktivitási

index (PCDAI, PUCAI) meghatározás is történt. A vérmintákat kódszámmal láttuk el, majd a szérum szeparációját követően -80 °C-on tároltuk a további analízisig.

A PAB, rPAB, GAB, ASCA és pANCA antitestek meghatározása a kereskedelmi forgalomban elérhető indirekt immunfluoreszcens (IIF) módszerrel (EUROIMMUN, Lübeck, Németország) történt a gyári leírásnak megfelelően. Kiemelendő, hogy a különböző biológiai szubsztráttal fedett üveglemezeket mm nagyságú részekre vágták, így egy szérum reakcióját - benne a lehetséges antitestekkel- a különböző antigént jelentő szövetekkel, illetve sejtekkel (PAB: majom pankréász, rPAG1 [CUZD1] és rPAG2 [GP2]: humán transzfektált sejtek, non-transzfektált sejtek: kontroll, GAB: humán intesztinális kehelysejt kultúra, ASCA: *Saccharomyces cerevisiae* gomba folt, ANCA: etanol-fixált és formalin-fixált humán granulociták) egymás mellett, ugyanabban a reakció-mezőben tudták vizsgálni. A szérumokat 1:10 hígítású foszfáttal pufferolt só/Tween oldatban inkubálták 30 percig. Mosás után a lemezeken lekötött antitesteket fluoreszcenciával konjugált, kecskéből származó anti-humán IgG vagy IgA-val léptették reakcióba, és a keletkező mintázatot fluoreszcens mikroszkóp segítségével értékelték (EUROIMMUN LED, EUROStar Bluelight, EUROIMMUN AG, Lübeck, Németország). A specifikus fluoreszcens mintázatot mutató szérumokat a következőképpen osztályoztuk (9. ábra):

- Retikulogranuláris (1-es típus) és cseppszerű (2-es típus) pankréász acinus sejt elleni fluoreszcencia. Az rPAG1 (CUZD1) elleni antitestek retikulogranularis, míg az rPAG2 (GP2) elleni antitestek cseppszerű mintázatot eredményeztek.
- GAB pozitivitás esetén elmosódott határú felhős fluoreszcencia ábrázolódott az intesztinális kehelysejteken.
- Az ASCA antitestek jelenlétekor a reakció mező teljes egészében fluoreszkált a pékélesztőn.
- Az etanol-fixált granulociták alkalmazásával két fő ANCA mintázatot detektáltak: granuláris fluoreszcencia, mely a sejtmagot szabadon hagyva egyenletesen oszlott el az egész citoplazmában (citoplazmatikus típus, cANCA), vagy sejtmag körüli fluoreszcencia (perinukleáris típus, pANCA). Formalin-fixált granulocitákat használtak a tipikus pANCA és az atípusos pANCA további elkülönítésére: a formalin-rezisztens (típusos) pANCA etanol- és formalin-fixált granulocitákkal is reakcióba lépett, míg a formalin-szenzitív (atípusos) pANCA csak az etanol-fixált granulocitákkal reagált, a formalin-fixáltakkal nem. Minden pozitív mintát végpontig titráltak.



9. ábra. A különböző specifikus immunfluoreszcens mintázatok.

Bal felső kép: rekombináns pankreász antigén 1 [rPAg1 (CUZD1)] elleni antitestek retikulo-granuláris rajzolata. **Jobb felső kép:** rekombináns pankreász antigén 2 [rPAg2 (GP2)] elleni antitestek cseppszerű mintázatot eredményeztek. **Bal középső kép:** etanol-fixált granulociták alkalmazásával detektált sejtmag körüli fluoreszcencia [perinukleáris antineutrofil citoplazmatikus antitest (pANCA)]. **Jobb középső kép:** kontroll minta, specifikus mintázat nem látható. **Bal alsó kép:** kehelysejt elleni antitest (GAB) pozitívítás, elmosódott határu felhős fluoreszcencia ábrázolódott az intesztinális kehelysejteken. **Jobb alsó kép:** *Saccharomyces cerevisiae* elleni antitestek (ASCA) jelenlétekor a reakciómező teljes egészében fluoreszkált a péklesztőn (EUROIMMUN, Lübeck, Németország www.euroimmu.de).

IV.1.6. Toll-like receptor (TLR) 2, 3 és 4 meghatározás IBD-ben

TLR vizsgálatunkba összesen 35 IBD-s beteget vontunk be (24 CD, 11 UC).

Közülük a biopsziás mintákat 12 frissen diagnosztizált IBD-s gyermek [fdIBD, 8 fiú, 4 leány, életkor: medián (tartomány): 13 (6-18) év, 8 CD, 4 UC], valamint 23 relapszusban lévő, aktív IBD-s gyermek [rIBD, 14 fiú, 9 leány, életkor: medián (tartomány): 15 (8-18) év, 16 CD, 7UC] kolonjának makroszkópiusan gyulladt-, és nem gyulladt területeiről gyűjtöttük. Az rIBD-s gyermekek közül 16-nak volt CD-je, 7-nek UC-je. Az rIBD-s gyermekek közül 7 Crohn-beteg és 3 kolitisz ulcerózással prednizolont és 5-aminosalicilsavat (5-ASA) -, 5 Crohn-beteg és 4 kolitisz ulcerózással prednizolont, azatioprint és 5-ASA-t, 2 Crohn-beteg azatioprint és 5-ASA-t, és 2 Crohn-beteg 5-ASA-t kapott. A nyolc kontrollnál [5 fiú, 3 leány, életkor: medián (tartomány): 14 (6-16) év] a kolon biopszia elvégzése organikus ok kizárása (krónikus hasfájás, hematokézia) miatt vált szükségessé, de a krónikus vastagbélgyulladás kizárható volt, valamint a szövettani kép sem mutatott eltérést. A minták egyik részéből ebben az esetben is rutin hisztológiai feldolgozás történt, másik részüket vizsgálatainkhoz használtuk föl.

Szemikvantitatív és real-time reverz transzkripció-polimeráz láncreakció (RT-PCR) mérések

RNS izolálás

A bélbiopsziákat feldolgozásig -80°C-on, lízispufferben tároltuk. Az RNS-t a Qiagen protokollja alapján az RNeasy™ Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) segítségével izoláltuk. A kinyert RNS mennyiségét és minőségét fotometrálassal határoztuk meg, és a felhasználásig -80°C-on tároltuk.

Komplementer DNS szintézis

A reverz transzkripció (RT) során 1 µg RNS-t konvertáltuk komplementer DNS-sé (cDNS) 20 µl reakció végtérfogatban, 200 U SuperScript II™ RNase H- reverz transzkriptáz, 40 U RNaseOUT™ inhibítor és 0,5 µg oligo-(dT)₁₂₋₁₈ primer jelenlétében (Gibco/BRL, Eggenstein, Németország). A reakcióelegyet 20°C-on 10 percig, majd 42°C-on 45 percig, végül 99°C-on 5 percig inkubáltuk, majd 4°C-ra lehűtöttük és felhasználásig -20°C-on tároltuk.

Szemikvantitatív PCR (TLR2, TLR3, TLR4 és humán GAPDH)

A szemikvantitatív PCR-eket 50 µl végtérfogatú [10% 10x PCR puffer, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dezoxi-nukleozid-trifoszfát (dNTP), 0,5 µM szensz és antiszensz primerek, 1,5 U rekombináns Taq polimeráz (Invitrogen, Kalifornia, USA)] reakcióelegyben végeztük 1 µl cDNS felhasználásával. A humán TLR2, TLR3 és TLR4 specifikus primereket Hausmann M. és munkatársaitól (186), a glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) specifikus primert Strehlau J. és munkatársaitól (187) vettük át. A PCR-ek során alkalmazott primerek szekvenciáit, illetve a PCR-ek körülményeit a **10. táblázatban** foglaltam össze.

10. táblázat. A PCR-ek során alkalmazott primerszekvenciák és jellemzők.

A szemikvantitatív PCR-ek során használt primerek szekvenciáit, a primerek optimális anellációs hőmérsékletét, a PCR-ek során alkalmazott ciklusszámokat, valamint a PCR során képződő termékek hosszadatait mutatja be;

(S: szensz, AS: antiszensz, TLR: Toll-like receptor, GAPDH: glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz).

Gén	Primer szekvencia	Anellációs hőmérséklet	Ciklusszám	Termék-hossz
TLR2	S: 5'-AGTTGATGACTCTACCAGATG-3' AS: 5'-GTCAATGATCCACTTGCCAG-3'	61 °C	31	598 bp
TLR3	S: 5'-ACACACTTCCAGCATCTGTC-3' AS: 5'-TGCTGTTAACAATTGCTTCTAG-3'	61°C	33	623 bp
TLR4	S: 5'-CTTATAAGTGTCTGAACTCCC-3' AS: 5'-TACCAGCACGACTGCTCAG-3'	59 °C	35	680 bp
GAPDH	S: 5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3' AS: 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'	56 °C	28	496 bp

A PCR-eket a primerekre jellemző anellációs hőmérséklet, illetve a ciklusszámok kivételével azonos körülmények között végeztük. A kezdeti 5 perces 94°C-on végzett denaturáció után a cDNS templatok megfelelő génszakaszait 31 (TLR2), 33 (TLR3), 35 (TLR4) és 28 (GAPDH) cikluson [94°C, 30 mp (denaturáció), 56°C (GAPDH) 15 mp-, 61°C (TLR2 és TLR3) 30 mp-, 59°C (TLR4) 20 mp (anelláció), 72°C 1 perc (extenzió)] keresztül szaporítottuk föl, végül egy 7 perces 72°C-on történő inkubáció során tettük teljessé az extenziót.

A keletkezett PCR terméket 2.5%-os, 0,4 mg/l etídium-bromiddal festett agaróz gélben elektroforetizáltuk, majd UV fénnel vizualizáltuk. PCR vizsgálatainkat minden esetben duplikátumban, pozitív és negatív kontrollok felhasználásával végeztük. A termékek várt

hosszait 100 bp DNS marker (Ready-Load™, Gibco/BRL, Eggenstein, Németország) segítségével ellenőriztük.

SYBR Green alapú real time PCR (humán TLR2, TLR3, TLR4)

A SYBR Green alapú real time PCR-eket 20 µl végtérfogatú [10% LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Németország), 3mM MgCl₂ (TLR2 és TLR3), illetve 4mM MgCl₂ (TLR4), 0,2-0,2 µM szensz és antiszensz primer] reakcióelegyben végeztük, 1 µl cDNS felhasználásával. A TLR2, TLR3 és TLR4 specifikus primerek megegyeztek a szemikvantitatív RT-PCR-ek során alkalmazottakkal (**15. táblázat**). A kezdeti 8 perces 95°C-on végzett denaturáció után a cDNS templátokat 55-65 cikluson [95°C, 3 mp (denaturáció), 59°C (TLR2), 63 °C (TLR3), 61 °C (TLR4) 5 mp (anelláció), 72°C 28 mp (extenzió)] keresztül szaporítottuk. A PCR-eket pozitív és negatív kontrollok felhasználásával ellenőriztük. PCR termékeink olvadáspont analízisét a következő paraméterek szerint végeztük: a mintákat 10 mp-ig 95 °C-on, majd 20°C/mp sebességű hűtés után 15 mp-ig 40 °C-on tartottuk. Ezt követően 20°C/mp sebességű fűtéssel 85°C-ra melegítettük fel.

A FRET alapú real time PCR-eket 20 µl végtérfogatú [10% LC FastStart DNA Master hybridization Probe, +2mM MgCl₂, 0,5-0,5 nM szensz és antiszensz primer, 0,17 nM mindkét próba] reakcióelegyben végeztük, 1 µl cDNS felhasználásával. A humán GAPDH specifikus mRNS szekvenciát az NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) nukleotid adatbázisa és Blast szolgáltatása segítségével választottuk ki (NCBI: NM_002046). A primerek tervezéséhez a LightCycler Probe Design szoftvert használtuk (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Németország).

A GAPDH specifikus primerek a következők voltak: szensz primer: 5'-caccacatggagaaggctg-3', antiszensz primer: 5'-gtgatggcatggactgtg -3'. Az egyik próba 5' végét Light Cyclyer Red 640 fluoroforral jelöltük: 5' LCRed640-ccctggccaaggtcatcatga-PH-3'; a másik próba 3' végét fluorezcinnel jelöltük: 5'-tcctgcaccaccaactgcttagc-FL-3' (Tibmolbiol, Berlin, Németország). A kezdeti 8 perces 95°C-on végzett denaturáció után a cDNS templátokat 45 cikluson [95°C, 4 mp (denaturáció), 50°C 8 mp (anelláció), 72°C 22 mp (extenzió)] keresztül szaporítottuk. A PCR-eket pozitív és negatív kontrollok felhasználásával ellenőriztük. PCR termékeink olvadáspont analízisét a következő paraméterek szerint végeztük: a mintákat 10 mp-ig 95 °C-on, majd 20°C/mp sebességű hűtés után 15 mp-ig 40 °C-on tartottuk. Ezt követően 20°C/mp sebességű fűtéssel 85°C-ra melegítettük fel.

A szemikvantitatív és real time RT-PCR mérések értékelése

A szemikvantitatív PCR-ek eredményeit a Gel-Pro™ szoftver 3.1-es verziója (Media Cybernetics, Inc., MD, USA) segítségével denzitometráltuk és értékeltük. A real time PCR-ek eredményeit a LightCycler szoftver 3.5.3-as verziójának (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Németország) segítségével értékeltük ki.

Western blot (TLR2, TLR3, TLR4, aktin)

A vizsgált biopsziás mintákat lizáló pufferben [10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin, 1% Triton-X 100, 0,1 M Tris-HCl (pH=8), 1 mM EGTA, 5 mM NaF, 1 mM PMSF, és 10 mM Na₃VO₄, Sigma, USA], homogenizáltuk (FastPrep FP120, Qbiogene Inc, Cedex, Franciaország), majd a homogenizátumot centrifugáltuk (10000g, 10 perc, 4 °C). A felülúszó összfehérje koncentrációját spektrofotometriás módszerrel, Bradford reagenssel határoztuk meg. A minták fehérje-koncentrációját 1- (TLR2, TLR4), illetve 2 mg/ml-re (TLR3) állítottuk be. A mintákat felhasználásig -80°C-on tároltuk. Pozitív kontrollként a TLR2 és TLR4 Western blotok esetében teljes vérből izolált perifériális limfocita (PBL)-, a TLR3 western blot esetében COLO320DM (kolorektális adenokarcinóma) sejtlizátumot alkalmaztunk (sc-2226, Santa Cruz Biothechnology Inc., CA, USA).

TLR2, TLR3, TLR4 és aktinspecifikus antitestek

Elsődleges humán TLR2, TLR3, TLR4 és aktin specifikus ellenanyagokként anti-humán kecske poliklonális IgG antitesteket használtunk. A primer antitestek a TLR2 és TLR3 [TLR2 (N-17) és TLR3 (Q-18) Santa Cruz Biothechnology Inc., CA, USA] esetében a fehérjék N terminális végét, a TLR4 és aktin [TLR4 (C-18) és aktin (C-11) Santa Cruz Biothechnology Inc., CA, USA] esetében pedig a fehérjék C terminális végét ismerték fel. Másodlagos antitestként torna-peroxidázzal (HRP) konjugált egér anti-kecske IgG antitestet (Santa Cruz Biothechnology Inc., CA, USA) használtunk.

SDS-PAGE mintákhoz treatment puffert [30% glicerol, 20% merkapto-etanol, 0,7 M SDS, 0,25 M Tris-HCl pH=6,8] adtunk, majd a mintákat TLR3 és TLR4 esetében 37 C°-on 30 perc, TLR2 esetében 60C°-on 15 perc, aktin esetében 100 °C-on 5 perc inkubálással denaturáltuk. A 10 %-os SDS-poliakrilamid gél zsebeibe denaturált, 20 (TLR2), 100 (TLR3), illetve 60 (TLR4) µg összfehérjének megfelelő mennyiségeket vittünk föl. Koncentráló gélként 4%-os SDS-poliakrilamidot használtunk. Mintáim mellé molekulasúly markert (BenchMark™, Gibco/BRL, Eggenstein, Németország) és pozitív kontrollt vittünk fel. Az elektroforézist hűtött rendszerben (Penguin™ Dual-Gel Water Cooled Systems, Owl, NH, USA), 1,5 órán

keresztül, 120 V-on, 20 mA-rel végeztük 25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1% SDS tartalmú futtató pufferben.

Blottolás és immunoblotting

A szeparált fehérjéket az SDS-poliakrilamid gélről nitrocellulóz membránra (Hybond™ ECL™, AP Biotech, Buckinghamshire, UK) blottoltuk. A blottolást hűtött rendszerben (MiniTank™ Electroblotter, Owl, NH, USA), 2 órán keresztül, 70 V-on, 220 mA-el végeztük, 25 mM Tris, 170 mM glicin és 20 % metanol tartalmú transzfer pufferben. A fehérjetranszfer sikerességét 1% Ponceau S (Sigma Chemical Co., MO, USA) és 25% ecetsav (Reanal, Budapest, Magyarország) tartalmú festékekkel ellenőriztük.

Az **immunoblotting**hoz szükséges ellenanyag koncentrációkat előzetesen dot-blot technikával határoztuk meg. A blotmembránokat szobahőmérsékleten, 2 órán keresztül, óvatos rázatás mellett blokkoló oldatban (5% zsírmentes tejpor, 10% PBS puffer) inkubáltuk, hogy a nem specifikus kölcsönhatások kialakulását gátoljuk a membránok és az antitest fehérjék között. A mosási lépéseket, valamint az antitestekkel történő inkubálást is folyamatos, de óvatos rázatás mellett végeztük. Blokkolást követően a membránokat az elsődleges, TLR2 (1 µg/ml koncentrációban), TLR3 (2 µg/ml koncentrációban) és TLR4 (2 µg/ml koncentrációban) specifikus ellenanyagokkal szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül, mosó oldatban (1% zsírmentes tejpor, 0,1% Tween™20 detergens, 10% PBS puffer) inkubáltuk. Annak céljából, hogy ellenőrizzük, vajon az SDS-poliakrilamid gélek zsebeibe egyforma mennyiséget vittünk-e fel az egyes mintákból, elsődleges, aktin (1 µg/ml koncentrációban) specifikus ellenanyaggal inkubáltuk a membránokat, az előzőekben leírt körülményeknek megfelelően. Mosások után (szobahőmérsékleten, 3 x 10 perc) a másodlagos, HRP konjugált ellenanyaggal (0,16 µg/ml koncentrációt alkalmazva) szobahőmérsékleten, 30 percig inkubáltuk a blotmembránokat, majd további mosásokkal (3 x 20 perc) távolítottuk el az ellenanyag feleslegét.

Az immunoreaktív helyek kemilumineszcens szignálját Amersham Pharmacia protokoll szerint ECLplus reagenssel, Hyperfilm ECL™-en (AP Biotech, Buckinghamshire, UK) detektáltuk. A Western blot-ok eredményeit a Gel-Pro™ szoftverrel (Media Cybernetics, Inc., MD, USA) denzitometráltuk és értékeltük.

IV.1.7. Az intesztinális alkalikus foszfatáz (iAP) vizsgálata IBD-ben

Ebbe a mukózális vizsgálatba 15 IBD-s gyermeket és 10 kontrollt vontunk be. A betegek részletes adatait a **11. táblázat** tartalmazza.

11. táblázat. Az újonnan diagnosztizált Crohn-beteg (CD) és kolitisz ulceróza (UC) betegek klinikai jellemzői.

Az aktivitási indexet a PCDAI (gyermekkori Crohn-betegség aktivitási index) és PUCAI (gyermekkori kolitisz ulceróza aktivitási index) alapján határoztuk meg.

F: fiú, L: lány.

beteg	IBD formája (CD vagy UC)	nem (F:fiú, L: lány)	kor (év)	vezető tünet	aktivitási index PCDAI/ PUCAI	időtartam (tünetek megjelenése óta)
1	CD	L	15	perianális fisztula	25	1 hónap
2	CD	F	4	véres széklet	20	3 hónap
3	CD	F	11	hasfájás, hasmenés	45	2 hónap
4	CD	L	9	véres hasmenés	25	2 hónap
5	CD	L	4	hasmenés, anémia	30	3 hónap
6	CD	F	14	véres széklet	50	6 hónap
7	CD	L	1,5	véres hasmenés	35	1,5 hónap
8	CD	F	11	véres hasmenés	20	2 hónap
9	CD	F	12	hasmenés, anémia	35	3 hónap
10	CD	F	10	fogyás, hasmenés	52,5	1,5 hónap
11	UC	L	12	véres széklet, hasfájás	20	4 hónap
12	UC	L	9	véres széklet, anémia	35	1 hónap
13	UC	F	17	véres széklet, hasfájás	25	7 hónap
14	UC	L	12	véres széklet, fogyás	55	4 hónap
15	UC	F	6	véres széklet	40	2,5 hónap

iAP mRNS, Western blot és TLR4 kolokalizációjának értékelése

Mivel az **iAP**-pal kapcsolatos kutatásunkban a TLR2, TLR3 és TLR4-hez hasonló módon vizsgáltuk az mRNS és fehérjeszinteket, ezért itt csak a specifikus különbségeket közlöm. Ezt követi az iAP-TLR4 együttes lokalizációjának immunfluoreszcens vizsgálata.

Az **iAP mRNS expressziót** real-time PCR-rel határoztuk meg Light Cycler480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) készüléken. A real-time PCR-t 20 µl végtérfogatú reakcióelegyben végeztük, amely 1 µl gyári primert (RealTime ready Catalog Assays, katalógusszám: 05532957001, Roche Diagnostics, Mannheim, Németország), 10 µl BrilliantII QPCR Master Mixet (Stratagene, Cedar Creek, TX, USA), 1 µl cDNS-t és 8 µl DNS-mentes vizet tartalmazott. A kezdeti 10 perces, 95°C-on végzett denaturáció után a cDNS templátokat 50 cikluson [95°C, 20 mp (denaturáció) és 60°C, 1 perc (anelláció és extenzió)] keresztül szaporítottuk fel. A PCR-eket pozitív és negatív kontrollok felhasználásával ellenőriztük. Az **iAP fehérje** meghatározásánál a blotmembránokat blokkolás után az iAP-ra specifikus ellenanyaggal (AbCam, Cambridge, Egyesült Királyság) 1 µg/ml koncentrációban inkubáltuk, 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten, mosó oldatban (1% sovány tejpor, 0,1% TweenTM20 detergens, 10% PBS puffer). A további lépések megegyeztek a TLR meghatározásnál leírtakkal.

Az iAP és TLR4 kolokalizációjának immunfluoreszcens festése

A duodenumból, terminális ileumból és kolonból származó biopsziás mintákat közvetlenül mintavétel után folyékony nitrogénben fagyasztottuk le, majd Shandon kriomátrixba (ThermoElectron Co., Waltham, USA) ágyaztuk és 3-4 µm vastagságú metszeteket készítettünk. A metszeteket 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten TLR4-re specifikus poliklonális kecske ellenanyaggal és iAP-ra specifikus nyúl poliklonális ellenanyaggal (Abcam Plc, Cambridge, UK) inkubáltuk. A másodlagos antitestek Alexa Fluor 488-jelölt csirkében termelt, kecskére specifikus (Invitrogen, Eugen, OR, USA) és Alexa Fluor 568 kecskében termelt, nyúlra specifikus (Invitrogen, Eugen, OR, USA) ellenanyagok voltak, melyekkel szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk a metszeteket. A magok kimutatására Hoechst 33258 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) festéket használtunk 10 percen keresztül. A szövetek festődését Zeiss LSM 510 Meta konfokális lézer szkennings mikroszkóppal (Carl Zeiss, Jena, Németország) vizsgáltuk.

IV.1.8. Immunfenotípus analízis IBD-ben

A perifériás vérből történő részletes immunfenotípus analízishez (természetes és adaptív immunitás) 2007 szeptembere és 2009 augusztusa között az I. Sz. Gyermekklinika Gyermek-gasztroenterológiai Szakrendelésén megjelent betegeket vontunk be. **Első csoportba** tizennégy kezeletlen, terápiában még nem részesült beteg tartozott. Ezek a betegek semmilyen gyógyszert nem szedtek a diagnózis időpontjában. A CD diagnózisát a Porto kritériumok alapján, az aktivitás indexet pedig a PCDAI szerint (Pediatric Crohn's Disease Activity Index) határoztuk meg (27). **Második csoportját** képezte a vizsgálatnak az a tíz gyermek, aki a hagyományos terápiára (szteroid, azatioprin és 5-aminosalicilát) reagált. Ezek a betegek, akinek a PCDAI értékük kezelés után kevesebb, mint 10 volt, alkották a remisszióba került betegek csoportját. **Harmadik csoportba** az a tizenkét beteg tartozott, akik a hagyományos terápiára nem reagáltak, ezért infliximab (IFX) kezelést kaptak (5mg/ttkg a 0., 2., és 6. héten). Ők alkották a relapszusos betegek csoportját, mert a PCDAI pontszámuk magasabb volt, mint 30. **Negyedik csoportba** soroltuk a kontrollok tizenöt fős populációját, akik életkorban és nemből illeszkedtek a betegekhez, és funkcionális hasfájás miatt kerültek kivizsgálásra, de organikus betegség, gyulladás, laboratóriumi eltérés nem igazolódott náluk. A betegcsoportok karakterizálása a **12. táblázatban** található.

A rutin vérvételekkel egyidőben 2-6 ml heparinizált perifériás vért vettünk: a kezeletlen betegtől a diagnózis időpontjában; a remisszióba kerültek csoportjában az első remisszió időpontjában; a relapszusos populációban az IFX terápia kezdete előtt, illetve 2 és 6 héttel később. Ebből a perifériás vérmintából határoztuk meg a különböző fehérvérsejt populációk gyakoriságát áramlási citométerrel.

12. táblázat. A vizsgálatba bevont betegek és egészséges kontrollok klinikai és laboratóriumi adatai.

Rövidítések: IFX: infliximab; PCDAI: Gyermekkori Crohn-betegség aktivitási index; L1: vékonybél, L2: vastagbél, L3: vékony- és vastagbél lokalizáció a montreáli kritériumok alapján (ref. 27). Statisztika: vs. kontroll: *p<0,05, **p<0,01; ***p<0,01; vs. kezeletlen: +p<0,05, +++p<0,01; vs. első remisszió: #p<0,01, ###p<0,01; vs. relapszus: ×p<0,05, ××p<0,05, ××× p<0,001.

medián [interkvartilis tartomány]	kontroll	kezeletlen (hagyományos terápia előtt)	első remisszió (hagyományos terápia után)	relapszus (IFX kezelés előtt)	IFX terápia (2. kezelés előtt)	IFX terápia (3. kezelés előtt)
Klinikai adatok						
n (fiú/lány)	15 (6/9)	14 (6/8)	10 (4/6)		12 (5/7)	
életkor (év)	12 [8-16]	10 [8,5-13]	11,5 [9,5-15,5]	14 [11-16]	14,5 [11,5-16]	14,5 [12-16]
testtömeg- index (kg/m ²)	19,5 [16,5-22,3]	13,9 [12,5-15,8]***	18,6 [14,4-19,2] ⁺	17,4 [14,1-19,5]*	18,8 [14,6-21,3]	19,25 [16,1-22,1]
testsúly (percentilis)	58 [35-79]	13 [4-23]***	24 [19-44] ⁺	21 [7-28]*	23 [15-63]	35 [10-74]
betegség- tartam (hónap)	-	10 [8,5-13]	10,5 [8,5-15,5]	11,5 [9,25-15]	12 [9,5-15]	12 [10-15]
betegség aktivitás (PCDAI)	-	45 [39-58]	0 [0-5]+++	45 [25-48]###	20 [7-28]××	13 [2-22]×××
lokalizáció (n, montreáli kritérium)	-	L1 (1), L2 (2), L3 (11)	L1 (0), L2 (2), L3 (8)		L1 (1), L2 (2), L3 (9)	
Laboratóriumi adatok						
fehérvérsejt szám (G/l)	7,9 [5,7-10,1]	12,4 [9,4-14,2]**	11,7 [8,4-14,4]	10,0 [8,2-11,2]	7,9 [5,5-10,6]	6,7 [4,5-10,4] [×]
vérlemezke szám (G/l)	346 [288-375]	657 [451-746]**	442 [308-624]	479 [396-750]**	392 [293-523]	383 [308-483] [×]
szérum vas (μmol/l)	16 [14-21]	4 [2-12]*	8 [4-10]*	4 [2-7]***	5 [4-7]***	8 [6-8]**, ×
szérum albumin (g/l)	45 [44-49]	37 [34-39]***	42 [42-45] ⁺	40 [36-41]***	41 [38-45]**	42 [38-45]**
C-reaktív protein (mg/l)	0 [0-1]	21 [5-65]***	7 [2-11]**, +	27 [9-55] [#] , ***	9 [3-11]***	5 [1-14]***, ×

Minta előkészítés az immunfenotípus vizsgálatokhoz

Az immunsejt fenotípus vizsgálatához 2-6 ml heparinizált perifériás vérmintát gyűjtöttünk (BD Vacutainer, Beckton Dickinson & Co, Plymouth, UK), amit legfeljebb 12 órán át tároltunk

szobahőmérsékleten. A levett vérmintát mostuk (23 °C, 200 g, 5 perc), a vérplazmát leszívtuk, majd a minta fagyasztva került tárolásra (-80 °C) a citokinszint méréshez. A maradék vérből a perifériás vér mononukleáris sejteit (PBMC) grádiens centrifugálással szeparáltuk (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden). A vérmintát, és a vérvételi csőből a maradék mintát foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldattal (PBS, Semmelweis Egyetem Központi Gyógyszertár, Budapest) 3 ml Ficoll oldatra rétegeztük rá. Ezután a mintát mostuk (23 °C, 400 g, 27 perc), majd a határreteget (buffy coat) leszívtuk, és PBS oldatban két alkalommal ismét mostuk (23 °C, 200 g, 7 perc). Amennyiben a minták nem kerültek azonnal a kvantitatív mérési fázisba, úgy a PBMC-t fagyasztva tároltuk a mérés időpontjáig (-80°C). A fagyasztáshoz a PBMC-t 0,5 ml magzati borjúsavóban (FCS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) reszuszpendáltuk. Ezek után egy 0,4 ml magzati borjúsavóból és 0,1 ml dimetilszulfoxidból (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) álló oldatot óvatosan, cseppenként adtunk a PBMC-hez, és azonnal lefagyasztottuk a mintát (-80°C). A mérések előtt a lefagyasztott sejteket felolvasztottuk és PBS oldatban két alkalommal mostuk (23 °C, 200 g, 7 perc). Ezután a frissen szeparált, vagy a fagyasztva tárolt mintát szétosztottuk annyi részre, ahány mérési panel meghatározása volt a cél, de minimum 1×10^6 sejtet jutattunk be panelenként a mintákba.

A **sejtfelszíni méréshez** panelenként a gyártó által előírt protokollnak megfelelő mennyiségű fluoreszcens molekulával jelölt konjugált antitestet tartalmazó festéket (**13. táblázat**) adtuk hozzá a megfelelő mennyiségű mintához, majd inkubáltuk (4 °C, 30 perc). Ezután a mintákhoz 0,5 ml PBS-t mérve a fölösleges, nem kötődött festéket lemostuk (23°C, 200 g, 7 perc). Következő lépésként 0,5 ml lizáló és fixáló oldat került a mintákhoz (Lysing Solution, Beckton Dickinson & Co, Plymouth, UK), majd sötétben inkubáltuk őket (23 °C, 20 perc). A mintákat mosás után (23°C, 200 g, 7 perc) 0,5 ml PBS-ben reszuszpendáltuk a FACS-os méréshez.

13. táblázat. Az alkalmazott sejtfelszíni és sejten belüli fluoreszcens festékek.

A rövidítéseket és a részleteket lásd a bevezetésben, és a megfelelő szövegrészben.

festék	gyártó	katalógus
<i>Sejtfelszíni markerek</i>		
6b11	BD Pharmingen, Pe Anti-Human invariant NKT cell	552825
CCR4	BD Pharmingen, PE Mouse Anti-Human CCR4	551120
CD11c	BD Pharmingen, APC Mouse Anti-Human CD11c	333144
CD123	BD Pharmingen, PE Mouse Anti-Human CD123	340545
CD14	BD Pharmingen, FITC Mouse Anti-Human CD11c	555397
CD161	BD Pharmingen, APC Mouse Anti-Human CD161	550968
CD25	BD Pharmingen, FITC Mouse Anti-Human CD25	555431
CD3	BD Pharmingen, PerCP DD3, Clone	345766
CD4	BD Pharmingen, Pe-Cy7 Mouse Anti-Human CD4, Clone	557852
CD45R0	BD Pharmingen, PEMouse Anti-Human CD45R0	555493
CD45RA	BD Pharmingen, FITC Mouse Anti-Human CD45RA	335039
CD62L	BD Pharmingen, PerCP Mouse Anti-Human CD62L	555545
CD69	BD Pharmingen, APC Mouse Anti-Human CD69	555533
CD8	BD Pharmingen, APC-Cy7 Mouse Anti-Human CD8, Clone	557834
CXCR3	BD Pharmingen, APC Mouse Anti-Human CD183 (CXCR3)	550967
HLA-DR	BD Pharmingen, PerCP Mouse Anti-Human HLA-DR	347402
Lin-1	BD Pharmingen, FITC Mouse Anti-Human Lin-1	340546
TLR-2	eBioscience, PE-Cy7 Anti-mouse/human TLR2 (T2.5)	25-9024-80
TLR-4	eBioscience, Alexa Fluor700 Anti-human TLR4 (HTA125)	56-9917-71
<i>Sejten belüli markerek</i>		
FoxP3	eBioscience, PE Anti-human Foxp3 Staining Set (PCH101)	72-5776-40
izotípus	eBioscience, PE Anti-human PE IgG Isotype	12-4714-73

A **sejten belüli** FoxP3 meghatározáshoz először a sejtfelszíni festékeket (CD4, CD25) adtuk hozzá a mintákhoz és inkubáltuk a protokolloknak megfelelően (4 °C, 30 perc). Ezután 1 ml fixáló és permeabilizáló oldatot (Fixation/Permeabilization Solution, eBioscience, San Diego, CA, USA) adva a mintához újra inkubáció következett (4 °C, 30 perc). A mintákat 2 ml fixáló oldatban (Fixation Solution, eBioscience, San Diego, CA, USA) mostuk (23 °C, 200 g, 7 perc). A PBMC-khez egyrészt FoxP3 festéket (PE Anti-human Foxp3 Staining Set, eBioscience, San Diego, CA, USA), másrészt az izotípus kontrollt adtuk hozzá, majd inkubálásuk következett (23 °C, 30 perc). A festés végeztével a minta 2 ml fixáló oldatba

került, mosásra (23°C, 200 g, 7 perc). Az azonnali méréshez a 0,5 ml PBS-ben reszuszpendált mintát gépbe helyezésének pillanatáig jégen tartottuk.

Immunsejt markerek az immunfenotípus meghatározásában

A perifériás vérminták vizsgálatához szükséges panelek fluoreszcens festékek kombinációit tartalmazták. Így kis mennyiségű vérmintából több sejtpopuláció vizsgálata lehetséges volt, az áramlási citométer szűrőinek igény szerint való kombinálásával. A bevezetésben részletesen írtam különböző immunsejtek patomechanizmusban betöltött szerepéről, itt csak a fontosabb populációk azonosításában szerepet játszó markereket jellemzem röviden, metodikai szempontból.

A **CD4** az MHC II, a **CD8** pedig az MHC I molekulák adhézis és jelző koreceptorai. Emberben előfordulhat Tc-ként működő CD4⁺ T-sejt is, de ezek a sejtek is MHC II-re korlátozottak. Így tehát a CD4, ill. CD8 expressziója egy sejten azt határozza meg, hogy melyik MHC-re korlátozott, és nem feltétlenül a sejt funkcióját.

A **CXCR3 receptor**, mely **CD183**-ként is ismert, a kemokin receptorok családjába tartozik. Fokozott expressziója megfigyelhető a **Th1 sejtek** felszínén. A Th1 sejtek túlnyomó része CD4⁺ sejtekből, kisebb hányaduk CD8⁺, vagy NKT, esetleg regulátoros T-sejtekből alakul ki. A **CCR4**, mely **CD194** néven is ismert, a CXCR3 receptorhoz hasonlóan a kemokin receptorok közé tartozik, és alkalmas a **Th2 sejtek** kimutatására. A **CD45RO**, és a **CD45RA** aktivációs markerek. A **CD69**, **CD25**, **HLA-DR** és **CD62L** szintén aktivációs markerek. A CD69 nagyon korai aktivációs marker, a CD25 (IL-2 receptor alfa lánc, IL-2R, Tac, p55) korai aktivációs marker, ellenben késői marker a HLA-DR (fő hisztokompatibilitási komplex, MHC) és a CD62L (L-szelektin ligand). A **CD161** receptor a legtöbb NK sejten, invariáns NKT sejteken és citolítikus T-sejteken expresszálódik. A **6b11** anti-invariáns NKT sejt ellenes antitest, és így az iNKT sejtek (6b11⁺, CD3⁺) vizsgálatára alkalmas.

A DC sejtek vonal marker (Lineage1, Lin1) negativitásuk és HLA-DR pozitivitásuk alapján azonosíthatóak. Az mDC sejtek **CD11c**-t (antigén felvétel, T-sejt aktiváció, IL-12 termelés), míg a pDC sejtek **CD123**-at (szupresszor hatás, IFN α termelés) expresszálják. A Lin1 koktél CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 és CD56 elleni antitestekből áll. A **CD14** (Mo2, lipopoliszacharid, LPS receptor) az LPS indukálta makrofág aktivációban játszik szerepet, az LPS és LPS-kötő fehérjék komplexét köti, a perifériás monociták markere. A **CD16** (Fc γ RIII A és B) az immun-komplex mediált sejtaktivációban játszik szerepet. A **CD19** (B4) a B-sejt aktivációban játszik szerepet, **CD21**-gyel és **CD81**-gyel képez komplexet, míg a **CD20** (B1) a B-sejt aktivációban és regulációban játszhat szerepet. A **CD56** (Leu-19, NKH1) a homotípiás

adhézióban szerepel, az N-CAM izoformája. A **CD11c** (CR4 α lánc, p150,95, alfaX integrin lánc) az integrin alfa családba tartozik, nem-kovalensen kötődve a CD18-hoz a p150,95 integrint alkotja. A **CD123** (IL-3R α) a citokin receptor I-es típus, fibronektin III-as típus családba tartozik, a **CD131** jelátviteli láncsal asszociálva. Csontvelő őssejteken, granulocitákon, monocitákon, megakariocitákon expresszálódik, az IL-3 biológiai hatását közvetíti a CD131-gyel együtt.

A **TLR2** és **TLR4** a veleszületett immunitás fő markerei, mind a monociták, mind a DC sejtek felszínén megtalálhatóak. A TLR2 monocitákon, makrofágokon, mDC és hízósejteken expresszálódik, míg a TLR4 ezeken kívül még az intesztinális epitéliumon is.

A **Treg sejteket FoxP3⁺ sejtekként** azonosítottuk. A regulátoros T sejtek fejlődésében és működésében a fokozott **CD25** expresszió központi szerepet játszik. A CD4 populáción belül a Treg sejtek aránya 1-10% körül alakul perifériás vérmintában, de kevesebb, mint 1%-ban CD8 Treg sejtek is azonosíthatóak.

Áramlási citométeres (FACS) mérések

Az immunsejtek prevalenciáját áramlási citométerrel (BD FACS Aria, Beckton Dickinson & Co, Plymouth, UK) mértük a Semmelweis Egyetem I. Sz. Gyermekklinika kutatólaboratóriumában. A FACS vizsgálatok során fluoreszcens festékekkel előre konjugált antitesteket használtunk a sejttypusok meghatározásához. A mérés során a vizsgálandó sejtet tartalmazó egy sejt sor szélességű folyadékoszlopra lézertényt irányít a gép (488 nm-es kék és 633 nm-es vörös fényt). Amikor a sejt (vagy 0,2-150 μ m méretű részecske) a lézertény fókuszpontjába ér, a ráeső fény oldalirányba („side scatter”) és előre felé („forward scatter”) szóródik. Az **előre szóródó fény** a sejt (részecske) méretéről ad információt és további módosítás nélkül külön csatornán („forward scatter characteristics”, FSC) detektálható. Az **oldalra szóródó fény** a sejt granuláltságának, morfológiai tulajdonságainak detektálására szolgál („side scatter characteristics”, SSC). A gerjesztés során keletkező fényszórási jelek mellett különböző hullámhosszú, jelöléstől függő fluoreszcens emissziós jelek keletkeznek. A fluoreszcens jeleket a készülék optikai szűrők segítségével elkülöníti egymástól. A szűrők funkciója alapján meg lehet különböztetni „long pass” (LP) és „band pass” (BP) szűrőket. Az **LP szűrők** egy meghatározott hullámhossznál nagyobb (felül áteresztő), vagy kisebb (alul áteresztő) hullámhosszúságú fényt engednek át, a többi fényt visszatükrözik. A **BP szűrők** csak egy meghatározott tartományba eső fényjeleket engednek át (pl. 600-620 nm). A jeleket erősítés, majd analóg-digitális konverzió után számítógép gyűjti és elemzi. A különböző variációs lehetőségéből a **14. táblázat** mutat be példákat.

14. táblázat. Példa panel összeállításokra BD FACS Aria típusú áramlási citométerre, saját szűrő-beállításokkal sejtfelszíni és sejten belüli mérésekhez.

Az alábbi panel összeállítások mindegyike tartalmazza a feltüntetettekén kívül az FSC (szűrő nélkül) és SSC (488/10-es BP szűrővel) paramétereket is. (FSC: forward scatter; SSC: side scatter; BP: band pass; LP: long pass; NK: természetes ölő sejt; DC: dendritikus sejt; Treg: regulátoros T sejt)

Első szűrő beállításban mérhető panelek

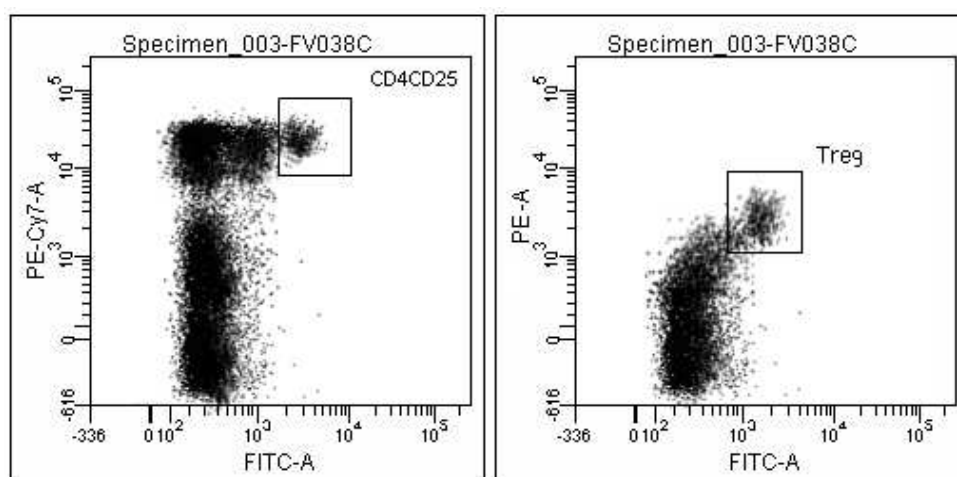
Festék	FITC	PE	PerCP	PECy7	APC	APCCy7
gerjesztés (nm)	488	488	490	488	650	633
emisszió (nm)	520	575	675	785	660	760
szűrő BP (LP)	530/30 (502)	576/26 (556)	675/20 (655)	780/60 (735)	660/20 (-)	780/60 (735)
T sejtek 1.		CCR4	CD62L	CD4	CXCR3	CD8
T sejtek 2.	CD45RA	CD45RO	HLA-DR	CD4	CD69	CD8
NK		6B11	CD3	CD11b	CD161	
Treg	CD25	FoxP3		CD4		CD8

Második szűrő beállításban mérhető panelek

Festék	FITC	PE	PerCP	PECy7	APC	Alexa 700
gerjesztés (nm)	488	488	490	488	650	702
emisszió (nm)	520	575	675	785	660	720
szűrő BP (LP)	530/30 (502)	576/26 (556)	675/20 (655)	780/60 (735)	660/20 (-)	695/40 (655)
DC	Lin1	CD123	HLA-DR	TLR2	CD11c	TLR4
monociták	CD14			TLR2		TLR4

A nem fixált minták mérését a festés után a lehető leghamarabb kell elvégezni (maximum 1 óra a festéstől számítva). Fontos, hogy a mintákat gépbe helyezésük pillanatáig sötétben és hűtve kell tárolni. Minden panel összeállítás előtt a gép használati utasításának megfelelően kompenzációs számításokat végeztünk, mégpedig egyszeresen festett és negatív kontroll mintákkal. Az erősítések mértékét úgy választottuk meg, hogy adott festék esetén a negatív és pozitív populáció a lehető legjobban elkülöníthető legyen a kapuzás során. A kapott kompenzációs értékek a fluoreszcens festékek spektrumának átfedését mutatják, mely a vizsgálatok során maximum 10% volt. Egy mintát véletlenszerűen többször is visszamértünk, hogy a mintán belüli szórásokat ellenőrizhessük. A sejtfelszíni mérések során negatív, és - szükség esetén - izotípus kontroll mintákat használtunk, míg a sejten belüli festések esetén

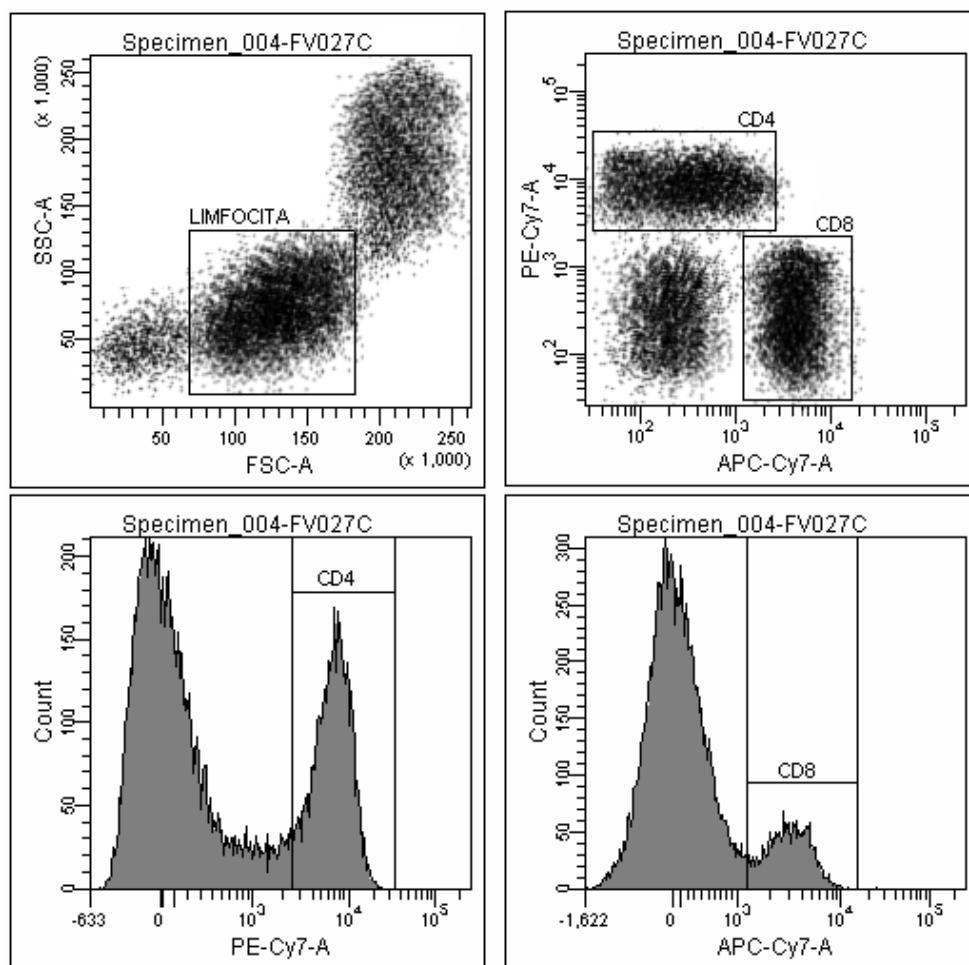
minden esetben izotípus kontrollt is, az autofluoreszcenciából és a nem specifikus festődésből eredő zaj kiszűrésére. Minden panel mérésekor legalább 10^5 sejt mérése történt a limfocita kapuban (FSC és SSC, valamint CD3 pozitivitás alapján). A mérési eredmények ábrázolása „dot-plot”, és hisztogram segítségével történt. Egy típusos, Treg sejtek izolálásra szolgáló példát a **10. ábrán** mutatok be.



10. ábra. A regulátoros T sejtek (Treg) azonosítása.

Az ábra bal oldalán látható, hogy a $CD4^+CD25^{hi}$ sejtpopuláció kijelölésével (négyyszöges keret) régebben hogyan azonosították a Treg sejteket. Ismert azonban, hogy a $CD4^+CD25^{hi}$ sejtcsoport nem csak Treg sejteket tartalmaz. Újabban ezért, az ábra jobb oldalán látható módon a $CD4^+$ sejteken belül a $FoxP3^+$ sejteket (négyyszöges keret) tekintik Treg-eknek, a jelenleg leginkább elfogadott protokollnak megfelelően. Ezt a populációt a $CD4^+$, vagy a $CD4^+CD25^{+hi}$ kapun belül szokták azonosítani attól függően, hogy csak a természetes, vagy az indukált Treg sejteket is beleveszik a számításba.

A „dot-ploton” az egyes sejtekről kapott fényjelek ábrázolhatóak intenzitásuk függvényében, míg a hisztogram egy paraméter jelintenzitása alapján mutatja a sejtek megoszlását. A kiértékelések a citométerhez mellékelt szoftver (FACS Diva, Beckton Dickinson & Co, Plymouth, UK) segítségével történtek.



11. ábra. Az áramlási citométeres kiértékelés menete.

Az ábra bal felső képén a perifériás mononukleáris sejteken (PBMC) belül sejtméret („forward scatter characteristics”, FSC) és granuláltság („side scatter characteristics”, SSC) alapján azonosítható a limfociták populációja. Az ábra jobb felső képén limfocita kapun belül a CD4 és CD8 expresszió alapján „dot-ploton” a $CD4^+CD8^-$ sejtek a T helper (Th), míg a $CD8^+CD4^-$ populáció a T citotoxikus (Tc) sejtek lesznek. Az ábra bal alsó részén a CD4 jelölés, míg az ábra jobb alsó részén a CD8 jelölés hisztogramon való eloszlása látható.

Az áramlási citométeres vizsgálatokban az adott PBMC populáción belül az egyes sejttípusok prevalenciáját lehet meghatározni. Ezek a százalékos értékek egy adott populáción belül mutatják a vizsgált immunsejt előfordulási gyakoriságát. Amennyiben egy sejttípus prevalenciáját, vagy egy sejttípus bizonyos expresszióját kívánjuk meghatározni, mindig százalékos (%) értékeket adunk meg, ami a jelölt populáción belüli arányt jelenti. Az adott sejttípust a „dot-plot” segítségével két, (vagy újabban háromdimenziós „dot-plotok” segítségével három) marker kombinációjával lehet azonosítani. Ritkán az adott expresszió mértékét hisztogram segítségével, statisztikai középértékkel adják meg, és így jellemzik az expresszió kvantitatív értékét, mint jelintenzitást (**11. ábra**).

„Citokin chip” citokin szintek mérésére

A perifériás vérmintából szeparált vérplazmát fagyasztva (-80 °C) tároltuk a mérések időpontjáig. A mérések a Semmelweis Egyetem Központi Laboratóriumában fehérje meghatározási módszerrel történtek (Bio-Plex Protein Array system, Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK). A Bio-Plex módszer chiptechnikán és áramlási citométeres módszeren egyszerre alapul, és lehetőséget ad egyszerre több (gyakorlatilag 27, de elméletileg akár 100) analit meghatározására is. Olyan mikrogöngyöket alkalmaznak ugyanis, amelyeket két színnel jelölnek, ezzel közel 100 gyöngytípust tudnak létrehozni. A gyöngyökhöz monoklonális antitesteket kötnek, majd fluoreszcens festéket. A mérésben a kapillárison áthaladó gyöngyöket két színes lézer világítja meg. A piros fény a gyöngy, a zöld fény pedig a fluoreszcens jel intenzitását teszi mérhetővé. A jelet analóg-digitális konverzió után a gép szoftveresen kiértékeli és egy standard görbéhez viszonyítva adja meg a citokin szinteket (1,95-32 000 pg/ml tartományban).

IV.2. CÖLIÁKIA**IV.2.1. Klaudin (CLDN) meghatározása 2 különböző duodenális lokalizációban**

A **klaudinnal (CLDN)** kapcsolatos vizsgálatba 33 újonnan kórismézett cöliakiás gyermeket (életkor: 2-17 év, átlag: 6,4 év, 20 lány, 13 fiú) vontunk be. Az endoszkópos mintavételnél a proximális biopszia a duodenum bulbuszából, a disztális pedig a duodeno-jejunális átmenetből történt. Kontrollként 14 olyan gyermek (11 lány, 3 fiú) hasonló lokalizációjú mintái szolgáltak, akiknél a felső endoszkópia krónikus hasfájás organikus okának kizárása végett történt, de a makroszkópos kép, a szövettani vizsgálat és a laboratóriumi eredmények normálisak voltak, beleértve a normális transzglutamináz értéket is. A biopsziák szövettani vizsgálatakor először Marsh-féle morfológiai és immunhisztológiai (monoklonális CD3) elemzést végeztünk. A Marsh beosztás alapján cöliakiás betegeinket két csoportra osztottuk, egy kevésbé súlyos (I. csoport, Marsh 2-ig), és egy súlyosabb boholykárosodást mutató (II. csoport, Marsh 3) populációra.

A **CLDN expressziójának** elemzése szintén immunhisztokémiai módszer segítségével történt (monoklonális CLDN 2, 4 és poliklonális CLDN 3, Zymed, San Francisco, CA, USA). Az eltávolított szövettani mintákat 4%-os pufferolt formalin-oldatba helyeztük 24 óráig, majd víztelenítettük. Ezután paraffinba ágyazva 3-5 mikrométeres metszeteket készítettünk, amiket hematoxinil-eozinnal festettük. Az antigén feltárása Dako antigén-feltáró oldattal (Dako, Glostrup, Denmark) 30 percen át 42 fokon (mikrohullámú sütőben) történt, majd inkubáció

következett primer antitesttel 1:80 hígítással 60 percen keresztül. A reakció láthatóvá tétele az avidin-biotin komplex segítségével történt (peroxidáz technika, ABC system, Dako). Az értékelés pontrendszere a pozitív sejtek százalékos arányán alapult (0: 5%>; 1: 5-20%; 2: 20-40%; 3: 40-60%; 4: 60-80%; 5: 80-100%). Egy metszeten random módon legalább 10 területet értékeltünk, egy területen legalább 100 sejtet analizáltunk.

IV.2.2. Az iAP intesztinális expressziójának (mRNA és fehérjeszint) és TLR4 kolokalizációjának vizsgálata

Az **iAP**-pal kapcsolatban az IBD-s betegeknél leírt vizsgálati protokollt (IV.1.7. fejezet) cöliákiasokban is elvégeztük (duodenális iAP mRNS, fehérje és TLR4 kolokalizáció). Ebbe a vizsgálatba 15 cöliákias gyermeket, és 10 kontrollt vontunk be. A cöliákias gyermekek karakterizációját a **15. táblázatban** foglaltam össze.

IV.2.3. HSP72 mRNS, fehérje és lokalizáció a cöliákiasok duodenumában

Ebben a vizsgálatba duodenum biopsziás mintákat vettünk 16 kezeletlen, [6 fiú, 10 leány, életkor: medián (tartomány): 6,7 (3,7-13,9) év], 9 kezelt, gluténmentes diétát folytató cöliákias gyermektől [4 fiú, 5 leány, életkor: medián (tartomány): 6,7 (4,9-12,7) év], és 10 kontroll személytől [4 fiú, 6 leány, életkor: medián (tartomány): 8 (1,7-13) év]. A mintákat a kezelt cöliákias csoportban olyan, legalább egy éve gluténmentes diétát tartó gyermekektől vettük, akiknél teljes klinikai remisszió következett be, szérumuk antiendomízium antitestje negatív volt, valamint normál bélboholy szerkezetet figyeltünk meg náluk.

HSP72 RNS izolálás és valós idejű polimeráz láncreakció (RT-PCR)

Az RNS-t a gyártó protokollja alapján RNeasy™ Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) segítségével izoláltuk. A reverz transzkripció során 1 µg RNS-t komplementer DNS-sé konvertáltunk. HSP72 specifikus primerek (forward: 5'-TGC GAG AGG GCC AAG AGG AC-3'; reverz: 5'-GTC GCG CCC GTT GAA GAA GT-3') alkalmazásával SYBR Green alapú real time PCR mérést végeztünk. A real time PCR-ek eredményeit LightCycler 3.5.3 szoftver (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Németország) segítségével értékeltük ki.

15. táblázat. Újonnan diagnosztizált cöliákiás (C) és gluténmentes étrendet tartó cöliákiás (GFD) gyermekek klinikai jellemzői.

F: fiú, L: lány. IEL: intraepiteliális limfociták száma 100 enterocitára vonatkoztatva (kóros érték: 30 fölött).

	C vagy GFD	Nem F:fiú L:lány	Kor (év)	Tünet	IEL	Marsh érték
1	C	L	3	súlyvesztés	80	3b
2	C	L	3	súlyvesztés	72-85	3b-3c
3	C	L	2	súlyvesztés, hasmenés	80-90	3c
4	C	L	7	vashiány	50-60	3b-3c
5	C	F	12	cöliákia szűrés	55-70	2
6	C	L	5	cöliákia szűrés	40-50	2
7	C	L	3	vashiány	85	3b
8	C	L	10	növekedési elmaradás	65	3b
9	C	F	2	vashiány	50	3c
10	C	L	5	cöliákia szűrés	72-80	3b
11	GFD	L	12	krónikus hasfájás	20-25	0
12	GFD	F	6	-	10-15	0
13	GFD	F	7	-	3-4	0
14	GFD	L	13	-	10	0
15	GFD	L	16	-	6	0

Fehérje izolálás és immunfluoreszcens festés

A korábban leírt lépések után (IV.1. fejezet, TLR) a blotmembránokat tejporban blokkoltuk, majd először az elsődleges HSP72 (nyúl monoklonális IgG, Dr. László L, Eötvös Lóránd

Tudományegyetem, Budapest, Magyarország) specifikus ellenanyaggal, majd mosást követően a másodlagos, HRP konjugált ellenanyaggal (kecske anti-nyúl IgG, Millipore, San Diego, USA) inkubáltuk. Az immunoreaktív helyek kemilumineszcens szignálját Amersham Pharmacia protokoll szerint ECLplus reagenssel, Hyperfilm ECL™-en (AP Biotech, Buckinghamshire, UK) detektáltuk. A Western blot eredményeket Gel-Pro™ szoftverrel (Media Cybernetics, Inc., MD, USA) denzitometráltuk és értékeltük.

A duodénumból származó biopsziákat **immunfluoreszcens vizsgálat** céljából közvetlenül mintavételezés után lefagyasztottuk, majd Shandon kriomátrixba ágyztuk (ThermoElectron Co., Waltham, USA), és 5 µm vastagságú metszeteket készítettünk. A metszeteket HSP72-re specifikus monoklonális nyúl ellenanyaggal, majd többszöri mosást követően kecskében termelt nyúlra specifikus Alexa Fluor® 488 jelölt IgG F(ab')₂-vel (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) inkubáltuk. A DNS kimutatására Hoechst 33342 festéket használtunk (Sigma-Aldrich Company Ltd, Gillingham, UK). A metszeteket mostuk és lefedtük Vectashield médiummal (Vector Laboratories, Burlingame, USA). A kontrollként használt metszeteket csak szekunder ellenanyaggal inkubáltuk. A szövetek festődését Zeiss LSM 510 Meta konfokális lézer szkennig mikroszkóppal (Carl Zeiss, Jena, Germany) vizsgáltuk. A készülékhez tartozott egy invert Axiovert 200M mikroszkóp, 20x apokromatikus (NA=0,80) és 63x apokromatikus, immerziós olajat igénylő DIC objektívekkel (NA=1,4).

IV.2.4. Immunfenotípus vizsgálatok cöliákiában

Az immunfenotipizálással kapcsolatos **perifériás vérből** történő meghatározásra tíz gyermeket vontunk be, akik az I. Sz. Gyermekklinika frissen diagnosztizált cöliákiás betegek közé tartoztak. A cöliákia diagnózisa az érvényben lévő protokolloknak és a Marsh kritériumoknak megfelelően került felállításra. Mindegyik betegben a transzglutamináz (TG) IgA szint 200 U/l fölött volt, a duodenális biopszia szövettani vizsgálata szubtotális vagy totális bélboholy atrófiát, és az IEL-k 40% fölötti emelkedett számát igazolta. Mindegyik cöliákiával diagnosztizált gyermekben GFD-t indítottunk. A tünetek elmúltával, amikor a TG IgA szint közel normalizálódott (10-40 U/l), ismételt vérvétel történt. Kontroll populációnak 15, korban és nemben egyező gyermek szolgált, akik –később igazoltan- nem organikus hasfájás miatt kerültek kivizsgálásra. Mind a diagnózis felállításakor, mind a tünetek elmúltával, a rutin vérvételekkel egyidőben 6 ml heparinizált perifériás vért vettünk, és immunfenotipizáltuk a betegeket és a kontrollokat. A vizsgálatba bevont gyermekek adatait a **16. táblázat** tartalmazza.

16. táblázat. A vizsgálatban résztvevő betegek és kontrollok adatai.

GFD: gluténmentes diéta; TG: transzglutamináz; Ig: immunglobulin

medián [interkvartilis tartomány]	kontroll	kezeletlen cöliákias (GFD előtt)	kezelt cöliákias (GFD után)
n (fiú/lány)	15 (6/9)		10 (4/6)
életkor (év)	3 (2-6)	3 (2-5)	4 (2,5-6,5)
betegségtartam (hónap)	-	3,5 (2,5-5)	4 (3-6,5)
testsúly (kg)		15,5 (11-17,6)	16,5 (11,8-18,6)
TG (IgA, egység)	-	264 (205-298)	29 (10-40)
TG (IgG, egység)	-	38 (21-56)	14 (7-34)

IV.2.5. Plazminogén hiány és cöliákia a duodenális fekély hátterében

Újabb vizsgálatok szerint a cöliákiasok jelentős százalékában (9,6%) előfordulhat ismeretlen etiológiájú **gasztrointesztinális fekély**. Egy 6 éves, plazminogén hiányos (PLG) és cöliákias kislánynál kimutatott duodenális fekély hátterében duplán jelölt immunfluoreszcens módszerrel elemeztük az ulkusz egyik lehetséges patomechanizmusát. A beteg 3 hónapos kora óta ismert PLG diagnózisa az alacsony szérum PLG aktivitáson (2%, normálérték: 80-120%), és homozigóta „missens” mutáció igazolásán (R216H: Arg216>His, nukleotide 780G>A exon 7) alapult. Mindkét szülő, akiknek szérum PLG aktivitásuk 40%-os volt, heterozigóta formában hordozta a mutációt. A kislánynál hirtelen fellépő hematemézis hátterében duodenális fekélyt igazoltunk a felső endoszkópiánál. A gyermeknél fekélyre hajlamosító tényezőket, kórállapotokat nem találtunk (urea kilégzési teszt normális, korábban gyógyszert nem szedett).

A **szövettani vizsgálatnál** boholyatrófiát igazoltunk (Marsh III/a), kórosan emelkedett intraepiteliális limfocitaszámmal (> 40%). Mivel a szérum TG2 is kórosnak bizonyult, a cöliákia diagnózisa egyértelmű volt.

A szövettani vizsgálatnál Mallory festéssel a PLG hiányban ismert, kórosan emelkedett számú fibrindepozitumot lehetett igazolni a fekély közvetlen környezetében. Mivel a kóros depozitumok közelében szokatlan érrajzolat ábrázolódott, fölmerült bennünk, hogy esetleg a cöliákiára jellemző TG2 depozitumok, és a PLG hiány következtében fölszaporodó fibrin egymással kölcsönhatásba léphet, és ennek ulcerogén hatása is lehet.

A minták speciális immunfluoreszcens festését fluoreszcein isotiocianáttal (FITC) konjugált anti-humán IgA (DAKO), és Alexa Fluor 594-konjugált szekunder egér- és nyúl elleni antitestekkel végeztük. Előtte a primer antitestek CUB7402 anti-TG2 monoklonális antitestek (NeoMarkers), anti-fibronektin és nyúl eredetű von Willebrand faktorok voltak (DAKO). A fibrin FITC konjugált fibrin ellenes antitesttel jelöltük (Boehringer).

IV.3. ALLERGIÁS KOLITISZ

IV.3.1. Laboratóriumi és kolonoszkópiás vizsgálat AC-ben

Vizsgálatunkban 44 olyan hematokéziás, (átlagéletkor 5,5 hónap, tartomány 25 nap-11 hónap), anyatejjel táplált, egészségesnek tűnő csecsemő vett részt, akiknél nem volt alvadási zavar, kemény széklet, sem físzúra és a széklettenyésztés negatívnak bizonyult, így az AC diagnózisát föl lehetett állítani. Anyai (tehéntej) eliminációs étrend az esetek döntő többségében megszüntette, vagy csökkentette a hematokéziát. Súlyos vagy tartós hematokézia, súlycsökkenés miatt 12 csecsemőnél (átlagéletkor: 4,3 hónap, tartomány: 25 nap -7 hónap) végeztünk laboratóriumi vizsgálatot, kolonoszkópiát és szövettani összehasonlító elemzést.

IV.3.2. Immunfenotipizálás allergiás kolitiszes csecsemők perifériás véréből

2006 szeptembere és 2008 januárja között az I. Sz. Gyermekklinika Gyermek-gastroenterológiai Szakrendelésén megjelent csecsemők közül 34 esetében volt a panasz véres széklet. A leggyakoribb okok, így a fertőzés és a sérülés kizárása után, anyai eliminációs étrendet javasoltam (tehéntej és tojás elhagyása az anyai étrendből). Egy hónap múlva már csak tizenegy gyermeknél maradt meg a hematokézia. Egy csecsemő Crohn-betegnek bizonyult, őt kizártuk, így tíz gyermek került beválasztásra a vizsgálatba (**17. táblázat**). Az AC diagnózisát a kolonoszkópia során látott jellegzetes képek (limfonoduláris hiperplázia: LNH, vagy aftás lézió, továbbá más ok kizárása pl. polip), a biopsziás mintában jelenlévő eozinofília (>6 eozinofil a nagy nagyítású látótérben), és az alapján állítottuk fel, hogy a hosszabb utánkövetés (13-24 hónap) után sem tért vissza a panasz a tartós anyai eliminációs diéta (tej, tojás), illetve elementáris tápszerre való áttérés után (Neocate; SHS Int, Liverpool, UK). Tíz, életkorban és nemben illő, anyatejet fogyasztó gyermek szolgált kontrollként, akiknél a panaszok háttérében funkcionális hasfájást kórisméztem.

A diagnózis időpontjában 2 ml heparinizált vért vettünk a rutin vizsgálatokkal egyidőben. A második vérmintát a hematokézia megszűnte után (2 [1-3] hónap múlva) gyűjtöttük. Széklet

hemotesttel (HSV10; Diagnosticum Zrt, Budapest, HU) igazoltuk a vérzés megszűntét. Az immunfenotípus vizsgálatokkal egyidőben a plazmából „citokin chip” (Bio-Plex Protein Array system, Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK) segítségével meghatároztuk az IFN γ /IL4 arányt.

17. táblázat. Az allergiás kolitiszes (AC) gyermekek klinikai, laboratóriumi és endoszkópos jellemzői.

AC: allergiás kolitisz,>NNL: nagy nagyítású látótér, LNH: limfonoduláris hiperplázia, AD: atópiás dermatitisz, F: fiú; L: lány.

beteg (nem)	kor (hó)	hematokézia tartam (hó)	atópia (családi)	eozinofil sejtek aránya a vérképben	kolonoszkópia (kép)	eozinofil (40x- es nagyítás / látótér)
1 (F)	6,5	2	nincs	6%	LNH, afta	17
2 (L)	4	2	AD	6,2%	LNH, afta	14
3 (F)	3	2	AD	2,5%	LNH	7
4 (F)	1	1	nincs	2%	eritéma	20
5 (L)	6	2	nincs	2,1%	LNH	9
6 (F)	4	2	AD	3%	LNH	20
7 (F)	5	1	nincs	3,4%	LNH	9
8 (F)	4	2	AD	12,8%	LNH	41
9 (F)	6	3	nincs	3,4%	LNH	38
10 (F)	5	1.5	nincs	1,4%	LNH	18

V. STATISZTIKA

A statisztikai kiértékelés során minden esetben először az adatok eloszlását vizsgáltuk. Amennyiben a Kolmogorov-Smirnov, D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk tesztek eredménye szignifikáns volt ($p < 0,05$), akkor a vizsgált populáció nem a Gauss-féle eloszlást követte. Ebben az esetben nem paraméteres tesztek alkalmaztunk, és a centrális tendencia medián [interkvartilis tartomány: 25-75 percentilis], vagy medián [tartomány] formában adtuk meg. Amennyiben az esetszám -a gyermekgyógyászati klinikai vizsgálatok sajátosságainak megfelelően- alacsony (kevesebb, mint 20 fő) volt, akkor szintén nem paraméteres tesztek alkalmaztunk. A vizsgálatok előtt power számítások történtek, hogy a nem paraméteres eljárások használatával megnövekvő másodfajú hiba lehetőségét kontrollálni lehessen. Nem paraméteres eloszlásnak megfelelően nem párosított két csoport összehasonlítására a Mann-Whitney teszt, míg párosított esetben a Wilcoxon teszt szolgált. Három, vagy több csoport összehasonlítására nem párosított mintáknál a Kruskal-Wallis tesztet, míg párosított esetben a Friedman tesztet használtuk. Post hoc számításokra a Dunn-féle teszt szolgált. Nem normál eloszlásra való tekintettel korreláció vizsgálatokhoz a Spearman tesztet alkalmaztuk. A befolyásoló faktorok korrekciójára többszörös regressziók segítségével került sor. 2x2-es kontingencia táblákat a Fisher-féle egzakt teszttel, nagyobb táblákat a χ^2 próba segítségével értékeltük ki. Mivel a fenotípus vizsgálatok hipotézis felvető vizsgálatok, az ilyenkor szokásos eljárásnak megfelelően nem történt korrekció a többszörös összehasonlításokra (Bonferroni-hatás), így az elsőfajú hiba 5%-nál magasabbnak adódhatott bizonyos esetekben. A kiértékelésre a Statistica szoftvercsomagot használtuk (Statistica 8, Statsoft, Tulsa, OK, USA).

A betegséglokalizáció szerinti endoszkópos és hisztológiai eltéréseket, valamint az MBL deficiencia és a szérum autoantitestek jelenlétét χ^2 -teszt és Fisher-exact-teszt segítségével értékeltük a CD és UC csoportok, valamint az IBD-s betegek alcsoportjai között. A betegség aktivitási indexek és az egyes laboratóriumi paraméterek közötti korrelációt Spearman-féle nonparametrikus teszttel elemeztük. Az aktivitási indexek, a laboratóriumi paraméterek és az életkorra vonatkozó eltérések összehasonlítása az egyes IBD alcsoportok között Mann-Whitney teszttel történt. Logisztikus regresszió analízist alkalmaztunk a klinikai fenotípus és a szerológiai profil összefüggésének komplex kiértékeléséhez. Ezekben a vizsgálatokban a statisztikai elemzéshez Graph Pad Prism 5 programot használtunk (GraphPad, San Diego CA,

dc_581_12

USA). A 0,05-nél alacsonyabb p érték tekintendő szignifikánsnak minden esetben, kivéve, ahol ezt külön jeleztük.

VI. ETIKAI ENGEDÉLYEK

A vérvétel, illetve a mukózális biopsziás mintavétel valamennyi vizsgálatban diagnosztikus vagy reguláris beavatkozásokhoz kötődött. Valamennyi mintát kóddal láttuk el. A regiszterrel kapcsolatos adatrögzítésénél is kódot kaptak a betegek, csak a centrumban dolgozó orvos tudta azonosítani az egyént. A vizsgálatok megkezdése előtt az adolescens gyermekek, ill. a kiskorúak hozzátartozói megfelelő felvilágosítás után írásban beleegyezésüket adták az adott vizsgálathoz (vérvétel, biopsziás minta vétele, regisztráció). A Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (TUKEB) engedélyeinek száma az IBD-vel kapcsolatos kutatások esetén: 71/2007. A mukózális és immunfenotípus vizsgálatok engedélyszámai: 73/2003, 175/2007, 124/2009. A szerológiai vizsgálatok engedélyszáma: 80/2007.

VII. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Az eredmények fejezetben az adott témához tartozó első, vagy utolsó szerzős publikációim sorszámát az adott fejezetcím végén tüntettem föl zárójelben.

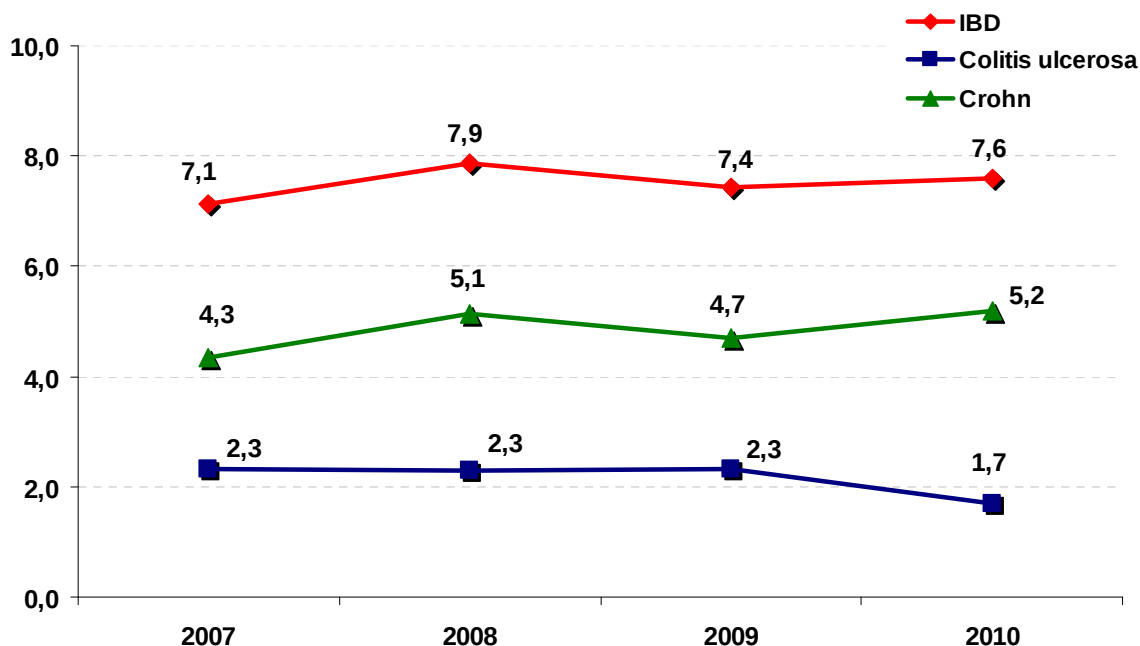
VII.1. GYULLADÁSOS BÉLBETEGSÉG

VII.1.1. Az IBD regiszterrel kapcsolatos eredmények (188-191)

Az **országos IBD regiszter (Hungarian Pediatric IBD Registry, HUPIR)** megszervezésének hármas célja volt: egyrészt, hogy a legfontosabb **epidemiológiai jellegzetességeket** hazánkban is felmérjük; másrészt, hogy a hosszú távú nyomonkövetéssel **fejlődjön a diagnosztika**, és a különböző centrumok lássák, miben maradnak el a hazai- és nemzetközi normáktól; végül, de nem utolsó sorban, hogy olyan összefüggéseket állapítsunk meg, amelyek a **nemzetközi szakirodalomban is újdonságként** szolgálnak.

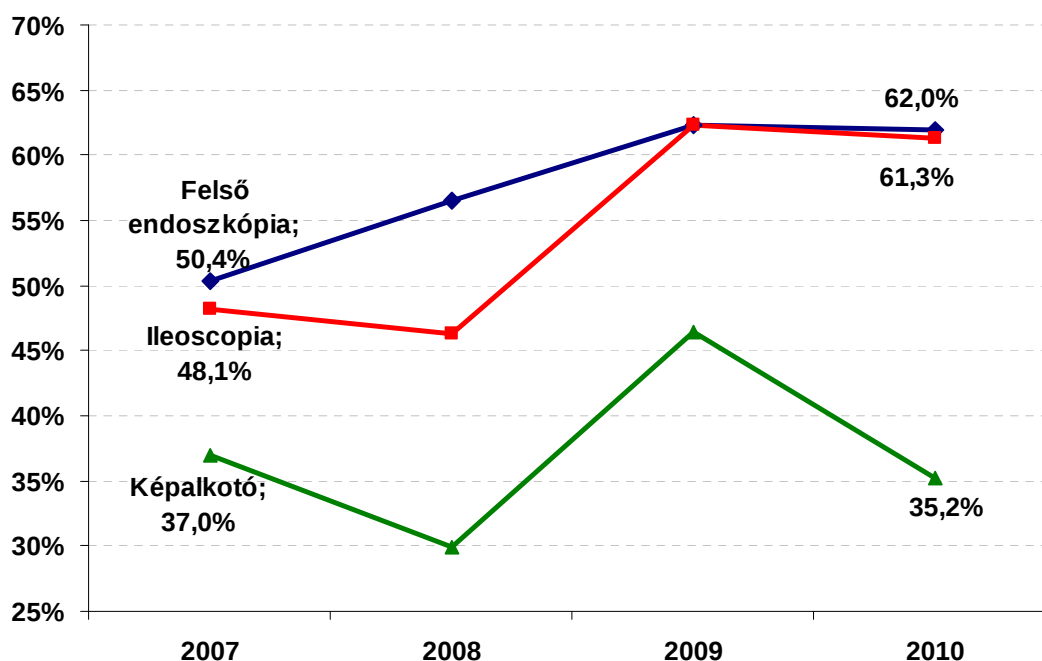
A 2007. január elsejétől működő HUPIR első 3 éve alapján megállapítható, hogy hazánkban az IBD gyakorisága megegyezik a fejlettebb országok magas incidenciáival (188-190). Három év alatt 420 új IBD-s gyermeket regisztráltunk, így az IBD gyermekkori incidenciája $7,48/10^5$ (95% CI 6,34-8,83). Ez az index CD-ben $4,72/10^5$ (95% CI 3,82-5,79), UC-ben $2,32/10^5$ (95% CI 1,71-3,09), IBD-U-ban pedig $0,45/10^5$ (95% CI 0,22-0,84). Érdekes módon CD-ben a fiúk aránya jelentősen magasabb volt a lányokhoz képest (1,43:1). Az éves incidenciákat, kiegészítve a 4. év eredményeivel, a **12. ábra** mutatja be.

A 2005-ben publikált portói kritériumok alapján javasolták (93), hogy minden IBD-re gyanús gyermek kivizsgálásánál törekedjünk arra, hogy a felső endoszkópiát, a terminális ileumba történő bejutást és a vékonybél érintettség elemzésére valamilyen speciális képalkotó vizsgálatot (CT, MRI, kontrasztos passzázs) végezzük el (4. év adata/2010 még nem publikált, csak kongresszuson bemutatott, Magyar Gyermekgasztroenterológiai Társaság kongresszusa, Hévíz, 2011. szeptember 23.). A HUPIR adatai alapján a felső endoszkópia és a terminális ileum intubációja öröndetes módon egyre gyakoribb, de a speciális képalkotók alkalmazásának aránya, a 2009-ben bekövetkezett javulás után visszaesett és lényegében stagnál. A pontos értékeket a **13. ábrán** mutatom be.



12. ábra. Az IBD (piros), a kolitisz ulceróza (kék) és a Crohn-betegség (zöld) incidenciája hazánkban 2007 és 2010 között.

Az „y” tengelyen az incidencia 100 000, 18 év alatti gyermekekre vonatkozik.



13. ábra. A portói kritériumok szerint kiemelten javasolt 3 diagnosztikus tényező (felső endoszkópia, terminális ileum intubációja és speciális, vékonybelekre irányuló képpalkotó vizsgálat: CT, MRI vagy kontrasztos passzázs) elvégzésének éves gyakorisága hazánkban 2007-2010 között.

CD-ben a **fiúk dominanciája** igazolódott (fiú:lány, 1,43:1), ugyanakkor kolitisz ulcerózában a nemek aránya érdemben nem különbözött (fiú:lány, 1:1,15). A **növekedés elmaradás** -2SD alatti testmagasság z score - CD-ben gyakoribb volt, mint UC-ban (5,7% vs. 0,8%). A WFH (testsúly a hosszhoz viszonyítva) és BMI (testtömeg index) z score átlagok szignifikánsan alacsonyabbak voltak CD-ben, mint UC-ban (-0,74 vs. -0,39, $p=0,014$ és 0,64 vs. -0,26, $p=0,005$). A növekedés elmaradás az életkor előrehaladtával kevésbé volt súlyos ($r=-0,296$, $p=0,013$), és nem mutatott összefüggést a nemmel, a betegségaktivitással, illetve a betegség kiterjedésével.

Betegség lokalizáció és viselkedés

A legtöbb CD gyermek a betegség diagnózisakor a gyulladásos csoportba tartozott (B1+B1p 85,3%), 11,6%-nak volt striktúráló (B2), és 3,1%-nak penetráló Crohn-betegsége (B3). A perianalis betegség gyakorisága 16,9% (44/260) volt. A komplikált CD gyakorisága (B2, B3) a diagnózis idején az életkorral emelkedett (5 év alattiak 0%; 5-9 évesek 11,1%; 10-14 évesek 13,4%, 15 év felettiak 18,8%), akárcsak a perianalis betegség gyakorisága (5 év alattiak 14,3%; 5-9 évesek 22,2%; 10-14 évesek 26,8% és 15 év felettiak 27,1%). Nem találtunk érdemi összefüggést a lokalizáció és a nemek, a fenotípus vagy a családi halmozódás gyakorisága között. A kolitisz ulcerózások 72%-ánál extenzív kolitisz (E3) állt fenn. A betegség kiterjedését nem befolyásolta az életkor és a nem.

Betegségaktivitás (PCDAI és PUCAI)

Aktivítási index diagnóziskor 213 betegnél (53,9%), az egy éves kontrollnál 136 betegnél állt rendelkezésre. A Crohn-betegek közül 69-nek (47,9%), a kolitisz ulcerózások közül 38-nak (55%) volt súlyos betegség aktivitási indexe (PCDAI >30, PUCAI > 30) kezdetben. A nemek, az életkor, a családi halmozódás és az extraintesztinális manifesztációk nem befolyásolták a kezdeti aktivitási indexeket. A **súlyos aktivitással induló Crohn-beteg** gyermekek aránya 52,8%-ról 9,5%-ra csökkent az egy éves kontroll idejére. A PCDAI mediánja 30-ról 8,75-re csökkent ($p<0,001$), hasonlóképpen a medián PUCAI 35-ről 0-ra süllyedt az egy éves kontrollra ($p<0,001$). A **súlyos aktivási indexű kolitisz ulcerózás** betegek aránya 52%-ról 11,8%-ra csökkent. A nemek és az életkor nem befolyásolta az egy éves aktivitási indexet.

Laboratóriumi értékek

A CRP-t, hematokrit értéket, vérlemezke számot és vas koncentrációt 306 betegnél rögzítettük. A CRP és a vérlemezke szám CD-ben gyakrabban volt kóros, mint UC-ben (**18.**

táblázat). Vashiány ($7\mu\text{mol/l}$ alatt) a Crohn-betegek 80%-ában, és a kolitisz ulcerózások 66%-ában állt fenn a diagnóziskor. A vasszint szignifikánsan alacsonyabb volt ileum érintettség esetén (L1, L3 lokalizáció), mint csak colon érintettségben (L2) (4,8 vs. $8,8\mu\text{mol/l}$, $p=0,30$).

18. táblázat. A legfontosabb laboratóriumi értékek kolitisz ulcerózában és Crohn-betegségben a diagnózis felállításakor.

	Kolitisz ulceróza átlag ($\pm$SD)	Crohn-betegség átlag ($\pm$SD)
Vas ($\mu\text{mol/l}$)	7,2 ($\pm$ 5,6)	6,0 ($\pm$ 6,6)
CRP (mg/l)	21,1 ($\pm$ 29,7)	45,2 ($\pm$ 49,2)
Trombocita (G/l)	430,5 ($\pm$ 152,5)	539 ($\pm$ 571,6)
Hematokrit (%)	35 ($\pm$ 5,1)	35,2 ($\pm$ 4,5)

CD-ben az egy éves kontrollnál tapasztalt azatioprin (AZA) igény a kezdeti emelkedett, 10mg/l feletti CRP koncentrációval pozitív korrelációban állt (64,8% vs. 32,8%, $p=0,001$). A CRP szint és a betegség kiterjedése között összefüggés nem volt. Hasonlóképpen a kezdeti emelkedett CRP szint nem korrelált az egy éves kontrollnál a PCDAI-val, a szisztémás kortikoszteroid és az infliximab igénnyel, valamint a sebészeti beavatkozások arányával.

UC-ben az egy éves kontrollnál tapasztalt AZA igény szintén pozitív korrelációban volt a CRP emelkedett szintjével ($p=0,049$). Továbbá a CRP szoros összefüggést mutatott a betegség kiterjedésével is ($p=0,036$). A magasabb CRP értékek a kiterjedtebb UC-re voltak típusosak (E1: 0%, E2: 14,2% E3: 57,1%).

Extraintesztinális manifesztációt az IBD-s betegeknél a diagnózis felállítása idején 10,9%-ban rögzítettünk. Crohn-betegeknél az EIM gyakrabban fordul elő, mint kolitisz ulcerózásoknál (12,9% vs. 7%). Leggyakoribb EIM-nek az ízületi érintettség bizonyult (42,5%), amit a bőr manifesztációk követtek. Többszörös EIM a gyermekek 10,6%-ában jelentkezett. A nem, életkor, családi halmozódás és az EIM gyakorisága között érdemi összefüggés nem igazolódott (191).

VII.1.2. Felső endoszkópia diagnosztikus értékének meghatározása (189)

Az IBD regiszter (HUPIR) első három évében (2007-2009) felső endoszkópiát 237 (56%) betegnél végeztek (112 lány, 125 fiú, átlagéletkor: 13,25 év, tartomány: 1,2-18 év).

A CD-s betegeknek közel felében multiplex (gasztroduodenális és özofago-gasztroduodenális) betegség lokalizáció állt fenn (189). Hisztológiai eltérés 71%-ban fordult elő CD-ben, és 48%-ban UC-ben. Leggyakoribbnak a gasztrikus érintettség bizonyult (CD: 53% illetve UC: 40%). A patológiás endoszkópos kép mellett huszonhárom betegben (9%) nem történt szövettani mintavétel. Harmincöt IBD-s (26 CD, 7 UC, 2 IC) gyermekben (15%) normál endoszkópos kép mellett igazolódott hisztológiai abnormalitás, köztük 3 betegben granulomát is igazolt a szövettani vizsgálat. Granulomát összesen 12 CD-s gyermekben (7%) verifikáltunk a felső gasztrointesztinális traktusban, ebből 8 esetben (5%) izoláltan csak itt volt jelen. Az össz granuloma 19%-át (12/62) a felső gasztrointesztinális traktusban mutattuk ki, 13%-uk (8/62) csak izoláltan itt volt kimutatható. A diagnosztikus „hozam” („diagnostic yield”) szempontjából fontos megfigyelés, hogy csak 1 (2%) kolitiszes betegben igazoltunk granulomát a felső gasztrointesztinális traktusban, mely a diagnózist IBD-U-ról CD-re változtatta. A betegek endoszkópos- és hisztológiai eltéréseinek előfordulási gyakoriságát az **19. táblázatban** foglaltam össze.

18. táblázat. A regisztrált IBD-s betegek makroszkópos és mikroszkópos eltéréseinek előfordulási gyakorisága a felső gasztrointesztinális traktusban.

IBD: gyulladásgalós bélbetegség, CD: Crohn-betegség, UC: kolitisz ulceróza, IBD-U: nem definiálható IBD, OGD: özofago-gasztroduodenoszkópia

	IBD	CD	UC	IBD-U	P érték CD vs. UC
Betegszám	420	265 (63%)	130 (31%)	25 (6%)	<0.0001
OGD	237 (56%)	176 (66%)	48 (37%)	13 (52%)	<0,0001
Makroszkópos elváltozások	140 (59%)	113 (64%)	19 (40%)	8 (62%)	0,003
Nyelőcső		38 (22%)	2 (4%)	1 (8%)	0,0048
Gyomor		89 (51%)	16 (33%)	5 (38%)	0,035
Duodenum		72 (41%)	6 (13%)	4 (31%)	0,0002
Mikroszkópos elváltozások	155 (65%)	125 (71%)	23 (48%)	7 (54%)	0,004
Nyelőcső		52 (30%)	7 (15%)	2 (15%)	0,042
Gyomor		93 (53%)	19 (40%)	4 (31%)	0,142
Duodenum		84 (48%)	14 (29%)	4 (31%)	0,023
Granulóma		12 (7%)			

A **laboratóriumi adatok** alapján a C-reaktív protein (CRP) és trombocita (PLT) érték szignifikánsan magasabb [$p(\text{CRP})=0,022$, $p(\text{PLT})=0,034$], a szérumban lévő vas (se Fe) érték pedig szignifikánsan alacsonyabb volt ($p=0,0296$) a makroszkópos eltérést mutató CD-s betegekben, a makroszkópos eltérést nem mutatókhoz viszonyítva. Ugyanakkor CD-ben a PCDAI és hematokrit (Htc) érték nem különbözött a felső gasztrointesztinális makroszkópos léziók jelenléte vagy hiánya esetén. A hisztológiai eltérések sem mutattak összefüggést sem a PCDAI, sem a laboratóriumi értékekkel CD-ben. Továbbá sem a makroszkópos, sem a hisztológiai kép nem korrelált a laboratóriumi értékekkel UC-ben sem.

19. táblázat. A felső endoszkópos vizsgálatok szűk megítélése (CD-re jellemző makroszkópos léziók és granulóma), és tág megítélése (összes makroszkópos és hisztológiai elváltozás).

*Granuloma jelenléte esetén a 12 betegből 8 betegben erózió, fekély, afta vagy utcakőrajzolat volt kimutatható, 1 betegben enyhe gyulladásos jelek, 3 betegben negatív a makroszkópos kép.

Felső endoszkópia CD-ben (n=176)			
Szűk megítélés		Tág megítélés	
Jellegzetes makroszkópos elváltozás, n (%)	51 (29%)	Összes makroszkópos elváltozás	113 (64%)
Erózió	24 (14%)	Hisztológia nem volt, de makroszkópos lézió fennállt	16 (9%)
Fekély	23 (13%)		
Afta	15 (9%)		
Utcakőrajzolat	1 (0,6%)		
Granuloma	4 (2%) össz 12 (7%)*	Összes hisztológiai elváltozás	125 (71%)
Összesen	55 (31%)		141 (80%)

A felső endoszkópia diagnosztikus "hozamának" („diagnostic yield”) meghatározása

A felső endoszkópia valamennyi makroszkópos és/vagy hisztológiai eltérést figyelembe véve összesen 141 CD-s betegben (80%) mutatott eltérést. Szűkebb értelemben, csak a CD-re jellemző endoszkópos képet (erózió, fekély, afta, utcakőrajzolat) és a granulóma jelenlétét vizsgálva az OGD 55 CD-s betegben (31%) nyújtott tényleges diagnosztikus segítséget.

Azonban a CD-s betegek többségében (65%) ileum (izolált ileum vagy ileokolikus) érintettséget tudtunk igazolni. Amikor a fenti eltéréseket csak azon izolált kolitiszes (L2) CD-s gyermekek alcsoportjában értékeltük, akikben nem tudtunk kolon granulómát igazolni, az OGD 16 betegben (9%) segítette a végső diagnózis megalapozását. Fenti kritériumok alapján az OGD diagnosztikus értékét 9%-nak (16/176) találtuk CD-ben, 26 %-nak (16/61) Crohn-kolitiszben, 36%-nak (16/44) a kolon granulóma nélküli Crohn-kolitiszben és 7%-nak (16/237) IBD-ben. A makroszkópos és mikroszkópos eltérések UC-ben aspecifikusak voltak és nem segítették a diagnózis felállítását (**20. táblázat**).

A betegség lokalizáció, a betegség aktivitás és a laboratóriumi paraméterek vizsgálata a felső endoszkópiával vizsgált CD-s betegekben

Összesen 143 CD-s gyermeknél volt lehetőség a montreáli kritériumok alapján megállapított betegség kiterjedést vizsgálni: az összes CD-s beteget figyelembe véve 42%-ban, a felső gasztrointesztinális érintettséget mutató betegcsoporton belül 80%-ban. A fiatalabb korcsoportokban (8 év alatt, illetve 8-14 év között) az L3+L4 érintettséget magasabbnak találtuk, mint a 14 év feletti betegekénél, bár a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns. Izolált felső gasztrointesztinális érintettséget egy betegnél sem tudtunk igazolni.

85 felső gasztrointesztinális érintettséget mutató CD-s betegnél állt rendelkezésre aktivitási index. E betegek többségénél mérsékelt, vagy súlyos betegségaktivitást észleltünk. Az átlag PCDAI érték a CD-s betegekben 33,0 (tartomány: 7,5-67,5) pont volt. Nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a felső gasztrointesztinális érintettséget mutató, illetve nem mutató CD-s betegek átlag aktivitási index értékében (**21. táblázat**).

20. táblázat. A felső endoszkópiával vizsgált Crohn-betegek betegségaktivitása.

PCDAI: gyermekkori Crohn-betegség aktivitási index, UGI+: felső gasztrointesztinális érintettség fennáll, UGI-: felső gasztrointesztinális érintettség nem áll fenn, *Felső gasztrointesztinális elváltozások esetén ismert aktivitás: CD: 85/136, **Felső gasztrointesztinális elváltozást nem mutató betegekben az ismert aktivitás: CD:19/40

	PCDAI	
	UGI+* (n=85)	UGI-** (n=19)
Enyhe (n)	4	-
Középsúlyos (n)	41	9
Súlyos (n)	40	10
Átlag aktivitási index	33,0 (7,5-67,5)	33,0 (15-52,5)

A PCDAI érték pozitívan korrelált a CRP szinttel ($n=103$, $R: 0.46$, $p<0,0001$), a hematokrit értékkel ($R: 0.34$, $p<0,0001$), a trombocita számmal ($R: 0.37$, $p=0,0001$) és az alacsony szérum vas szinttel ($R:-0.26$, $p=0,0092$) CD-ben. Ezzel ellentétben az UC-s betegekben a PUCAI érték nem mutatott szignifikáns összefüggést ezekkel a paraméterekkel.

VII.1.3. Infliximab kezelés országos felmérése terápiaerezisztens Crohn-betegségben (192)

A terápiaerezisztens, súlyos Crohn-beteg gyermekek kezelésére új lehetőséget nyújt az **anti-TNF- α (infliximab, IFX) terápia**. Egy országos felmérést irányítva megállapítottuk (2007. március-2008.12.31.), hogy a vizsgálatban részt vett 23 terápiaerezisztens CD gyermek (átlagéletkora 15 év, 12 leány) 0. héten meghatározott kiindulási PCDAI mediánja 35 pont volt (percentilis tartomány 25-75 /pc/ 30-41,9), mely az IFX kezelés 6. hetére 8,75-re csökkent (pc: 0-18,75) ($p < 0,01$). Kedvező terápiás választ 18 betegnél (81,8%) tapasztaltunk (PCDAI csökkenés ≥ 15). A 6. hétre 13 gyermek (59,1%) került remisszióba (PCDAI ≤ 10). A kezelés 4 esetben (18,2%) nem eredményezett kedvező terápiás választ (PCDAI csökkenés < 15) (192).

Vizsgálatunkban külön-külön is értékeltük az egyes betegségformák PCDAI alakulását a kezelést követően. A **gyulladásos típusban** szenvedő CD betegek kiindulási PCDAI mediánja 35-ről (pc: 30-42,5) 0-ra (pc: 0-10) csökkent a kezelés 6. hetére ($p < 0,01$). A **fisztulás** betegek PCDAI mediánja a 0. héten meghatározott 30-ról (pc: 30-37,5) 20-ra (pc: 10-20) csökkent. Bár ebben a csoportban a PCDAI csökkenése szintén szignifikáns volt, érdemes megjegyezni, hogy három betegnél a kezelés hatására a fisztulák többségének mérete csökkent, váladékozása mérséklődött, ugyanakkor a PCDAI értéke érdemben nem javult. Összességében az IFX indukciós kezelést követően a kiindulási, összesen 20 db fistulából a kezelés 6. hetére, 14 db (70%) teljesen záródott.

Javulás mutatkozott a betegek fizikális állapotában, aktivitásában, laboratóriumi paramétereiben is (hematokrit, CRP, szérum albumin). A gyógyszer mellékhatásaként két gyermeknél akut infúziós reakció, egy harmadiknál anafilaxiás reakció alakult ki. Késői szövődményről három esetben számoltak be, két betegnél légúti infekció, a harmadiknál az alkaron jelentkező bőrkiütés formájában.

Infliximabbal kapcsolatos ismereteimet az USA egyik legnagyobb IBD centrumában (Philadelphia, CHOP) mélyíthettem el, az eredményekről számos összefoglaló közleményben beszámoltam a nemzetközi (108, 193) és hazai szakirodalomban egyaránt (107,109,194,195). Új eredményként megállapítottam, hogy 4458 infliximab kezelést összegezve 3,8%-os

gyakorisággal fordult elő akut infúziós reakció, amely a felnőttekben megfigyelt értékkel összemérhető (108). Hazánkban elsőként számoltunk be egy másik biológiai terápia, az **adalimumab** (anti-TNFalfa teljes mértékben humanizált változata) sikeres kezeléséről egy CD gyermekben (196). A 12 éves fiúnál a korábbi hagyományos, majd infliximab kezelés hatástalan volt. Adalimumab kezelést követően PCDAI értéke 10 alá csökkent, a 10. terápiás hétre valamennyi fisztulája zárult, CRP értéke normalizálódott.

VII.1.4. MBL szintek, és az MBL deficiencia előfordulása az IBD-s betegekben, valamint ezek összefüggése a szerológiai markerekkel (197)

A mannóz-kötő lektinnel (MBL) kapcsolatos vizsgálatunkban alacsony MBL szintet (< 500 ng/ml) 107-ből 34 (31,8%) CD-s, 52-ből 18 (34,6%) UC-s és 95-ből 13 (13,7%) kontroll gyermekben találtunk. MBL deficienciát (< 100 ng/ml) 10 (9,4%) CD-s, 6 (11,5%) UC-s és 9 (9,5%) kontroll gyermekben észleltünk (**22. táblázat**). Statisztikailag szignifikánsan alacsonyabb átlag MBL szinteket észleltünk mind a CD-s, mind az UC-s betegekben a kontrollokhoz képest. Továbbá az alacsony szérumban MBL szint (< 500 ng/ml) előfordulása szignifikánsan gyakoribb volt mind a CD-s, mind az UC-s betegekben, mint a kontroll csoportban. Az MBL deficiencia előfordulását (< 100 ng/ml) azonban hasonlóan találtuk az IBD-s és a kontroll csoportban. Nem észleltünk szignifikáns különbséget az MBL deficiencia, és az alacsony MBL szint prevalenciájában, illetve az átlag MBL szintekben a CD-s és UC-s betegek között. Ezen kívül nem találtunk szignifikáns kapcsolatot az alacsony MBL szint, vagy az MBL deficiencia és az ASCA, illetve a pANCA antitestek között, sem CD-ben, sem UC-ben.

21. táblázat. Mannóz-kötő lektin (MBL) szintek Crohn-betegségben (CD), kolitisz ulcerózában (UC) és a kontroll csoportban.

* IQR (inter-kvartilis tartomány): az első és harmadik kvartilis közötti tartomány

	Átlag MBL szintek ng/ml (IQR)*	MBL deficiencia (< 100 ng/ml), n (%)	Alacsony MBL szint (< 500 ng/ml), n (%)
CD (n=107)	1591 (416,9-2958)	10 (9,4%)	34 (31,8%)
UC (n=52)	1133 (383,2-2447)	6 (11,5%)	18 (34,6%)
Kontroll (n=95)	2304 (931-3186)	9 (9,5%)	13 (13,7%)

Az MBL szintek, a klinikai fenotípus, a CRP és az aktuális betegségaktivitás közötti összefüggés IBD-ben (197)

Az UC-s és CD-s betegek klinikai fenotípusát a különböző MBL szint kategóriák szerint a **23. és 24. táblázat** mutatja. CD-ben az alacsony MBL szint (< 500 ng/ml) összefüggést mutatott az izolált terminális ileum érintettséggel ($p=0,01$), az MBL deficiencia (< 100 ng/ml) pedig a fiú nemmel ($p=0,004$). A szérumban MBL szint, és az MBL deficiencia nem mutatott kapcsolatot a gyógyszeres kezeléssel, a sebészi beavatkozás szükségességével, vagy az extraintesztinális manifesztációkkal, sem CD-ben, sem UC-ben. Továbbá az MBL szint nem mutatott összefüggést a CRP-vel és az aktuális PCDAI értékkel CD-ben, illetve a CRP-vel és a PUCAI értékkel UC-ben. A CRP ellenben pozitívan korrelált a PCDAI értékkel CD-ben ($n=86$, $p<0,0001$), ugyanakkor nem mutatott szignifikáns összefüggést a PUCAI értékkel UC-ben.

22. táblázat. Kolitisz ulcerozás (n=52) gyermekek klinikai fenotípusa és szerológiai státusza a különböző mannóz-kötő lektin (MBL) szint kategóriák szerint.

*PSC: primer szklerotizáló kolangitisz

	MBL deficiencia (<100 ng/ml) n=6	Alacsony MBL szint (<500 ng/ml) n=18	Kompetens MBL szint (>500 ng/ml) n=34	Összes beteg n=52
Fiú/lány	3/3	9/9	13/21	22/30
Életkor év, (tartomány)	13,6 (10-17,5)	14,4 (8,5-19)	13,7 (6-19,7)	14,0 (6-19,7)
Életkor a diagnózis felállításakor, év (tartomány)	10,3 (2-15,7)	11,6 (1,2-17,8)	11,6 (4,6-18)	11,6 (1,2-18)
Betegségtartam, év (tartomány)	3,4 (0-8)	2,7 (0-13,4)	2,1 (0-7)	2,3 (0-13,4)
Lokalizáció (n=40)	n=6	n=14	n=26	
Proktitisz (E1)	-	-	5 (19,2%)	5 (12,5%)
Bal oldali kolitisz (E2)	3 (50%)	4 (29%)	10 (38,5%)	14 (35%)
Extenzív kolitisz (E3)	3 (50%)	10 (71%)	11 (42,3%)	21 (52,5%)
Gyakori relapszus	3/6 (50%)	10/29 (34,4%)	7/15 (46,6%)	17/44 (38,6%)
Artritisz	1/6 (16,6%)	1/17 (5,9%)	2/29 (6,9%)	3/46 (6,5%)
Okuláris manifesztáció	1/6 (16,6%)	1/17 (5,9%)	0/29 (0%)	1/46 (2,2%)
Kután manifesztáció	1/6 (16,6%)	2/17 (11,8%)	0/29 (0%)	2/46 (4,3%)
PSC*	2/6 (33,3%)	4/17 (23,5%)	5/29 (17,2%)	9/46 (19,6%)
Szteroid használat//refrakter	5/6 (83,3%)//1/6 (16,6%)	12/17 (70,6%)// 3/17 (17,6%)	24/29 (82,7%)// 3/29 (10,3%)	38/46 (82,6%)// 6/46 (13%)
Azatioprin adás	3/3 (50%)	6/16 (37,5%)	15/29 (51,7%)	23/45 (51,1%)
Kolektómia	-	-	-	-
pANCA (IgA vagy IgG) pozitivitás	5/6 (83,3%)	14/16 (87,5%)	20/31 (64,5%)	34/47 (72,3%)

23. táblázat. Crohn-beteg (n=107) gyermekek klinikai fenotípusa és szerológiai státusza a különböző mannóz-kötő lektin (MBL) szint kategóriák szerint.

*PSC: primer szklerotizáló kolangitisz

	MBL deficiencia (<100 ng/ml) n=10	Alacsony MBL szint (<500 ng/ml) n=34	Kompetens MBL szint (>500 ng/ml) n=73	Összes beteg n=107
Fiú/lány	9/1	24/10	40/33	64/43
Életkor év, (tartomány)	13,5 (8,7-19,2)	13,8 (5,8-20)	14,2 (5,3-19,6)	14,1 (5,3-20)
Életkor a diagnózis felállításakor, év (tartomány)	12,1 (5,5-16,2)	12,4 (5,5-17,6)	12,8 (2-18)	12,7 (2-18)
Betegségtartam, év (tartomány)	1,4 (0-3,2)	1,3 (0-7)	1,4 (0-9)	1,4 (0-9)
Lokalizáció (n=74)	n=6	n=24	n=50	
Ileum (L1)	1/6 (16,6%)	9 (37,5%)	7 (14%)	16 (21,6%)
Kolon (L2)	1/6 (16,6%)	5 (20,8%)	9 (18%)	14(18,9%)
Ileokolon (L3)	3/6 (50%)	10 (41,6%)	34 (68%)	44(59,4%)
Felső GI (+L4)	1/6 (16,6%)	3 (12,5%)	14 (28%)	17(23%)
Viselkedés (n=91)	n=9	n=30	n=61	
Nem sztenotizáló, nem penetráló (B1)	5/9 (55,5%)	19(63%)	35 (57,3%)	54 (59,3%)
Sztenotizáló (B2)	1/9 (11,1%)	5(16,6%)	9 (14,7%)	14 (15,3%)
Penetráló (B3)	3/9 (33,3%)	7(23,3%)	21(34,4%)	28 (30,7%)
Perianális betegség	2/9 (22,2%)	5/30 (16,6%)	17/61 (27,8%)	22/91 (24,1 %)
Gyakori relapszus	3/8 (37,5%)	3/29 (44,8%)	20/56 (35,7%)	33/85 (38,8 %)
Artritisz	2/9 (22,2%)	3/30 (10%)	13/59 (22%)	16/89 (18%)
Okuláris manifesztáció	0/9 (0%)	0/30 (0%)	1/59 (1,7%)	1/89 (1,1%)
Kután manifesztáció	1/8 (12,5%)	4/30 (13,3%)	8/59 (13,6%)	12/89 (13,5%)
PSC*	1/9 (11,1%)	3/30 (10%)	8/59 (13,6%)	11/89 (12,3%)
Szteroid adás//refrakter	5/9 (55,5%)// 1/7 (14,2%)	25/30 (83,3%)// 5/28 (17,8%)	56/61 (91,8%)// 13/59 (22%)	81/91 (89%)// 18/87 (20,7%)
Azatioprin használat	6/9 (66,6%)	24/30 (80%)	46/59 (78%)	69/88 (78,4%)
Sebészi /multiplex sebészi beavatkozás	2/9 (22,2%)//0/9 (0%)	2/30 (6,6%)//0/30 (0%)	4/59 (6,8%)// 1/59 (1,7%)	6/89 (6,7%)// 1/89 (1,1%)
Infliximab adás (n=22)	1/9 (4,5%)	6/30 (20%)	16/59 (27,1%)	22/107(20,6%)
ASCA (IgA vagy IgG) pozitivitás (n=89)	5/9 (55,5%)	18/27 (66,6%)	48/62 (77,4%)	66/89 (74,1%)

VII.1.5. A PAB, rPAB, GAB, ASCA és pANCA antitestek prevalenciája és összefüggésük az IBD fenotípusával (198)

A PAB, rPAB és GAB antitestek diagnosztikus pontosságát a **25. táblázat** mutatja be. A PAB és rPAB antitestek (IgA vagy IgG) jelenléte szignifikánsan magasabb volt CD-ben (34% és 35,9%) és UC-ben (20,4% és 24,5%) a kontrollhoz képest. Gyakorlati szempontból kiemelt jelentőségű, hogy a kombinációk alkalmazásával a teszt megbízhatósága jelentősen javult (a kombinációk értékeit vastagon szedve mutatom a 25. táblázatban). Tehát a PAB és/vagy ASCA/pANCA kombinált alkalmazása fokozta a szerológiai markerek szenzitivitását CD-ben (87,4%) és UC-ben (79,6%) is. A specificitás 89,3% és 93,2% volt. A pozitív prediktív értéket (PPV) 89,1%, illetve 93,2% -nak, a negatív prediktív értéket (NPV) 87,6%, illetve 82,2%-nak találtuk CD-ben, illetve UC-ben, kombinált markerek alkalmazása esetén. Szoros összefüggést figyeltünk meg a retikulogranuláris pankreász IIF mintázat és a CUZD1 transzfektált sejtek reaktivitása között (CD:26 eset, UC:8 eset), valamint a cseppszerű pankreász IIF mintázat és a GP2 reaktivitás között (CD:24 eset, UC:3 eset). Egy szérumban pozitív CUZD1 és 3 szérumban (CD:1, UC:2) pozitív GP2 reakciót adott, de nem mutatott reakciót a pankreász szövetekkel (198).

A **GAB antitestek** előfordulását szignifikánsan magasabbnak észleltük UC-ben, a CD-s és kontroll csoporthoz viszonyítva (UC:12,2%, CD:1,9%, kontroll:1,9%, $p<0,02$). Nem tudtunk összefüggést kimutatni a PAB, rPAB és GAB antitestek jelenléte, valamint a klinikai tünetek, a gyógyszeres kezelés vagy a sebészi terápia szükségessége között, sem CD-ben, sem UC-ben. CD-ben a PAB és rPAB pozitivitás ugyan magasabb volt ileokolikus (60% és 59,4%) és kolon (28,6% és 27%) érintettség esetén, mint az izolált ileális betegségben (11,4% és 13,5%), de a különbség nem érte el a szignifikancia határát (**26. táblázat**).

24. táblázat. Különböző szerológiai markerek diagnosztikus értéke a gyulladásos bélbetegségben (IBD) szenvedő gyermekekben. Vastagon szedve a gyakorlati jelentőséggel bíró kombinált alkalmazás.

CD: Crohn-betegség, UC: kolitisz ulceróza. *Az ASCA antitest diagnosztikus értéke a májérintettség nélküli UC-s betegekben.

		Szenzitivitás (%)	Specificitás (%)	PPV (%)	NPV (%)	P érték
CD vs. kontroll n=103	ASCA	72,8	95,2	93,8	77,8	<0,0001
	PAB	34,0	100	100	60,2	<0,0001
	rPAB	35,9	100	100	60,9	<0,0001
	pANCA	33,0	94,2	85,1	58,4	<0,0001
	GAB	1,9	98,1	50,0	50,0	1,0000
	PAB és/vagy ASCA és/vagy pANCA	87,4	89,3	89,1	87,6	<0,0001
UC vs. kontroll n=49	pANCA	77,5	94,2	93,0	80,9	<0,0001
	GAB	12,2	98,1	86,5	52,8	0,0196
	PAB	20,4	100	100	55,6	<0,0001
	rPAB	24,5	100	100	57,0	<0,0001
	ASCA	26,5	95,2	84,7	56,4	0,0014
	ASCA*	16,3	95,2	77,3	53,2	0,4419
	PAB és/vagy pANCA	79,6	94,2	93,2	82,2	<0,0001

25. táblázat. PAB és rPAB pozitivitás (%) összefüggése a betegség lokalizációjával (L) és viselkedésével (B) Crohn-beteg gyermekekben.

	PAB+ (%) n=35	PAB- (%) n=68	rPAB+ (%) n=37	rPAB- (%) n=66
Lokalizáció				
Ileum (L1)	4 (11,4%)	13 (19,1%)	5 (13,5%)	12 (18,2%)
Kolon (L2)	10 (28,6%)	20 (29,4%)	10 (27%)	20 (30,3%)
Ileokolon (L3)	21 (60%)	35 (51,5%)	22 (59,4%)	34 (51,5%)
Felső GI (+L4)	8 (22,9%)	16 (23,5%)	9 (24,%)	15 (22,7%)
Viselkedés				
Gyulladásos (B1)	22 (62,9%)	41 (60,3%)	23 (62,1%)	40 (60,6%)
Sztenotizáló (B2)	7 (20%)	11 (16,2%)	7 (18,9%)	11 (16,6%)
Penetráló (B3)	6 (17,1%)	21 (31%)	7 (18,9%)	20 (30,3%)

Az ASCA és pANCA antitestek diagnosztikus pontossága és összefüggésük az IBD fenotípusával (198)

A pankréász- és kehelysejt ellenes antitesteken kívül, a korábban már más vizsgálatokban elemzett ASCA és pANCA antitestek prevalenciáját is meghatároztuk.

A 103 CD-s betegből 72,8% volt ASCA pozitív (IgA és/vagy IgG pozitivitás). Az ASCA antitestek jelenléte szignifikánsan magasabb volt CD-ben (72,8%), mint az UC-s (26,5%) és a kontroll gyermekekben (4,85%). Az ASCA pozitivitás összefüggést mutatott a szövődményes betegséggel [sztenotizáló ($p=0,02$) és/vagy penetráló viselkedés ($p=0,0003$)], valamint a perianális érintettséggel ($p=0,01$) CD-ben. Nem tudtunk kapcsolatot igazolni az ASCA antitestek jelenléte és a CD lokalizációja, a gyógyszeres kezelés, a sebészi beavatkozás szükségessége és az extraintesztinális manifesztációk között. Az ASCA antitest válaszok száma (0, 1 vagy 2) pozitív összefüggést mutatott a sztenotizáló (B2), a penetráló (B3) és a perianális betegség, valamint az ileokolikus érintettség (L3) előfordulási gyakoriságával, míg inverz korrelációt mutatott a tisztán gyulladáshoz (B1) betegséggel. ASCA pozitivitást 13 UC-s betegben (26,5%) detektáltunk, közülük 7 betegnél primer szklerotizáló kolangitisz (PSC) állt fenn (ez lehet a magyarázata a magas ASCA arálynak, lásd diszkusszió).

A pANCA antitestek előfordulása 77,5% volt UC-ben, és 33% CD-ben. A pANCA jelenléte nem mutatott kapcsolatot az IBD fenotípusával, a gyógyszeres kezeléssel vagy az extraintesztinális tünetekkel, sem CD-ben, sem UC-ben.

VII.1.6. A TLR2, TLR3 és TLR4 expressziójának vizsgálata krónikus gyulladáshoz (IBD-s) gyermekek kolon nyálkahártyájában (199)

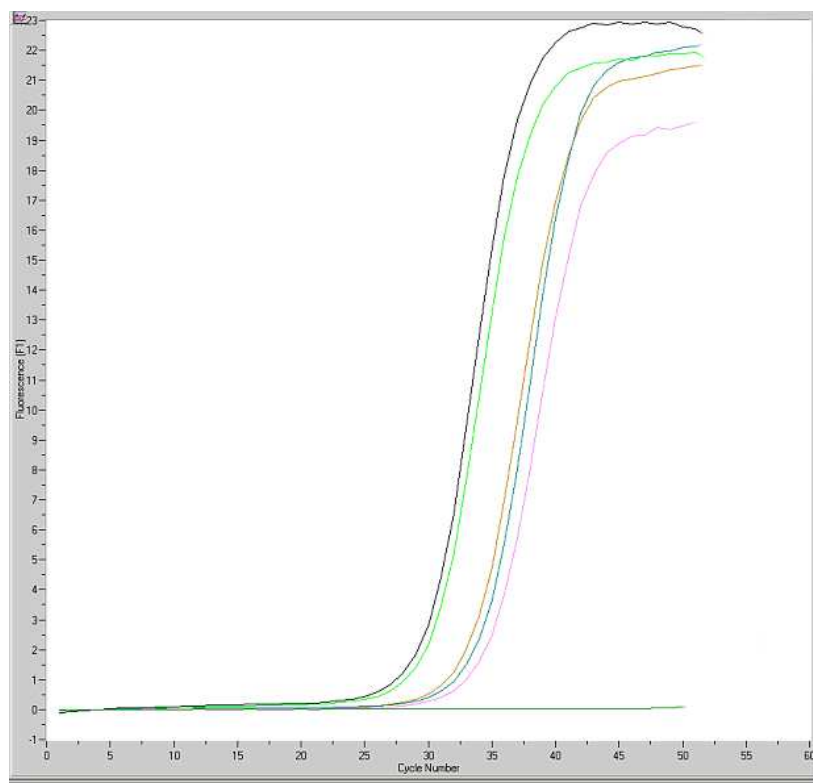
A TLR2, TLR3 és TLR4 mRNS expresszió változásai IBD-s gyermekek kolon nyálkahártyájában

A TLR2, TLR3 és TLR4 mRNS expresszióját SYBR Green alapú real time RT-PCR segítségével határoztuk meg a frissen diagnosztizált (fd) IBD-s, valamint a kezelt, relapszusban lévő (r) IBD-s gyermekek és a kontrollok kolon biopsziás mintáiban (**14. ábra**). A CD-s és UC-s gyermekek kolon nyálkahártyájának TLR2, TLR3 és TLR4 mRNS expressziójában nem volt különbség, ezért az eredmények tárgyalásakor összefoglalóan IBD-ként veszem őket figyelembe.

A **TLR2 mRNS** expresszió szignifikánsan fokozódott mind az fdIBD-s, mind az rIBD-s gyermekek kolon nyálkahártyájának gyulladásban lévő szakaszán, a kontrollhoz képest ($p<0,001$, illetve $p<0,0001$ vs. kontroll). A gyulladásban nem lévő kolon szakaszokon, a

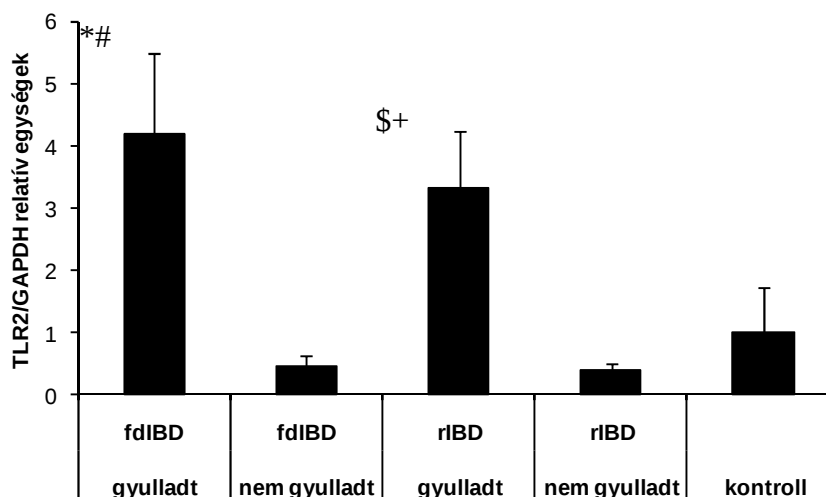
TLR2 mRNS expresszió nem tért el szignifikánsan a kontrolltól, sem az fdIBD-s, sem az rIBD-s gyermekekben ($p=NS$). A TLR2 mRNS expresszió nem különbözött szignifikánsan az fdIBD-s, illetve az rIBD-s gyermekek között, sem a kolon gyulladásban lévő, sem a gyulladásban nem lévő szakaszán (15. ábra).

A **TLR3 mRNS** expresszió nem változott szignifikánsan az egyes csoportokban.



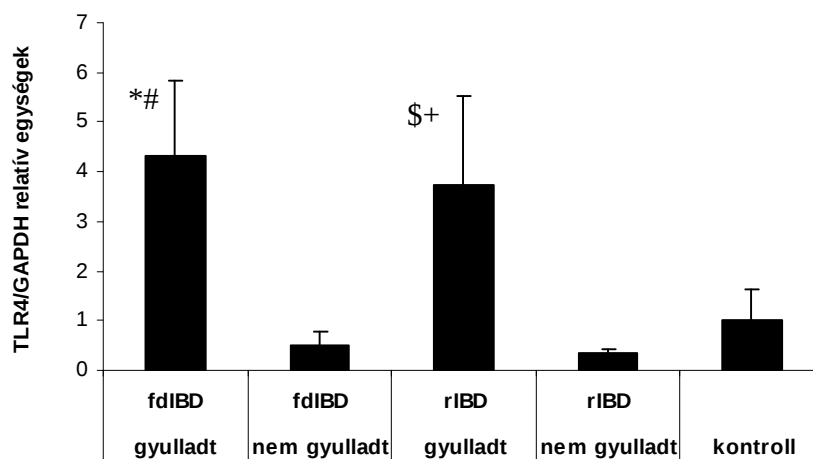
14. ábra. A TLR2 mRNS expresszió SYBR Green alapú real time RT-PCR-rel történő kimutatásának egy reprezentatív képe.

Jól látható, hogy a frissen diagnosztizált (fd) IBD-s gyermeknek a gyulladásban lévő területéről vett kolon biopsziás mintájából izolált cDNS-e a 30,14., a relapszusban lévő (r) IBD-s gyermeknek a gyulladásban lévő területéről származó kolon biopsziás mintájából izolált cDNS-e a 30,6., a kontroll kolon biopsziás mintából izolált cDNS a 33,74., illetve az fdIBD-s és rIBD-s gyermekeknek a gyulladásban nem lévő területéről vett kolon biopsziás mintáiból izolált cDNS-ei a 34,53., valamint a 35,07. ciklusban léptek az amplifikáció exponenciális fázisába. A negatív kontroll amplifikációja nem indult meg a real time RT-PCR során. Rövidítések: fdIBD: frissen diagnosztizált IBD, rIBD: relapszusban lévő IBD.



15. ábra. A TLR2 mRNS expressziójának változása a frissen diagnosztizált (fd) IBD-s, illetve a kezelt, relapszusban lévő (r) IBD-s gyermekek, valamint a kontrollok kolon nyálkahártyájában.

* fdIBD gyulladt vs. fdIBD nem gyulladt ($p < 0,0001$), # fd IBD gyulladt vs. kontroll ($p < 0,001$), \$ rIBD gyulladt vs. rIBD nem gyulladt ($p < 0,0001$), + rIBD gyulladt vs. kontroll ($p < 0,0001$). Rövidítések: fdIBD: frissen diagnosztizált, rIBD: relapszusban lévő IBD.



16. ábra. A TLR4 mRNS expressziójának változása a frissen diagnosztizált (fd) IBD-s, illetve a kezelt, relapszusban lévő IBD-s gyermekek, valamint a kontrollok kolon nyálkahártyájában.

* fdIBD gyulladt vs. fdIBD nem gyulladt ($p < 0,0001$), # fd IBD gyulladt vs. kontroll ($p < 0,001$), \$ rIBD gyulladt vs. rIBD nem gyulladt ($p < 0,0001$), + rIBD gyulladt vs. kontroll ($p < 0,0001$). Rövidítések: fdIBD: frissen diagnosztizált IBD, rIBD: relapszusban lévő IBD.

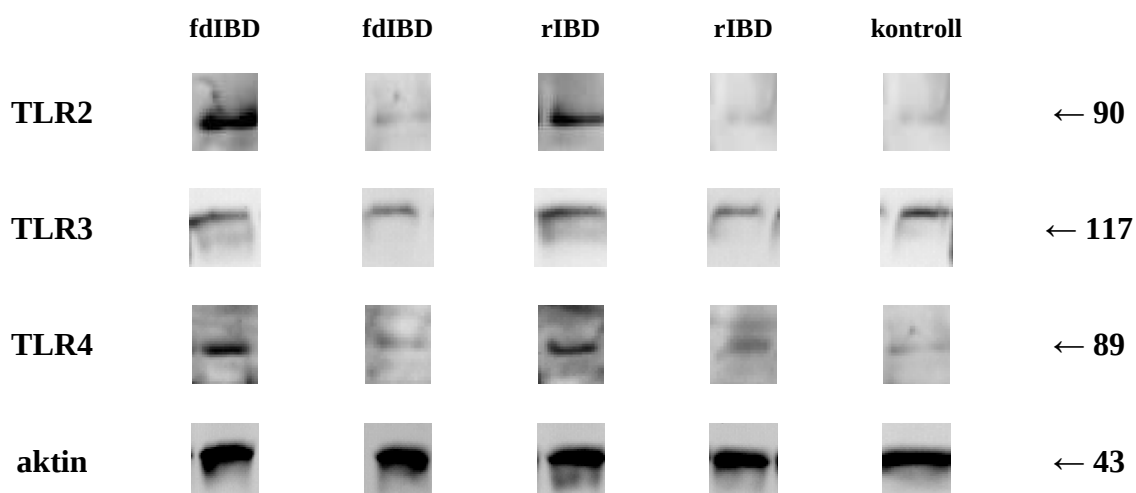
A **TLR4 mRNS** expresszió a TLR2-höz hasonlóan, szignifikánsan fokozódott, mind az fdIBD-s, mind az rIBD-s gyermekek kolon nyálkahártyájának gyulladásban lévő szakaszán ($p < 0,001$, illetve $p < 0,0001$ vs. kontroll). A gyulladásban nem lévő kolon szakaszokon a TLR4 fehérje szint nem tért el szignifikánsan a kontrolltól, sem az fdIBD-s, sem az rIBD-s gyermekekben. A TLR4 mRNS expresszió nem különbözött szignifikánsan az fdIBD-s, illetve az rIBD-s gyermekek között, sem a kolon gyulladásban lévő, sem a gyulladásban nem lévő szakaszán (**16. ábra**).

A TLR2, TLR3 és TLR4 fehérjeszintek változásai IBD-s gyermekek kolon nyálkahártyájában

A frissen diagnosztizált (fd) IBD-s, valamint a kezelt, relapszusban lévő (r) IBD-s gyermekek és kontrollok kolon biopsziás mintáinak Western blot analízise során 90 kDa-nál (TLR2), 117 kDa-nál (TLR3), 89 kDa-nál (TLR4), illetve 43 kDa-nál (aktin) detektáltunk jelet (**17. ábra**). A CD-s, illetve az UC-s gyermekek kolon nyálkahártyájának TLR2, TLR3 és TLR4 fehérje szintjeiben nem volt különbség, ezért az eredmények tárgyalásakor összefoglalóan IBD-ként veszem őket figyelembe. A kontroll gyermekek kolon nyálkahártyájában TLR2 fehérje csak minimális mennyiségben volt. A TLR2 fehérjeszint (**18. ábra**) közel kilencszeresére (8,93) nőtt az fdIBD-s gyermekek, és közel 8,5-szeresére nőtt az rIBD-s gyermekek kolon nyálkahártyájának gyulladásban lévő szakaszán, a kontrollhoz képest ($p < 0,001$, ill. $p < 0,0001$ vs. kontroll). A gyulladásban nem lévő kolon szakaszokon, a TLR2 fehérjeszint nem tért el szignifikánsan a kontrolltól, sem az fdIBD-s, sem az rIBD-s gyermekekben. A TLR2 fehérjeszint nem különbözött szignifikánsan az fdIBD-s, illetve az rIBD-s gyermekek között, sem a kolon gyulladásban lévő, sem a gyulladásban nem lévő szakaszán.

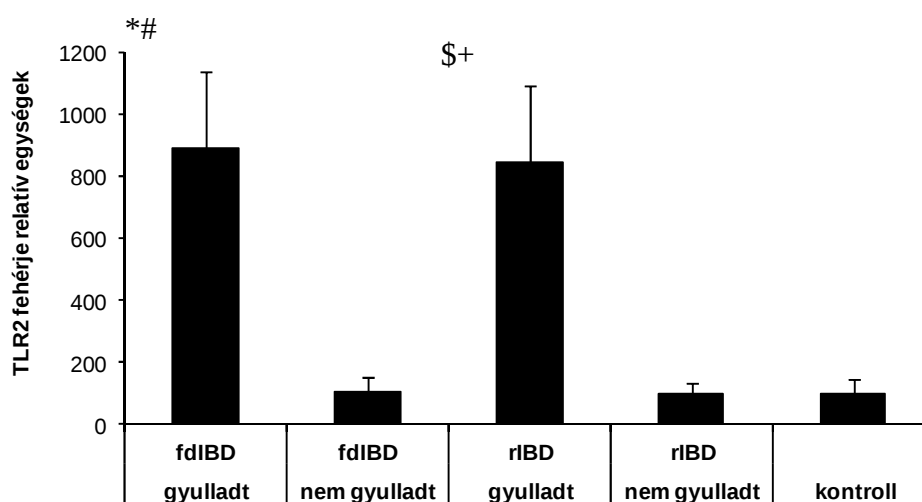
A **TLR3 fehérjeszint** nem változott szignifikánsan az egyes csoportokban.

A TLR2-höz hasonlóan, TLR4 fehérjét is csak minimális mennyiségben tudtunk kimutatni a kontrollok kolon nyálkahártyájában. A **TLR4 fehérjeszint** (**19. ábra**) közel ötszörösére (4,97) nőtt az fdIBD-s gyermekek, és közel 4,5-szörösére az rIBD-s gyermekek kolon nyálkahártyájának gyulladásban lévő szakaszán ($p < 0,001$, ill. $p < 0,0001$ vs. kontroll). A gyulladásban nem lévő kolon szakaszokon, a TLR4 fehérjeszint nem tért el jelentősen a kontrolltól, sem az fdIBD-s, sem az rIBD-s gyermekekben. A TLR4 fehérjeszint nem különbözött szignifikánsan az fdIBD-s, illetve az rIBD-s gyermekek között, sem a kolon gyulladásban lévő, sem a gyulladásban nem lévő szakaszán.



17. ábra. A TLR2, TLR3 és TLR4 fehérjeszintek változása a frissen diagnosztizált, illetve a kezelt, relapszusban lévő IBD-s gyermekek, valamint a kontrollok kolon nyálkahártyájában (reprezentatív ábra).

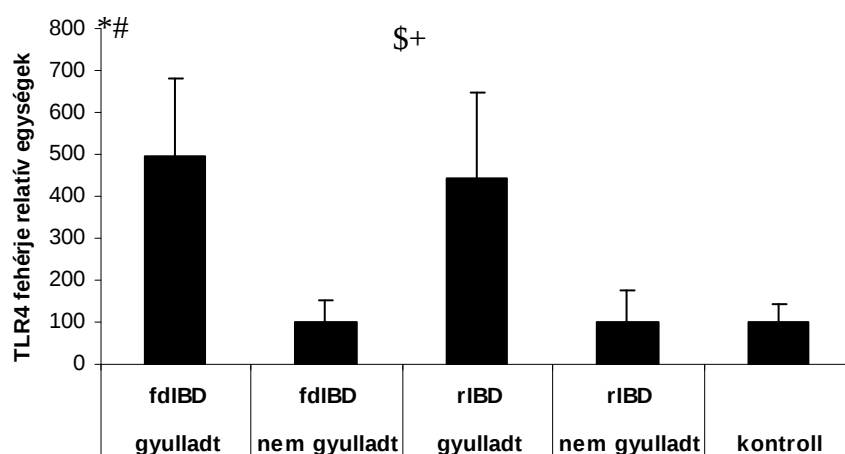
Rövidítések: fdIBD: frissen diagnosztizált IBD, rIBD: relapszusban lévő IBD.



18. ábra. A TLR2 fehérje szintjének változása a frissen diagnosztizált, illetve a kezelt, relapszusban lévő IBD-s gyermekek, valamint a kontrollok kolon nyálkahártyájában.

*fdIBD gyulladt vs. fdIBD nem gyulladt ($p < 0,001$), # fd IBD gyulladt vs. kontroll ($p < 0,001$), \$ rIBD gyulladt vs. rIBD nem gyulladt ($p < 0,0001$), + rIBD gyulladt vs. kontroll ($p < 0,0001$).

Rövidítések: fdIBD: frissen diagnosztizált IBD, rIBD: relapszusban lévő IBD.



19. ábra. A TLR4 fehérje szintjének változása a frissen diagnosztizált, illetve a kezelt, relapszusban lévő IBD-s gyermekek, valamint a kontrollok kolon nyálkahártyájában.

* fdIBD gyulladt vs. fdIBD nem gyulladt ($p < 0,001$), # fd IBD gyulladt vs. kontroll ($p < 0,001$), \$ rIBD gyulladt vs. rIBD nem gyulladt ($p < 0,0001$), + rIBD gyulladt vs. kontroll ($p < 0,0001$). Rövidítések: fdIBD: frissen diagnosztizált IBD, rIBD: relapszusban lévő IBD.

VII.1.7. Az iAP expressziójának vizsgálata gyulladásos bélbetegségben szenvedő (IBD-s) gyermekek kolon nyálkahártyájában (200)

Az iAP mRNS expressziójának változása gyulladásos bélbetegségben szenvedő (IBD-s) gyermekek vastagbél nyálkahártyájában

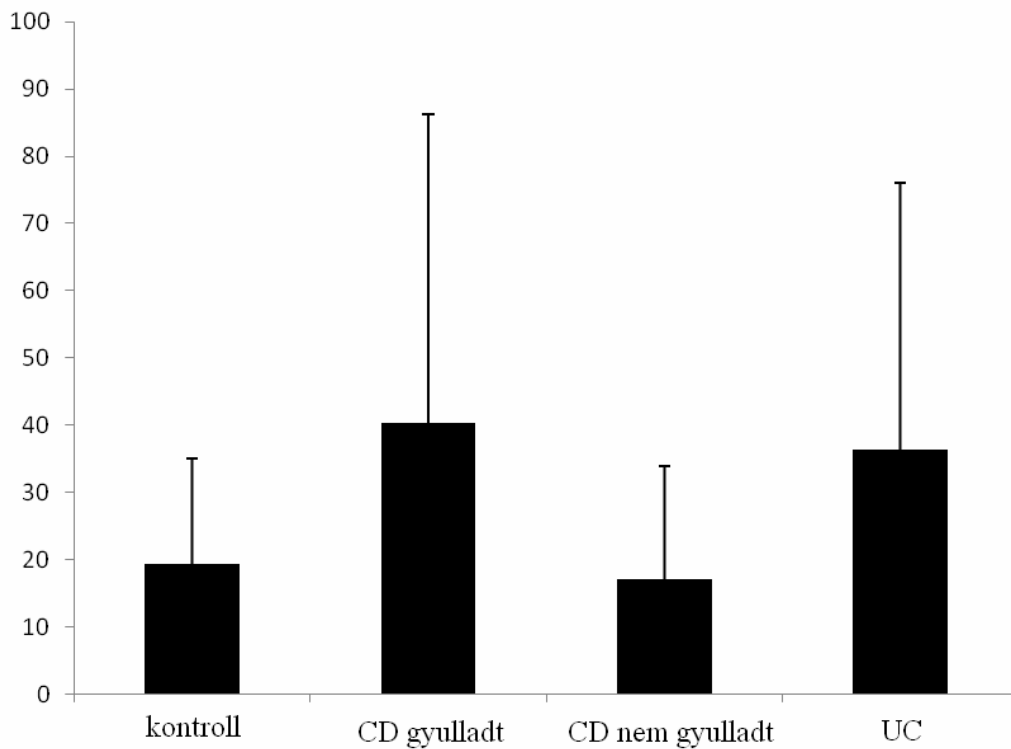
Az iAP mRNS expresszióját SYBR Green alapú real time RT-PCR segítségével határoztuk meg az újonnan diagnosztizált CD-s gyermekek gyulladt és nem gyulladt, UC-s gyermekek gyulladt kolon nyálkahártyájában, kontroll gyermekek vastagbeléből származó biopsziás mintákkal összehasonlítva.

Az iAP mRNS expressziója nem különbözött szignifikánsan a CD-s és UC-s gyermekek gyulladt kolon nyálkahártyájában az egészséges kontrollhoz, valamint a CD-s gyermekek nem gyulladt vastagbél mintáihoz viszonyítva (**20. ábra**).

Az iAP proteinszintek gyulladásos bélbetegségben szenvedő (IBD-s) gyermekek kolon nyálkahártyájában

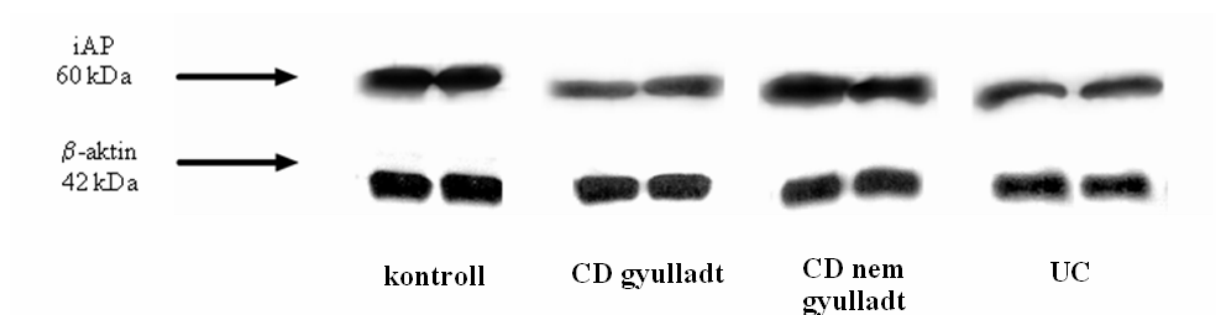
Az újonnan diagnosztizált CD-s betegek gyulladt és nem gyulladt-, valamint UC-s betegek

gyulladt vastagbél mukózájából származó biopsziás mintáknak, és kontroll gyermekek vastagbél biopsziás mintáinak Western blot analízise során 60 kDa-nál az iAP, 43 kDa-nál a β -aktin jelet detektáltuk (21. ábra).



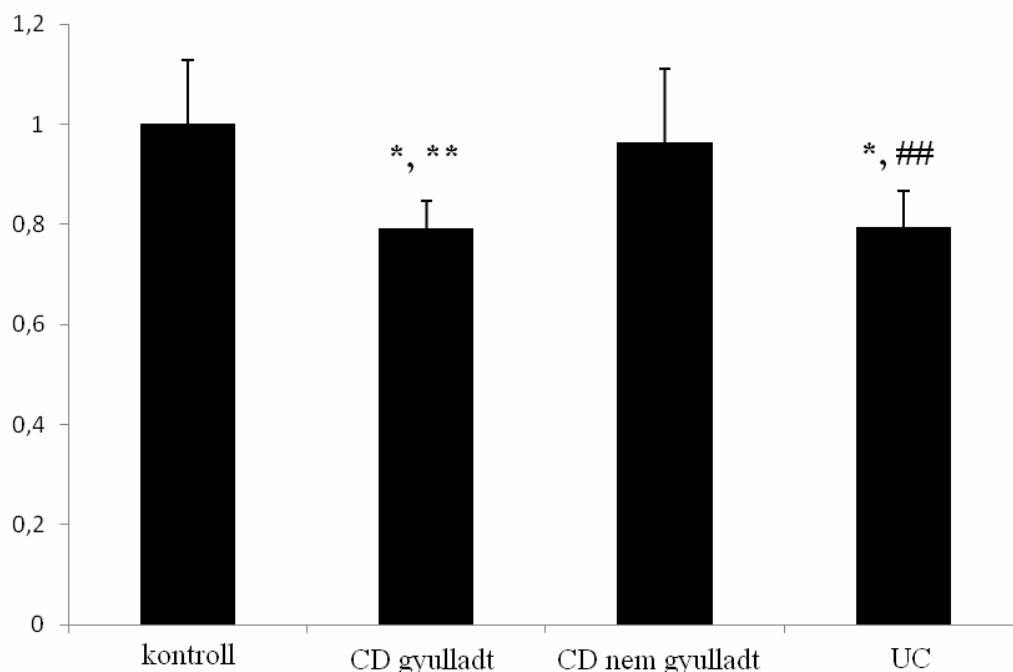
20. ábra. Az iAP mRNS expressziós változása kontrollok, Crohn-beteg (CD) gyermekek gyulladt és nem gyulladt, valamint kolitisz ulcerózas (UC) gyermekek gyulladt kolon nyálkahártyájában (real time-PCR).

Az iAP mRNS expresszió nem mutatott szignifikáns eltérést a vizsgált csoportokban ($p=NS$). Az „y” tengelyen iAP/GAPDH relatív egység.



21. ábra. Az iAP fehérjeszintek reprezentatív eredményei a kontrollok, Crohn-beteg (CD) gyulladt és nem gyulladt, valamint kolitisz ulcerózas (UC) gyermekek gyulladt kolon nyálkahártyájában (Western blot).

Az iAP fehérjeszintek a CD-s és az UC-s gyermekek gyulladt bélszakaszában szignifikáns csökkenést mutattak a kontrollhoz viszonyítva. Továbbá a CD-s, és az UC-s gyermekek gyulladt bélnyálkahártyájában szignifikánsan csökkent iAP értéket detektáltunk, a CD-s gyermekek nem gyulladt bélszakaszához képest (** $p < 0,05$), ($^{##}p < 0,01$). Az iAP fehérjeszint nem különbözött szignifikánsan a CD-s gyermekek nem gyulladt vastagbél nyálkahártyájában a kontrollokhoz képest (22. ábra).



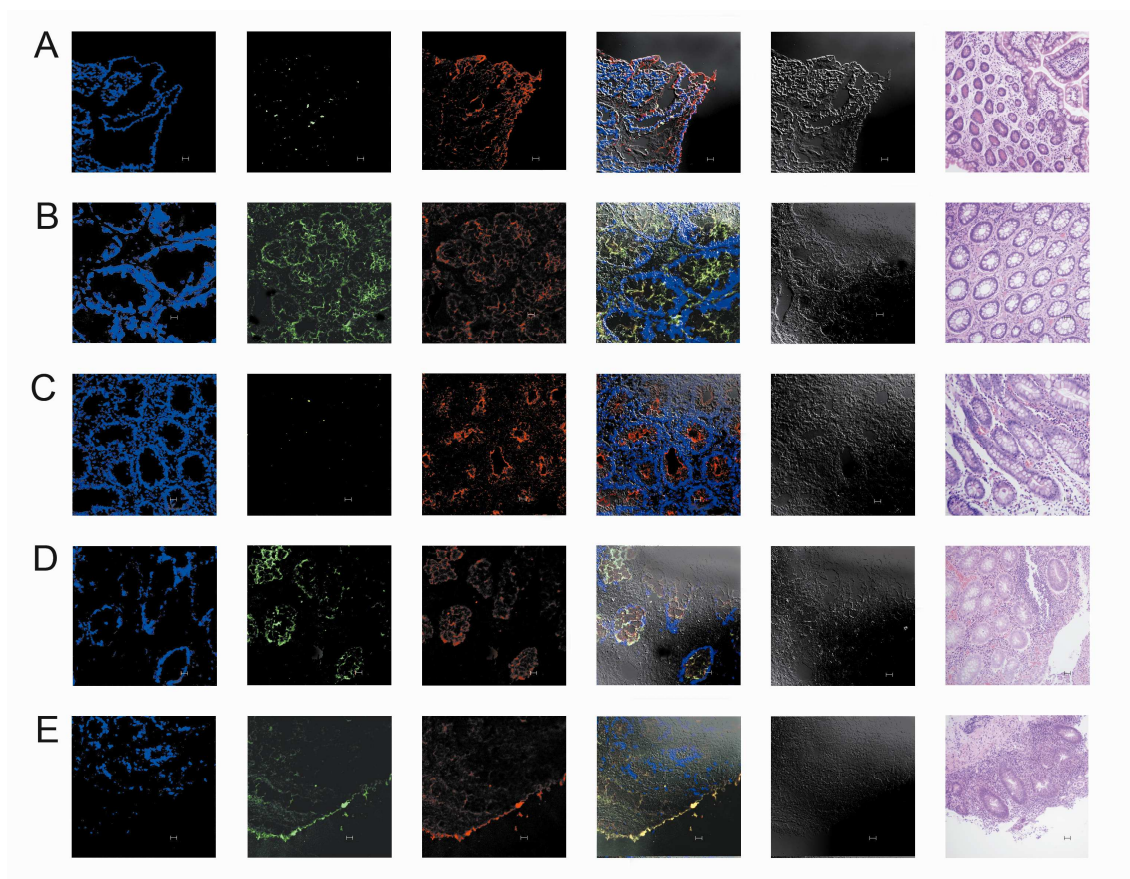
22. ábra. Az iAP fehérjeszintek változása a kontrollok, Crohn-beteg gyermekek (CD) gyulladt és nem gyulladt, valamint kolitisz ulcerózus (UC) gyermekek gyulladt kolon nyálkahártyájában.

Az „y” tengelyen iAP fehérje relatív egység. A CD-s és UC-s gyermekek gyulladt bélnyálkahártyájában az iAP fehérjeszint szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest (* $p < 0,05$), ($^{#}p < 0,01$). Szintén szignifikáns volt a csökkenés a CD-s gyulladt és UC-s gyulladt bélszakaszokban a CD-s nem gyulladt területekhez képest (** $p < 0,05$), ($^{##}p < 0,01$).

Az iAP és TLR4 lokalizációjának vizsgálata gyulladással járó bélbetegségben szenvedő (IBD-s) gyermekek terminális ileumból és kolonból származó nyálkahártyájában

Az iAP kizárólag a terminális ileum és kolon epiteliális felszínén mutatott erős festődést mindegyik vizsgált csoportban. Az iAP nem mutatott festődési különbséget a CD-s betegek gyulladt és nem gyulladt kolon nyálkahártyája, a CD-s gyulladt terminális ileum és kolon nyálkahártyák, valamint a CD-s és UC-s gyulladt kolon nyálkahártyák között. Nem detektáltunk fluoreszcens jelet a Lieberkühn-kripták sejtjeiben, a kehelysejteken és a lamina

propria immunsejtjeiben. Az iAP és a TLR4 együttes jelenléte pontszerű, erőteljes jelet adott. A vizsgált csoportok között festődési különbség nem volt. Kiemelendő, hogy a TLR4 mindhárom vizsgált csoport kolonból származó metszetein erősebb jelet adott, mint a kontroll és a CD-s terminális ileumban (23. ábra).



23. ábra. Az iAP és TLR4 lokalizációja Crohn-beteg (CD), kolitisz ulcerózáss (UC) és kontroll gyermekek terminális ileum és kolon nyálkahártyájában.

Immunfluoreszcens (anti-iAP és anti-TLR4 antitest felhasználásával) és hematoxin-eozin festéssel történt a terminális ileumból és kolonból származó metszetek jelölése. Mindhárom vizsgált csoportban az iAP (piros) és a TLR4 (zöld) kizárólag az epitélfelszínre lokalizálódott: az egészséges kontrollok terminális ileumában (A), a CD-s betegek terminális ileumában (B), a kontrollok kolonjában (C), a CD-s betegek gyulladt (D) és az UC-s betegek gyulladt (E) kolon mukózájában. A sárga szín („merge”: együttes reakció, kolokalizáció) az iAP és TLR4 kolokalizációját (piros és zöld szín egymásra vetülését) mutatja, a kék szín a sejtmagot jelzi; 20x nagyítás.

VII.1.8. Immunfenotípusos elemzés aktív és remisszióban levő CD-s gyermekekben (201)

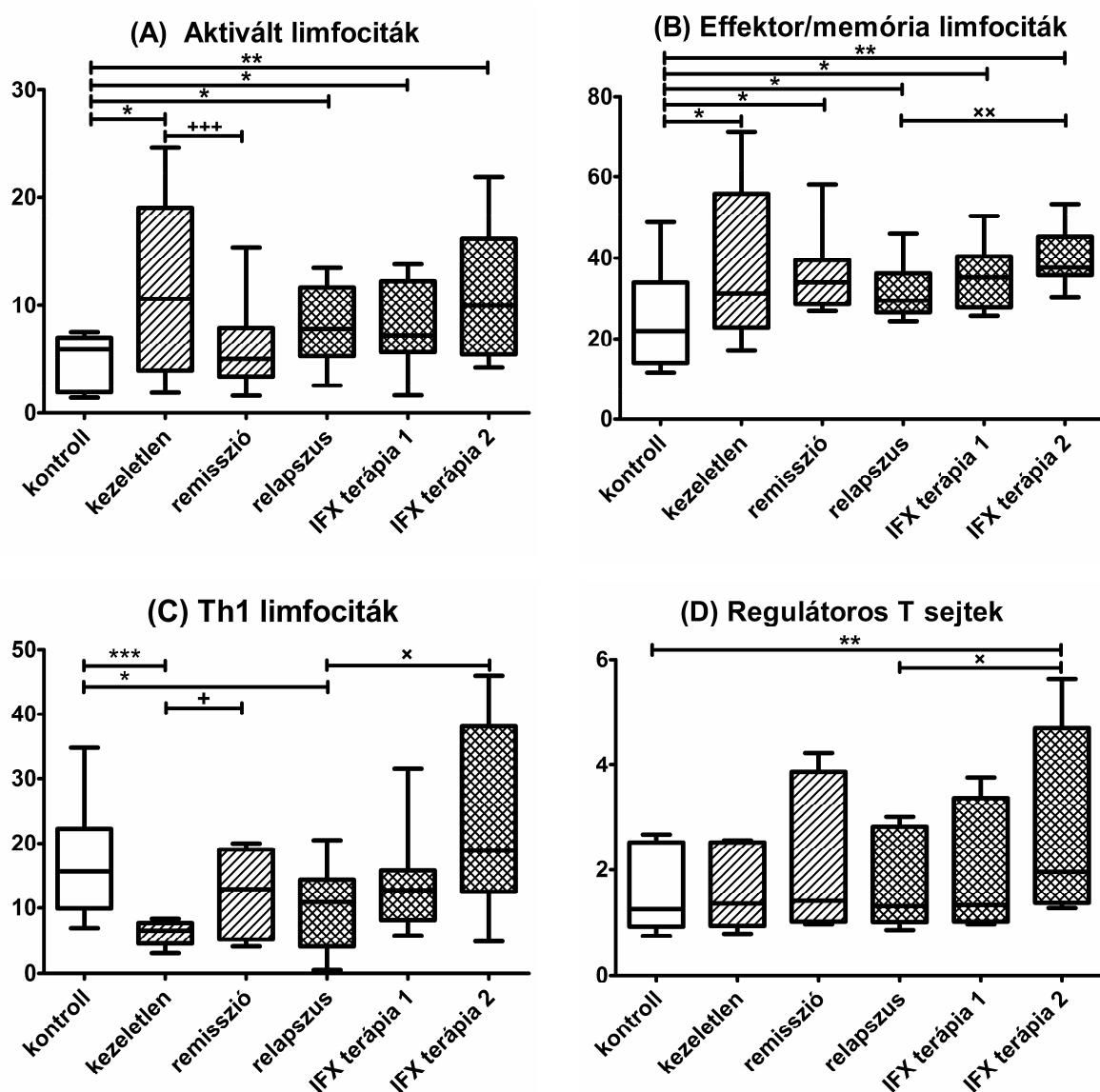
Az immunfenotípusos vizsgálatban számos olyan sejttípust elemeztünk, amely a természetes és adaptív immunitás fontos elemeként egymással bonyolult, sokrétű kapcsolatban áll. Kutatásunk **első részében** összehasonlítottuk a **kezeletlen betegek** és a **kontrollok** immunfenotípusát. **CD-s betegekben** az adaptív immunitás sejtes elemei közül az aktivált ($CD4^+CD25^+$) sejtek prevalenciája magasabb volt. Ezzel együtt a Th1 elkötelezett sejtek ($CD4^+CXCR3^+$) aránya csökkent, így a Th1/Th2 arány Th2 irányba tolódott el ebben a populációban. Az effektor vagy memória sejtek ($CD4^+CD45RO^+$) prevalenciája megnőtt, így a naív/mémória sejtek arányában eltolódás volt a memória sejtek irányába. A Treg sejtek ($CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$) aránya ugyanakkor nem különbözött a beteg és egészséges csoport között, de jelentős különbségek voltak a veleszületett immunitás fenotípusában. Az NK ($CD3^-CD161^+$) és az NKT ($CD3^+6b11^+$) sejtek prevalenciája alacsonyabb volt az új CD-s gyermekekben. Az APC sejtek aránya szintén különbözött a két csoport között. A DC-k ($Lin1^-HLA-DR^+$) és ezen belül az mDC-k ($CD11c^+$) prevalenciája magasabb volt, míg a pDC-k ($CD123^+$) prevalenciája alacsonyabb, a terápiát még nem kapó, új CD-s betegekben. Így az mDC/pDC arányban eltolódás volt az mDC-k irányába. A perifériás monociták ($CD14^+$) száma magasabb volt CD-s betegekben, mint a kontroll populációban. Továbbá, mind a DC-k, mind a monociták esetében magasabb volt a TLR2 és TLR4 expresszió a frissen diagnosztizált, kezeletlen betegekben, az egészségesekhez képest. Kimelésre érdemes, hogy a 14 kezeletlen gyermekből 4 gyermek nem reagált a hagyományos terápiára, és ezekben a gyermekekben az immunfenotípus nem különbözött a terápiára reagálókétól.

A vizsgálat **második fázisában** az immunfenotípus **hagyományos kezelésre** történő változását figyeltük meg prospektíven. Az első remisszió alkalmával az adaptív immunitásban a Th1/Th2 arány a Th1 felé tolódott és normalizálódott az aktivált T sejtek prevalenciájával együtt. A memória T sejtek aránya emelkedett szinten maradt, míg a többi adaptív immunsejté nem változott a kezelés előtti szinthez képest. A veleszületett immunitás elemei közül az NK és NKT sejtek előfordulása alacsony, míg a DC-k prevalenciája magasabb maradt a kontrollokéhoz képest. Ugyanakkor, mind az mDC/pDC arány, a monocita, TLR2 és TLR4 expresszió normális volt ezekben a betegekben, a kontrollokkal összehasonlítva.

26. táblázat. Az adaptív immunitás sejtes elemeinek prevalenciája Crohn-beteg gyermekekben.

Az adatok medián (IQR) formátumban vannak megadva. Rövidítések: IFX: infliximab, PBMC: perifériás vér mononukleáris sejtek, aktivált (CD25+), naív (CD45RA+), effektor (CD45RO+), Th1 (T helper 1 elkötelezett, CXCR3+), Th2 (T helper 2 elkötelezett, CCR4+), Treg (regulátoros T sejt, CD25^{hi}FoxP3+). Statisztika: vs. kontroll: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,01; vs. kezeletlen: +p<0,05, +++p<0,01; vs. relapszus: ×p<0,05, ××p<0,01.

sejt prevalencia a jelzett populációban	kontroll	kezeletlen (hagyományos terápia előtt)	első remisszió (hagyományos terápiára)	relapszus (IFX terápia előtt)	IFX terápia (2. adag előtt)	IFX terápia (3. adag előtt)
n (fiú/lány)	15 (6/9)	14 (6/8)	10 (4/6)		12 (5/7)	
PBMC-ben CD4⁺	35,16 [24,81- 47,79]	36,52 [18,61- 44,06]	37,42 [22,27- 44,26]	39,12 [24,15- 51,18]	39,77 [27,71- 50,30]	35,65 [24,31- 48,81]
CD4⁺-ben aktivált	5,92 [2,39- 6,51]	10,61 [3,93- 19,04]*	5,03 [3,37- 7,93] ⁺⁺⁺	7,84 [5,30- 11,67]*	7,24 [5,67- 12,25]*	9,98 [5,45- 16,19]**
CD4⁺-ben naív	64,57 [59,86- 73,03]	63,36 [41,19- 74,86]	61,31 [39,09- 73,05]	66,31 [60,44- 71,79]	64,47 [53,90- 77,87]	58,11 [53,51- 64,96]
CD4⁺-ben effektor	21,91 [13,94- 33,96]	31,29 [22,80- 55,78]*	33,97 [28,54- 39,44]*	29,47 [26,54- 36,19]*	35,23 [27,74- 40,36]*	37,62 [35,74- 45,24]**, ××
naív / effektor arány	2,73 [1,60- 4,97]	1,57 [1,02- 2,54]*	1,43 [1,14- 2,21]*	2,34 [1,66- 2,68]	1,79 [1,47- 2,36]	1,52 [1,19- 1,74]*, ×
CD4⁺-ben Th1	16,19 [9,91- 25,26]	6,49 [4,50- 7,67] ^{***}	12,89 [5,12- 19,03] ⁺	10,90 [4,03- 14,38]*	12,73 [8,12- 15,81]	18,87 [12,51- 38,11] [×]
CD4⁺-ben Th2	4,59 [2,78- 5,51]	4,70 [1,98- 6,03]	5,06 [1,42- 8,48]	3,97 [2,27- 7,19]	4,61 [2,55- 5,65]	4,46 [2,11- 8,16]
Th1 / Th2 arány	3,98 [3,06- 5,12]	1,60 [0,50- 2,11] ^{***}	1,95 [0,43- 3,62] ^{**}	2,68 [0,85- 5,07]	2,68 [1,42- 6,14]	3,25 [1,37- 4,80] [×]
CD4⁺-ben Treg	1,25 [1,10- 2,37]	1,36 [1,09- 2,48]	1,41 [1,07- 3,50]	1,31 [1,16- 2,63]	1,33 [1,07- 2,99]	1,96 [1,47- 3,77]**, ×



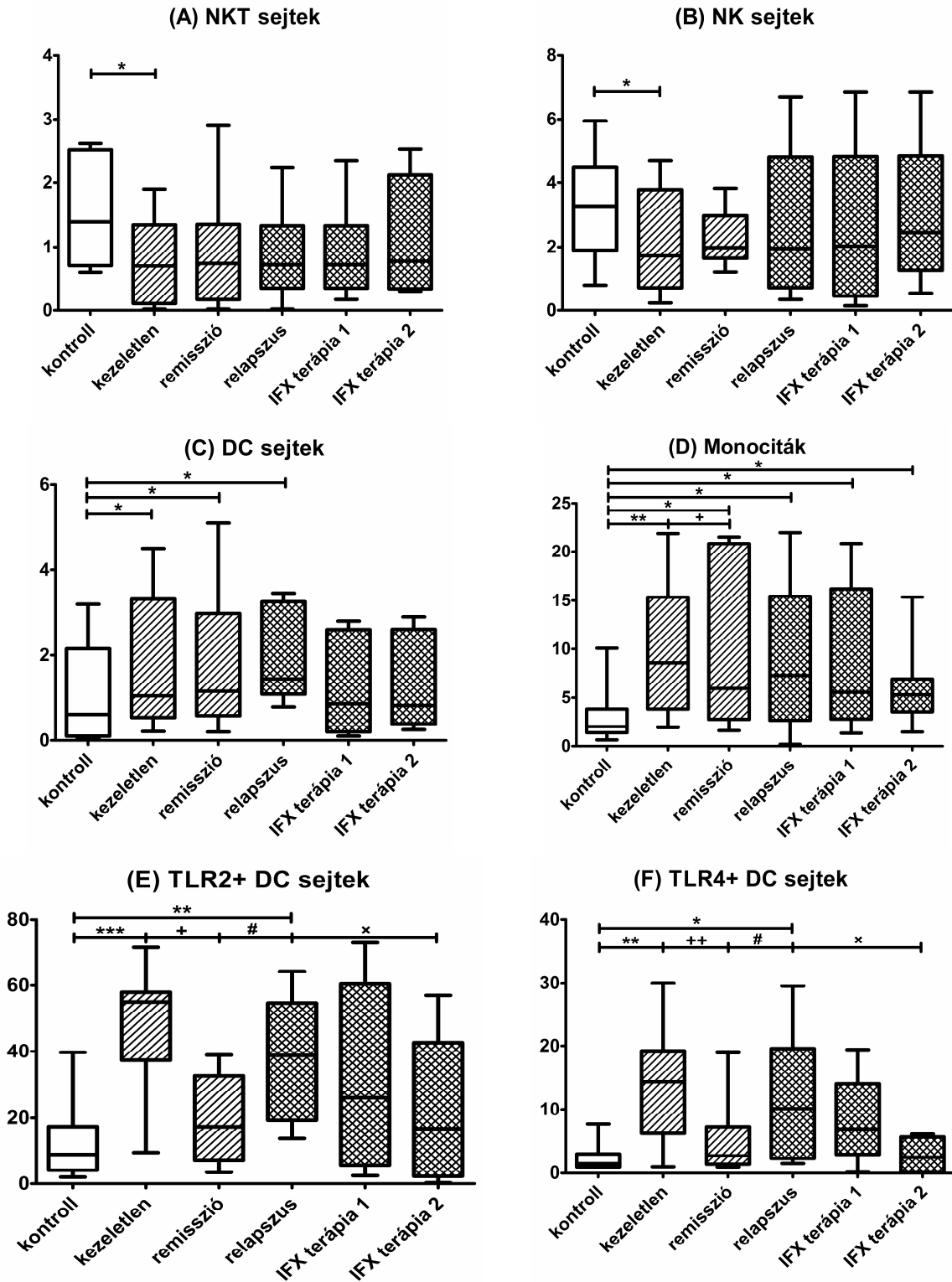
24. ábra. Az adaptív immunitás sejtes elemeinek prevalenciája Crohn-beteg gyermekekben.

Whiskers box-plot: középvonal a medián, a doboz az interkvartilisek, a bajusz a tartományt jelöli. (A) aktivált ($CD4^+CD25^+$), (B) effektor vagy memória ($CD4^+CXCR3^+$), (C) T helper 1 elkötelezett (Th1, $CD4^+CXCR3^+$) és (D) regulátoros T ($CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$) limfociták prevalenciája. Statisztika: vs. kontroll: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,01$; vs. kezeletlen: + $p < 0,05$, +++ $p < 0,01$; vs. relapszus: x $p < 0,05$, xx $p < 0,01$.

27. táblázat. A veleszületett immunitás sejteinek prevalenciája Crohn-beteg gyermekekben.

Az adatok medián (interkvartilis) formátumban vannak megadva. Rövidítések: IFX: infliximab, PBMC: perifériás vér mononukleáris sejtek, NKT (természetes ölő T sejt, CD3+6b11+), NK (természetes ölő sejt, CD3-CD161+), DC (dendritikus sejt, Lin1-HLA-DR+), mDC (mieloid DC, CD11c+), pDC (plazmocitoid DC, CD123+), monocita (CD14+), TLR2 (Toll-like receptor2), TLR4 (Toll-like receptor4). Statisztika: vs. kontroll: *p<0,05, **p<0,01; ***p<0,001; vs. kezeletlen: +p<0,05, ++p<0,01; vs. első remisszió: #p<0,05; vs. relapszus: ×p<0,05.

sejt prevalencia a jelzett populációban	kontroll	kezeletlen (hagyományos terápia előtt)	első remisszió (hagyományos terápiára)	relapszus (IFX terápia előtt)	IFX terápia (2. adag előtt)	IFX terápia (3. adag előtt)
n (fiú/lány)	15 (6/9)	14 (6/8)	10 (4/6)		12 (5/7)	
PBMC-ben	1,39	0,70	0,74	0,72	0,73	0,83
NKT	[0,81-2,42]	[0,11-1,33]*	[0,37-1,34]	[0,45-1,23]	[0,37-1,20]	[0,31-2,05]
PBMC-ben NK	3,17	1,73	1,98	1,95	2,14	
	[1,71-4,76]	[0,72-3,49]*	[1,65-2,97]	[0,72-4,81]	[0,66-4,78]	
PBMC-ben DC	0,61	1,05	1,16	1,45	0,86	0,82
	[0,10-2,15]	[0,54-3,32]*	[0,58-2,98]*	[1,09-3,46]*	[0,30-2,80]	[0,52-2,31]
DC-ben mDC	46,04	61,66	45,19	69,01	60,01	57,39
	[37,14-52,30]	[45,37-72,74]**	[37,83-56,68] ⁺	[40,11-74,79]*, #	[48,03-68,50]*	[37,19-64,14]*, ×
DC-ben pDC	27,38	19,26	21,61	18,33	19,03	27,39
	[20,65-33,94]	[15,08-24,58]*	[14,76-32,61]*	[16,59-26,42]*	[17,26-32,38]	[19,68-36,70] [×]
mDC / pDC arány	1,85	3,05	2,35	3,50	3,04	2,20
	[0,44-1,46]	[2,32-6,11]***	[1,80-9,10]**, +	[1,74-7,79]***	[2,03-4,65]***	[1,66-5,54]**, ×
DC-ben TLR2	8,80	55,08	17,32	38,70	25,89	16,70
	[4,14-17,35]	[37,27-57,94]***	[6,32-32,54] ⁺	[19,31-54,59]**, #	[5,69-60,43]	[2,29-42,61] [×]
DC-ben TLR4	2,24	14,36	2,73	10,11	5,31	3,32
	[0,90-2,78]	[6,26-19,20]**	[1,35-7,21] ⁺⁺	[2,29-19,55]*, #	[2,81-13,42]	[0,10-6,05] [×]
PBMC-ben monocita	2,01	8,57	5,96	7,30	5,58	5,31
	[1,38-3,82]	[3,82-16,72]**	[2,49-21,22]*, +	[2,65-15,44]*	[2,78-17,52]*	[3,54-6,94]*
Monocitában TLR2	16,44	29,65	20,92	20,63	19,89	18,52
	[10,31-19,69]	[17,83-39,77]*	[7,87-29,15] ⁺	[7,05-29,01]	[13,13-29,32]	[10,29-28,96]
Monocitában TLR4	7,17	14,59	4,43	10,39	8,26	6,30
	[0,45-14,73]	[3,01-35,23]*	[1,82-8,31] ⁺	[2,10-26,54]	[2,71-17,56]	[2,48-18,94]



25. ábra. A veleszületett immunitás sejtjes elemeinek prevalenciája Crohn-beteg gyermekekben.

Whiskers box-plot: középvonal a medián, a doboz az interkvartilisek, a bajusz a tartományt jelöli. (A) természetes ölő T sejtek (NKT, CD3⁺6b11⁺), (B) természetes ölő sejtek (NK, CD3⁺CD161⁺), (C) dendritikus sejtek (DC, Lin1⁺HLA-DR⁺), (D) monociták (CD14⁺), (E) Toll-like receptor2 expresszáló DC és (F) Toll-like receptor4 expresszáló DC-k prevalenciája. Statisztika: vs. kontroll: *p<0,05, **p<0,01; ***p<0,001; vs. kezeletlen: +p<0,05, ++p<0,01; vs. első remisszió: #p<0,05; vs. relapszus: ×p<0,05.

Azokban a gyermekekben, akik **relapszusban** maradtak a hagyományos terápia ellenére, az immunsejt fenotípus sokban hasonlított a kezeletlen CD-s értékekhez. Vagyis az **adaptív immunsejtek** közül ezekben a betegekben alacsonyabb Th1, magasabb aktivált T sejt prevalenciát figyeltünk meg. A **veleszületett immunfenotípus** tekintetében az aktív, relapszusos betegekben a magasabb monocita prevalencia, valamint a fokozott TLR2 és TLR4 expresszió szintén a kezeletlen betegekéhez volt hasonló. A relapszusban lévő betegekben az mDC-k, a TLR2 és TLR4-et expresszáló DC-k aránya magasabb volt az aktivitást nem mutató betegekhez képest.

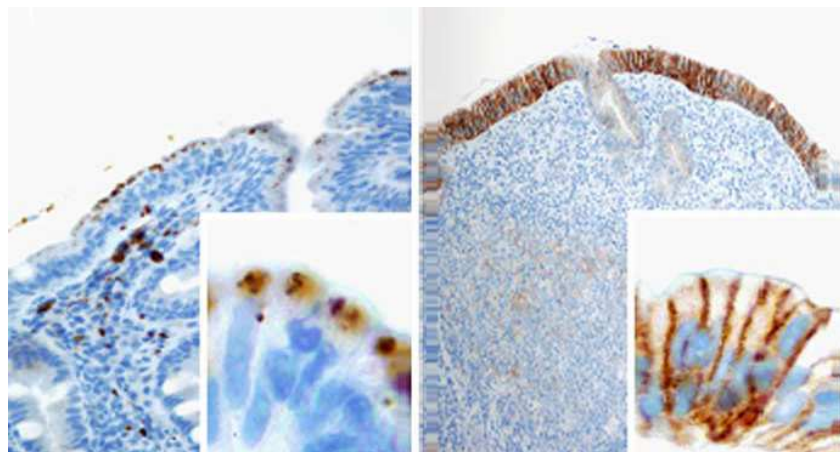
A hagyományos kezelésre nem javuló CD-s betegekben az **IFX terápia** hatását két időpontban határoztuk meg (terápia után 2 és 6 héttel). Az **adaptív sejtek** közül a Th1, aktivált T és Treg prevalencia emelkedett 6 hét után. A veleszületett immunitás elemei közül a DC, mDC, pDC, monocita és a TLR2 és TLR4-et expresszáló DC-k és monociták prevalenciája normalizálódott a kezelés hatására. Megjegyzendő, hogy 2 hét kezelés után szignifikáns eltéréseket nem, de a fent részletezettekhez hasonló tendenciákat lehetett megfigyelni (24. és 25. ábra, 27. és 28. táblázat).

VII.2. CÖLIÁKIA

VII.2.1. Klaudin (CLDN) expresszió cöliákiás gyermekek proximális és disztális duodenumában (202)

Az endoszkópiás vizsgálatnál a cöliákiások duodenumának két különböző régiója, vagyis a bulbusz (proximális régió), és a disztális régió makroszkóposan nem különbözött. A mikroszkópos vizsgálat és Marsh elemzés sem igazolt a két duodenum szegmens között markáns különbséget. A cöliákiás mintákban a CD3 pozitív T-sejtek száma szignifikánsan magasabb volt a bulbusban ($p=0,026$) és a disztális szegmensben ($p=0,006$), mint a kontrollokban, de a két régió egymástól szignifikánsan nem különbözött.

Vizsgálataink alapján az immunhisztokémiai módszerrel kimutatott CLDN 2 megjelenése a mukózális sejtekben citoplazmatikus lokalizációjú és granuláris jellegű. Ezzel ellentétben a CLDN 3 expressziója a citoplazma membránján jelenik meg, döntően lineárisan (26. ábra). A CLDN 4 szintén a citoplazma membránján expresszálódik.

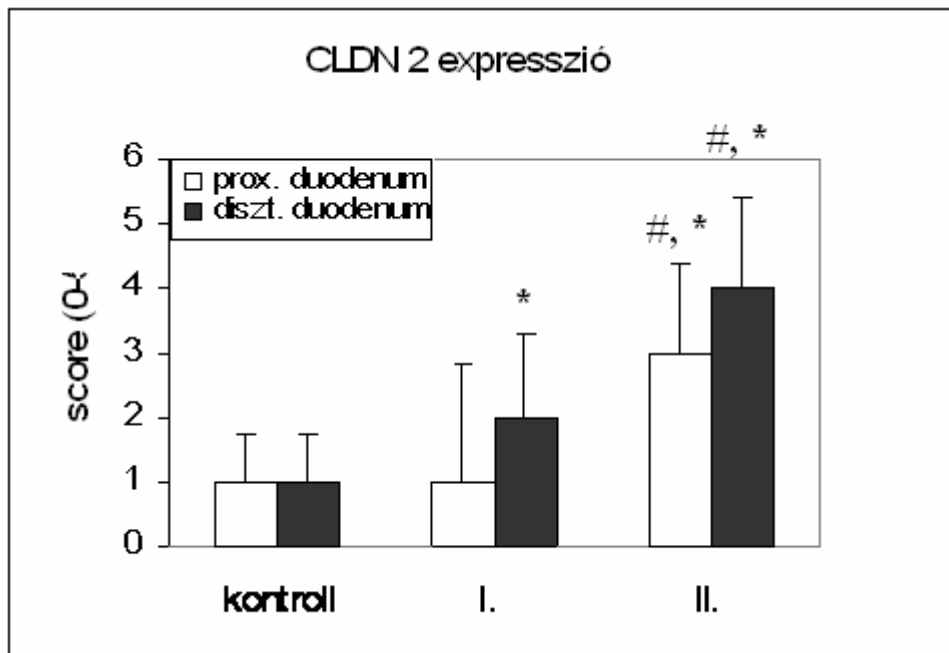


26. ábra. A klaudinok expressziójának vizsgálata immunhisztokémiai módszerrel cöliákiasok duodenális mukózájában.

A CLDN 2 megjelenése a mukózális sejtekben citoplazmatikus lokalizációjú és granuláris jellegű (bal oldali kép). A CLDN 3 expressziója a citoplazma membránján jelenik meg, döntően lineárisan (jobb oldali kép). (x20, insert x100 imm.)

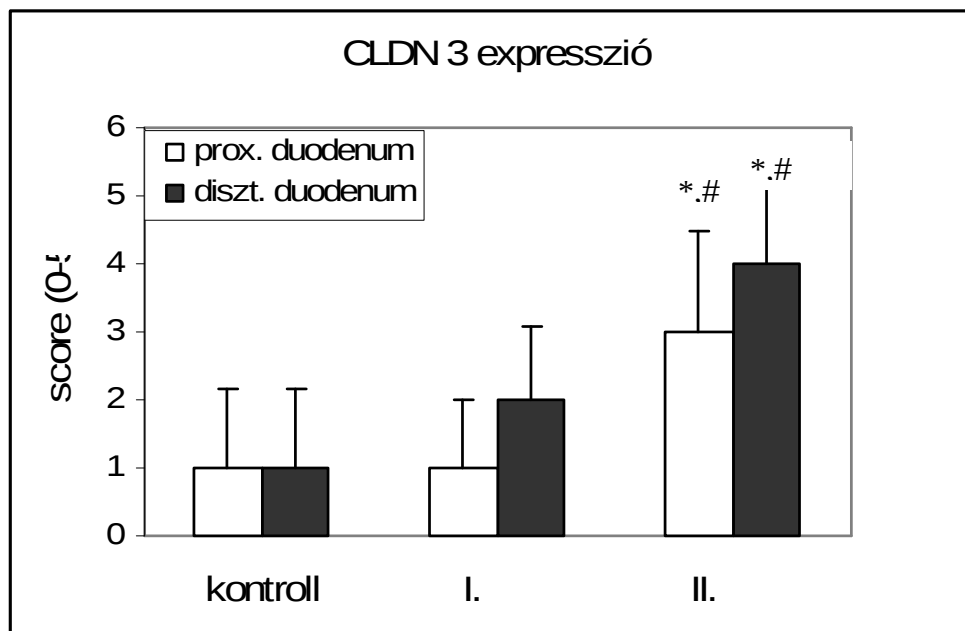
Vizsgálatainkkal elsőként igazoltuk, hogy a CLDN 2 és CLDN 3 expresszió cöliákiasokban kifejezettebb, mint a kontrollokban. Amennyiben a cöliákias betegeket a boholykárosodás alapján két csoportra osztottuk, egy kevésbé súlyos (I. csoport, Marsh 2-ig), és egy súlyosabb boholykárosodást mutató (II. csoport, Marsh 3) populációra, akkor azt találtuk, hogy a CLDN denzitás a súlyosabb, II. csoportban nagyobb. Eredményeinket részletesebben ismertetve: a CLDN 2 expresszió cöliákiasokban szignifikánsan fokozott volt enyhébb boholykárosodásnál a disztális régióban ($p=0,02$), súlyosabb atrófiában a bulbuszban és a disztális régióban ($p=0,001$) egyaránt, a kontrollhoz képest (**27. ábra**). A CLDN 2 expresszió a bulbuszban és a disztális régióban egyaránt nagyobb volt a súlyosabb formában, az enyhébb formával szemben ($p=0,04$ és $p=0,03$).

Ezt az összefüggést a CLDN 3 is mutatta (bulbusz $p=0,008$ és disztális régió: $p=0,004$). A CLDN 3 expresszió a bulbuszban és a disztális duodénumban is magasabb volt a súlyosabb formában, a kontrollhoz képest (**28. ábra**). A CLDN 4 megjelenése nem mutatott jelentős eltérést a vizsgált csoportok között.



27. ábra. A CLDN 2 expressziója cöliákiás betegek proximális és disztális duodenumában a kontroll mintákhoz képest.

Az I. csoport Marsh felosztás szerint (-2) a kevésbé súlyos boholykárosodást, míg a II. csoport a súlyosabb (Marsh 3) léziójú egyéneket foglalja magába. (* $p < 0,05$ vs. kontroll, # $p < 0,05$ vs. I. csoport)



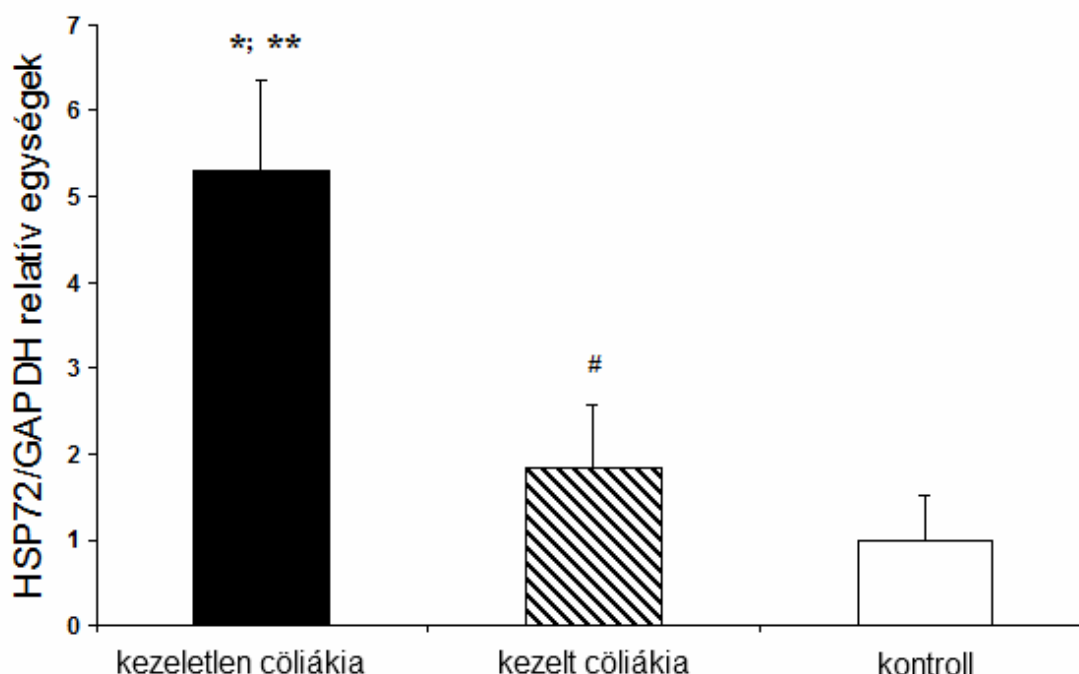
28. ábra. A CLDN 3 expressziója cöliákiás betegek proximális és disztális duodenumában a kontroll mintákhoz képest.

Az I. csoport Marsh felosztás szerint (-2) a kevésbé súlyos boholykárosodást, míg a II. csoport a súlyosabb (Marsh 3) léziójú egyéneket foglalja magába. (* $p < 0,05$ vs. kontroll, # $p < 0,05$ vs. I. csoport)

VII.2.2. HSP72 expresszió (mRNS és fehérje) és lokalizáció vizsgálata cöliákiások duodenumában (203)

HSP72 mRNS expresszió a duodenum nyálkahártyában

A HSP72 mRNS expressziót real-time RT-PCR-rel határoztuk meg a kezeletlen cöliákiás gyermekek, a kezelt cöliákiás gyermekek és a kontrollok duodenum biopsziás mintáiban. A HSP72 mRNS expresszió szignifikánsan fokozódott a kezeletlen, valamint a kezelt cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában, a kontrollokhoz képest ($p=0,0002$ és $p=0,023$). A kezelt cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában a HSP72 mRNS expresszió csökkent a kezeletlen cöliákiás gyermekekéhez képest ($p=0,003$) (29. ábra).



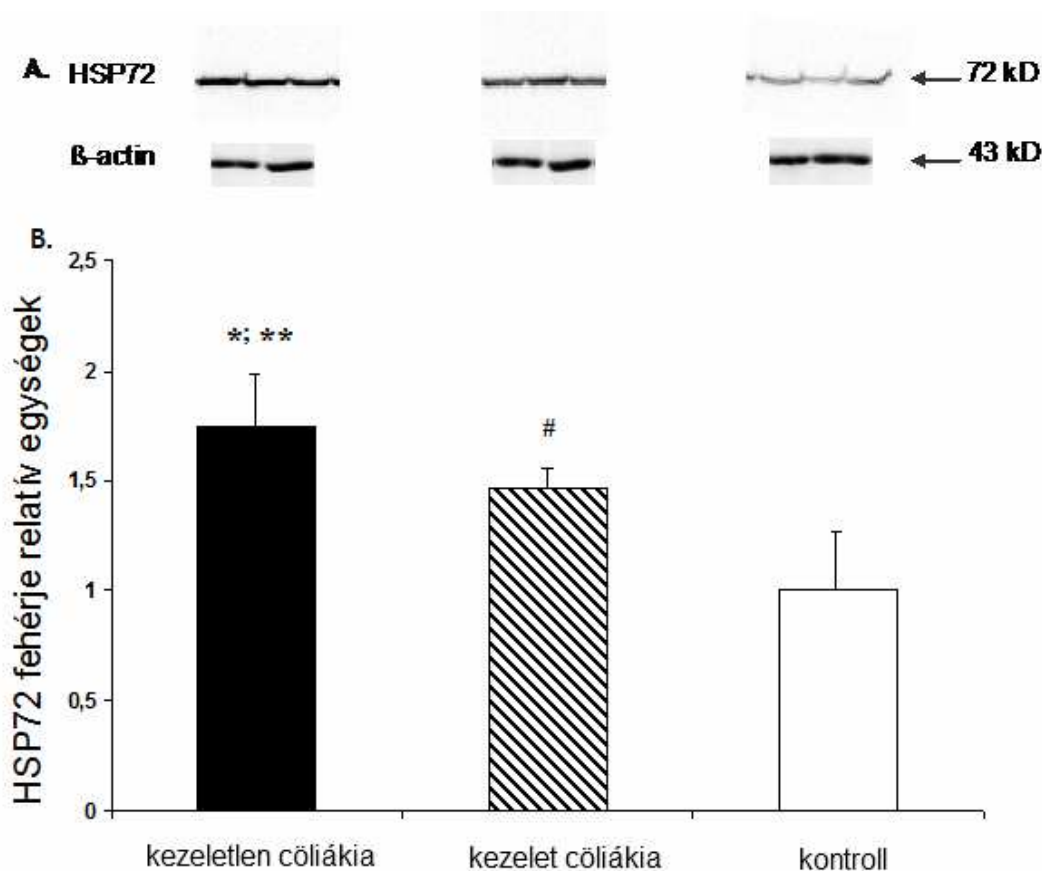
29. ábra. A HSP72 mRNS expressziója kezeletlen és kezelt cöliákiás gyermekek, valamint kontrollok duodenum nyálkahártyájában.

A statisztikai értékelés Mann-Whitney U teszttel történt. * $p = 0,003$ kezeletlen vs. kezelt cöliákia, ** $p = 0,0002$ kezeletlen vs. kontroll, # $p = 0,023$ kezelt vs. kontroll.

HSP72 fehérjeszint a duodenum nyálkahártyában

A kezeletlen és kezelt cöliákiás gyermekek, valamint a kontrollok duodenum biopsziáinak Western blot analízise során a HSP72-nél 72 kDa-nál detektáltunk jelet. A HSP72 fehérje mennyisége szignifikánsan fokozódott a kezeletlen, valamint a kezelt cöliákiás gyermekek duodenum mukózájában a kontrollokhoz képest ($p=0,0001$ és $p=0,003$). A kezelt cöliákiás

gyermek duodenum nyálkahártyájában a HSP72 fehérje szintje csökkent, a kezeltlen cöliákiás gyermekekéhez képest ($p=0,002$) (30. ábra).

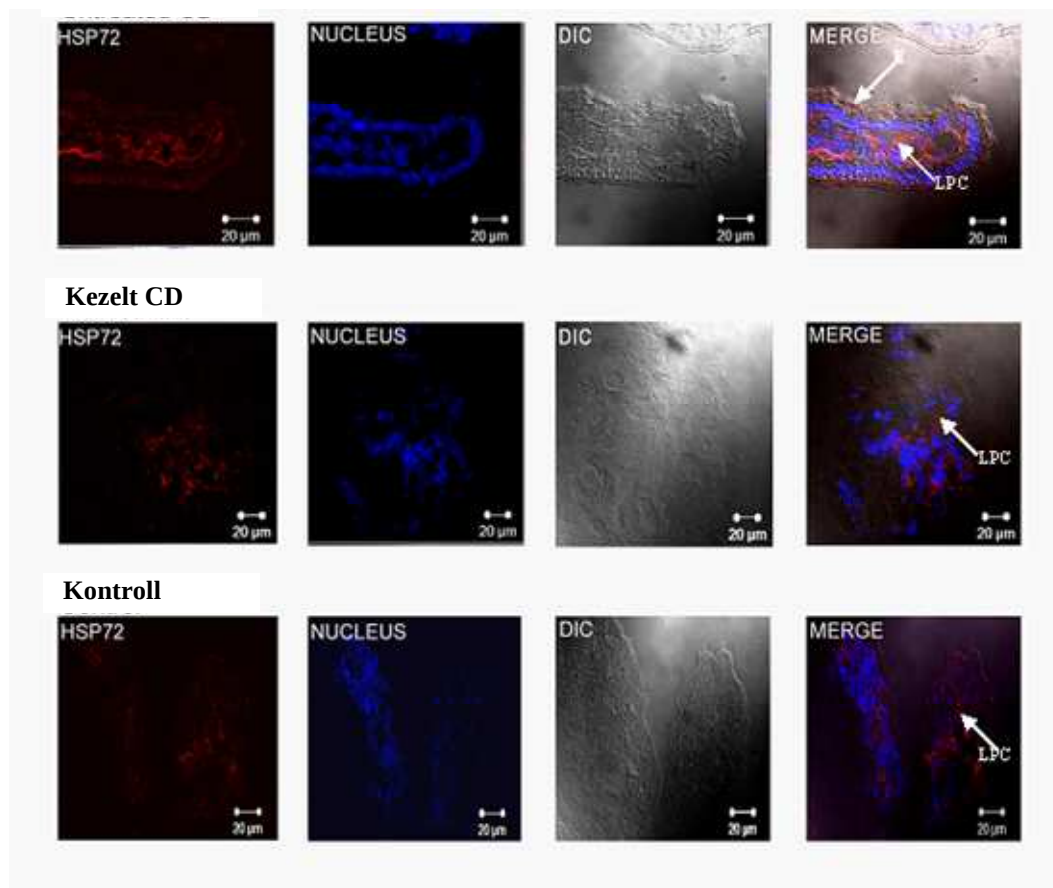


30. ábra. A HSP72 fehérje szintje kezeletlen és kezelt cöliákiás gyermekek, valamint kontrollok duodenum nyálkahártyájában.

A duodenum biopsziák HSP72 specifikus Western blot analízise során egyetlen jól elkülönülő jelet kaptunk 72 kDa-nál. A statisztikai értékelés Mann-Whitney U teszttel történt. * $p = 0,002$ kezeletlen vs. kezelt cöliákia, ** $p = 0,0001$ kezeletlen vs. kontroll, # $p = 0,003$ kezelt vs. kontroll.

A HSP72 lokalizációja a duodenum nyálkahártyában

A HSP72 lokalizációját immunfluoreszcens festéssel határoztuk meg. Kezeletlen cöliákiás gyermekek duodenális bolyhaiban erőteljes HSP72 festődést láttunk az enterocitákban és a lamina propria immunsejtjeiben, a kontrollokhoz képest. Ugyanezen sejtek festődtek a kezelt gyermekek esetében is, de kisebb jelintenzitással. A kontrollok normál duodenumában csak nagyon elenyésző HSP72 immunreaktivitást tapasztaltunk és nem volt jelen kimutatható mennyiségű HSP72 a nukleáris frakciókban (31. ábra).



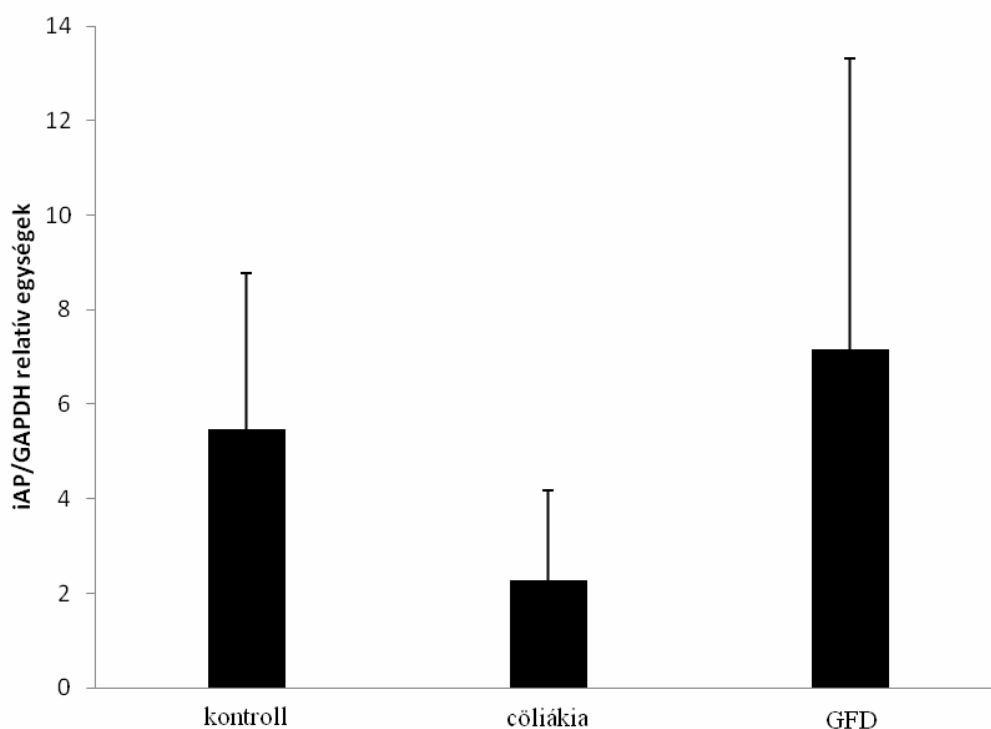
31. ábra. A HSP72 lokalizációja kezeletlen és kezelt cöliákiás gyermekek, valamint kontrollok duodénium nyálkahártyájában.

HSP72: piros, magfestés: kék, „merge”: a kettő együtt (jobb oldali oszlop). LPC: lamina propria cell. Az immunfluoreszcens festést követően a konfokális felvételeket Zeiss Axiovert LSM510 mikroszkóppal készítettük.

VII.2.3. Az iAP expressziójának vizsgálata cöliákiás gyermekek duodénium nyálkahártyájában (204)

Az iAP mRNS expressziójának változásai cöliákiás gyermekek duodénium nyálkahártyájában

Az iAP mRNS expressziót RT-PCR-rel határoztuk meg az újonnan diagnosztizált cöliákiás, a már gluténmentes étrendet tartó cöliákiás és kontroll gyermekek duodénium nyálkahártyájában. Az iAP mRNS expressziója a vizsgált 3 csoportban szignifikánsan nem különbözött egymástól (32. ábra).



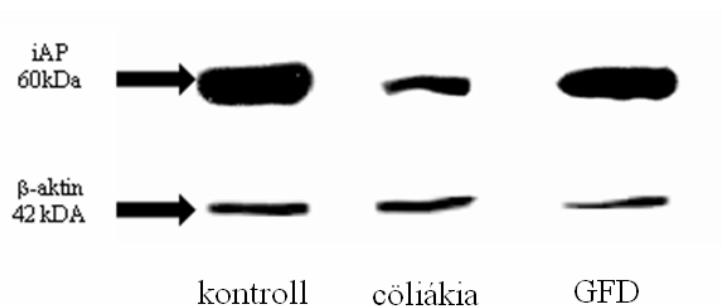
32. ábra. Az iAP mRNS expresszió változása kontrollok, újonnan diagnosztizált cöliákiás, valamint gluténmentes diétát tartó cöliákiás (GFD) gyermekek duodenum nyálkahártyájában.

Az iAP mRNS expressziója nem mutatott szignifikáns eltérést a vizsgált csoportokban.

Az iAP fehérjeszintek változásai cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában

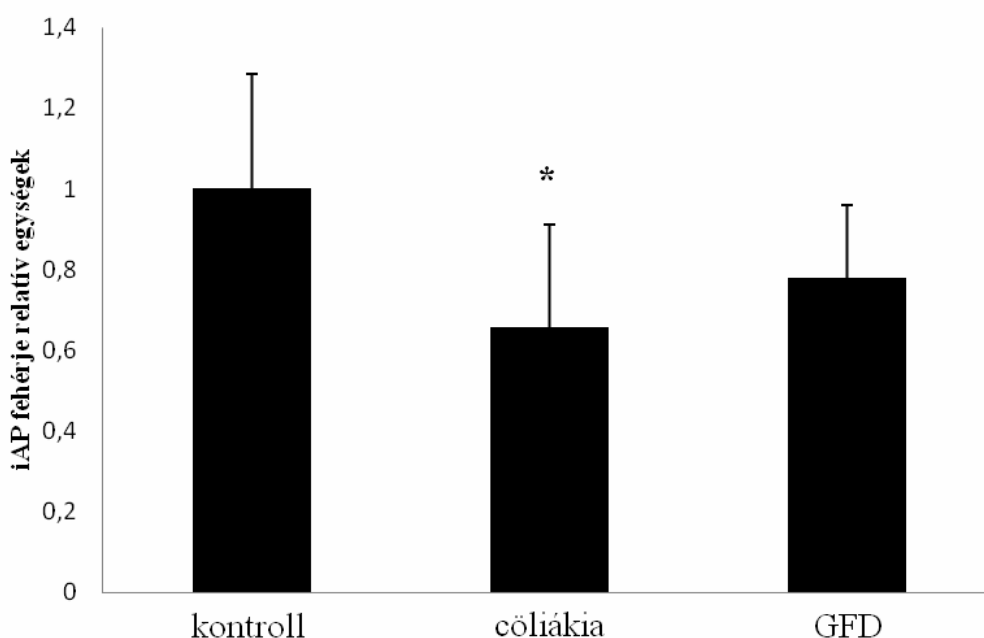
Az iAP-ra specifikus primer ellenanyag felhasználásával vizsgáltuk Western blot módszerrel az újonnan kórismézett cöliákiás, gluténmentes étrenden tartott cöliákiás, valamint kontroll gyermekek duodenum nyálkahártyáját. Az iAP-ot 60 kDa-nál, a β -aktin jelét 43 kDa-nál detektáltuk.

Az iAP fehérje mennyisége szignifikánsan csökkent a kezeletlen cöliákiásokban, a kontrollhoz viszonyítva (* $p < 0,05$). A GFD-s gyermekek iAP fehérjeszintje megnövekedett az újonnan diagnosztizált cöliákiásokéhoz képest, ugyanakkor a kontrollcsoport iAP fehérjeszintjénél alacsonyabb volt. Mindamellett a különbség a GFD-s gyermekek esetében nem bizonyult szignifikánsnak (33. és 34. ábra).



33. ábra. Az iAP fehérjeszintek reprezentatív eredményei kontrollok, újonnan diagnosztizált cöliakiás, és gluténmentes étrendet tartó cöliakiás (GFD) gyermekek duodenum nyálkahártyájában (Western blot).

Az iAP fehérjeszint az újonnan diagnosztizált cöliakiás gyermekekben csökkent, a kontrollokéhoz és a GFD-t tartó cöliakiásokéhoz képest.



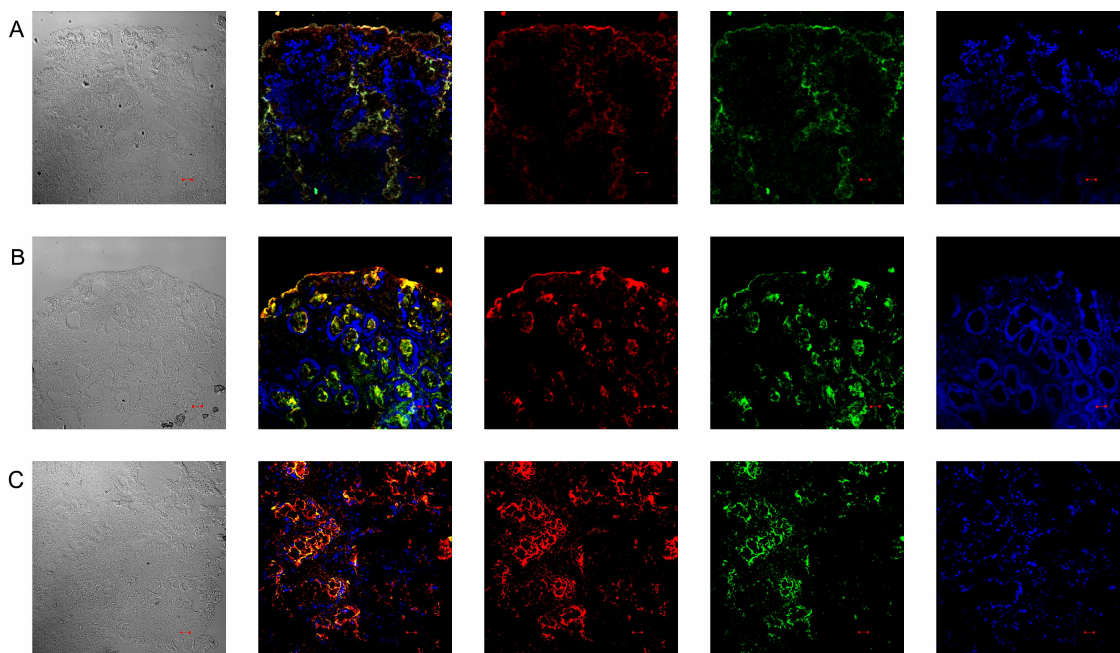
34. ábra. Az iAP fehérjeszintek változása kontrollok, újonnan diagnosztizált cöliakiás, és gluténmentes étrendet tartó cöliakiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában.

A cöliakiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában az iAP fehérjeszint szignifikánsan csökkent, a kontrollcsoportéhoz képest (* $p < 0,05$). A cöliakiások vs. GFD, a GFD vs. kontroll csoportok között nem volt szignifikáns az iAP fehérjeszint csökkenés.

Az iAP és TLR4 lokalizációjának vizsgálata cöliakiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában

Az iAP és TLR4 együttes lokalizációjának megállapítására immunfluoreszcens festést végeztünk újonnan kórismézett cöliakiás, gluténmentes étrendet tartó cöliakiás, valamint kontroll gyermekek duodenum nyálkahártyájában. A TLR4 és az iAP molekulák között

egyértelmű kolokalizációt találtunk, az iAP és TLR4 kolokalizációja mindhárom vizsgált csoportban kifejezett volt, és pontszerű mintázatot követett. Az iAP eloszlása kizárólag a duodenum nyálkahártya epiteliális felszínére lokalizálódott. Immunfluoreszcens jelet nem detektáltunk a kehelysejteken, a lamina propria immunsejtjein és a Lieberkühn kripták sejtjein sem (35. ábra).



35. ábra. Az iAP és TLR4 lokalizációja egészséges kontroll, újonnan diagnosztizált cöliákiás és gluténmentes étrendet tartó cöliákiás (GFD) gyermekek duodenum nyálkahártyájában.

Az immunfluoreszcens jelölés anti-iAP és anti-TLR4 antitestek felhasználásával történt, egészséges kontrollok (A), cöliákiás (B) és GFD-s (C) gyermekek duodenum mukózájában. A vizsgált csoportokban az iAP (piros, 3. oszlop) és TLR4 (zöld, 4. oszlop) jelölés kizárólag az epitélfelszínre korlátozódott. Az iAP és TLR4 kolokalizációját a piros és a zöld szín egymásra vetülése (2. oszlop) mutatja, a kék szín a sejtmagot jelzi (5. oszlop); 20-szoros nagyítás, (TLR: Toll-like receptor, iAP: intestinális alkalikus foszfatáz).

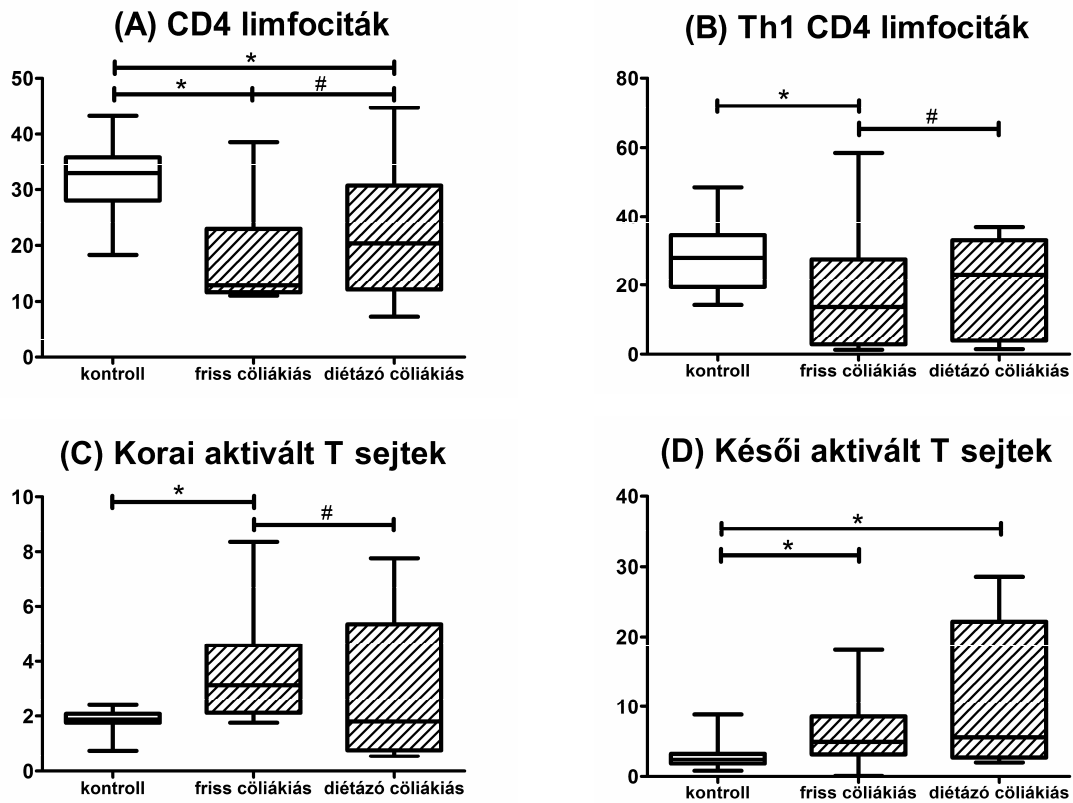
VII.2.4. Cöliákiás gyermekek perifériás vérének immunfenotípus elemzése

Az újonnan kórismézett cöliákiásokban az **adaptív immunitás** elemei közül alacsonyabb volt a CD4 limfociták prevalenciája a kontrollokéhoz képest, míg magasabb a korai (CD69⁺) és késői (HLA-DR⁺) aktivációs markert expresszáló CD4 sejteké. Ezen kívül a Th1 populáció aránya szintén kisebb volt a friss cöliákiásokban (29. táblázat, 36. és 37. ábra).

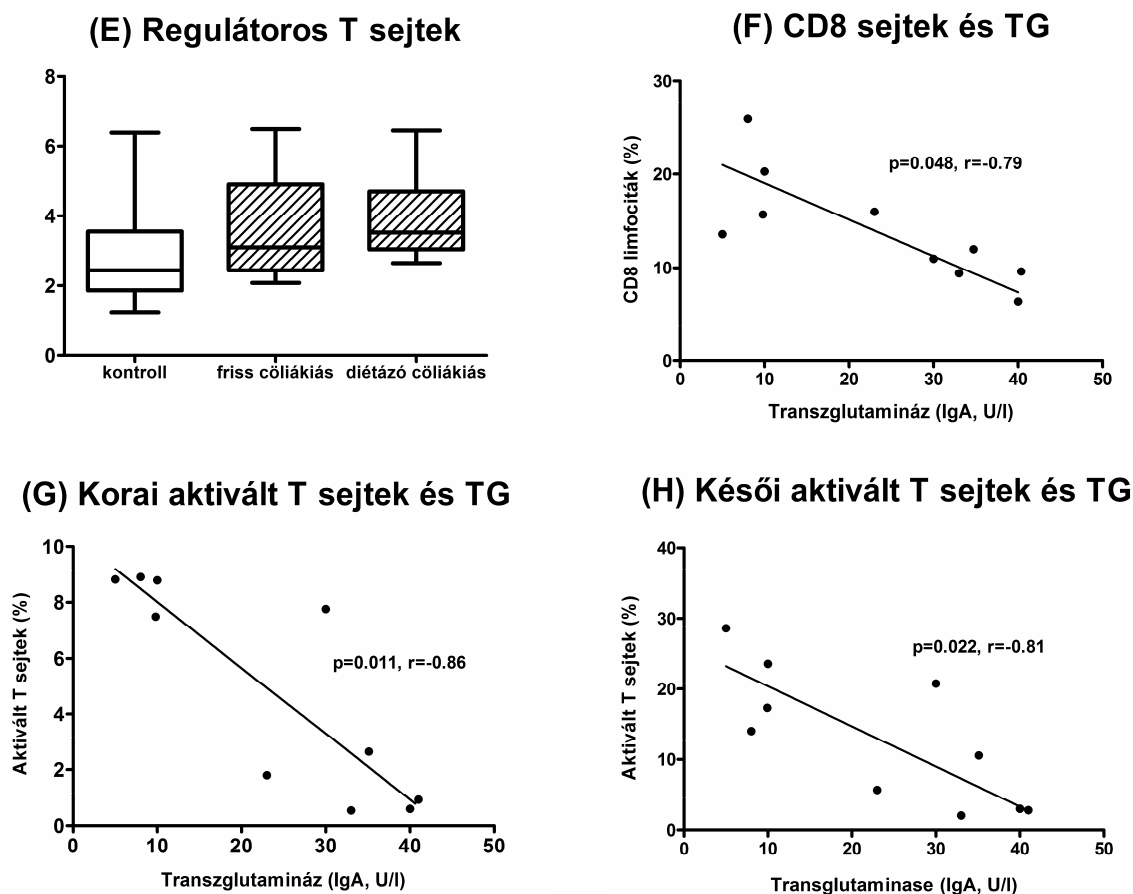
28. táblázat. Az adaptív immunitás elemeinek prevalenciája és arányai újonnan kórismézett cöliákiásokban, kezelt, gluténmentes diétát folytatókban (GFD) és kontrollokban.

Az adatok medián (interkvartilis tartomány) formátumban vannak megadva. Rövidítések: GFD: gluténmentes diéta, PBMC: perifériás vér mononukleáris sejtek, Th1 (T helper 1: CXCR3+), Th2 (T helper 2: CCR4+), naív (CD45RA+), effektor (CD45RO+), korai aktivációs markerek (CD25+ és CD69+), késői aktivációs markerek (CD62L+ és HLA-DR+), Treg (regulátoros T sejtek, CD25hiFoxP3+). Statisztika: vs. kontroll: *p<0,05, **p<0,01; ***p<0,001; vs. friss cöliákiások: #p<0,05.

sejt prevalencia	kontroll	friss cöliákiások	diétázó cöliákiások (GFD)
PBMC-ben CD4⁺	32,93 [28,07-35,86]	13,21 [11,85-22,97]*	20,34 [12,15-30,70]*, #
PBMC-ben CD8⁺	16,71 [14,34-20,55]	15,80 [9,70-26,11]	13,59 [9,40-20,27]
CD4⁺ / CD8⁺ arány	2,05 [1,84-2,36]	0,87 [0,36-1,30]**	1,47 [0,87-1,74]#
CD4⁺-ben Th1	27,96 [19,41-34,46]	13,71 [2,87-27,48]*	23,06 [3,94-33,00]#
CD4⁺-ben Th2	9,13 [7,49-13,17]	9,92 [7,22-24,01]	8,27 [4,74-15,58]
Th1 / Th2 arány	3,61 [2,07-4,09]	1,20 [0,30-1,67]***	1,96 [1,30-2,78]#
CD4⁺-ben naív	71,60 [67,94-80,23]	71,20 [45,83-81,35]	71,80 [61,83-75,31]
CD4⁺-ben effektor	19,88 [13,59-31,79]	19,60 [12,66-41,08]	17,82 [12,89-32,65]
naív/effektor arány	3,98 [1,85-5,57]	3,63 [1,25-4,64]	3,81 [2,08-4,42]
CD4⁺-ben CD25⁺	11,71 [9,03-14,68]	11,66 [7,42-14,10]	11,19 [4,56-16,83]
CD4⁺-ben CD69⁺	1,87 [1,76-2,08]	3,14 [2,11-4,59]*	1,80 [0,76-4,80]#
CD4⁺-ben CD62L⁺	24,84 [17,32-30,32]	5,28 [4,15-13,09]**	10,78 [2,40-22,90]*, #
CD4⁺-ben HLA-DR⁺	2,57 [1,88-3,40]	5,05 [3,33-8,58]*	5,67 [2,90-22,17]*
CD4⁺-ben Treg	2,44 [1,86-3,55]	2,97 [2,38-4,70]	3,52 [2,85-5,58]



36. ábra. Az adaptív immunitás sejtjei és korrelációi újonnan kórismézett cöliákiasokban, kezelt, gluténmentes diétát folytatókban (GFD) és kontrollokban (A-D). Whiskers box-plot: középvonal a medián, a doboz az interkvartilisek, a bajusz a tartományt jelöli. (A) T helper limfociták (Th, CD4⁺), (B) Th1 elkötelezett limfociták (CXCR3⁺), (C) Korai aktivációs markert expresszáló Th limfociták (CD69⁺), (D) Késői aktivációs markert expresszáló Th limfociták (HLA-DR⁺). Statisztika: vs. kontroll: * p<0,05, ** p<0,01; *** p<0,001; vs. friss cöliákiasok: # p<0,05.



37. ábra. Az adaptív immunitás sejtjei és korrelációi újonnan kórismézett cöliákiasokban, kezelt, gluténmentes diétát folytatókban (GFD) és kontrollokban (E-H).

Whiskers box-plot: középvonal a medián, a doboz az interkvartilisek, a bajusz a tartományt jelöli.

(E) CD4⁺ regulátoros T sejtek (Treg, CD25^{hi}FoxP3⁺), (F) Korreláció a T citotoxikus sejtek prevalenciája (Tc, CD8⁺) és a transzglutamináz szint (TG, IgA, U/l) között diétázó cöliákiasokban (GFD), (G) Korreláció a korai aktivációs markert expresszáló limfociták és TG szint között GFD-ben, (H) Korreláció a késői aktivációs markert expresszáló limfociták és TG szint között GFD-ben. Statisztika: vs. kontroll: * $p<0,05$, ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; vs. friss cöliákiasok: # $p<0,05$.

Az újonnan diagnosztizált, még nem diétázó cöliákiasokban a **veleszületett immunitás** elemei közül az NK, NKT, iNKT prevalenciája alacsonyabb volt a kontrollokhoz képest. Másrésről a DC-k, főleg az mDC-k aránya magasabb volt a beteg egyénekben. Az APC-k TLR2 és TLR4 expressziója szintén emelkedett volt a frissen diagnosztizált cöliákiasokban, az egészségesekhez képest (30. táblázat).

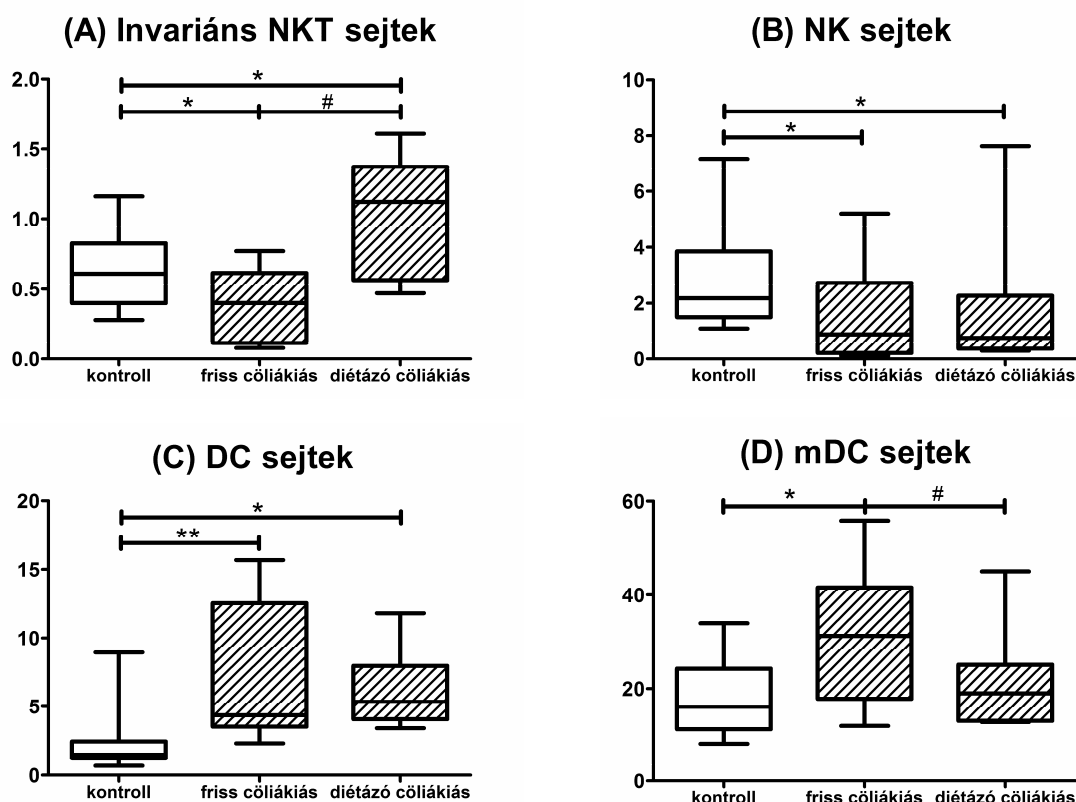
A gluténmentes diéta bevezetésével, a tünetek megszűnte után az **adaptív immunitás** eltérései normalizálódtak (kivéve a CD4 és Th1 sejtek). Kiemelésre érdemes, hogy mind a korai (CD69⁺), mind a késői (CD62L⁺) aktivációs markert expresszáló limfociták prevalenciája is normalizálódott a diétával (37. ábra).

29. táblázat. A veleszületett immunitás elemeinek prevalenciája és arányai újonnan kórismezett cöliákiásokban, kezelt, gluténmentes diétát folytatókban (GFD) és kontrollokban.

Az adatok medián (interkvartilis tartomány) formátumban vannak megadva. Rövidítések: GFD: gluténmentes diéta, PBMC: perifériás vér mononukleáris sejtek, NK (természetes ölő sejtek, CD3-CD161+), NKT (természetes ölő T sejtek, CD3+CD161+), iNKT (invariáns természetes ölő T sejtek, CD3+6b11+), DC (dendritikus sejtek, Lin1-HLA-DR+), mDC (mieloid dendritikus sejtek, CD11c+), pDC (plazmocitoid dendritikus sejtek, CD123+); monociták (CD14+), TLR2 (Toll-like receptor2), TLR4 (Toll-like receptor4). Statisztika: vs. kontroll: *p<0,05, **p<0,01; ***p<0,001; vs. friss cöliákiások: #p<0,05, ##p<0,01.

sejt prevalencia	kontroll	friss cöliákiások	diétázó cöliákiások (GFD)
PBMC-ben NK	5,13 [3,62-7,79]	2,50 [0,96-3,96]**	2,49 [1,87-4,36]*
PBMC-ben NKT	2,18 [1,51-3,85]	0,89 [0,22-2,73]*	0,77 [0,38-2,27]*
PBMC-ben iNKT	0,61 [0,40-0,83]	0,40 [0,12-0,62]*	1,12 [0,57-1,37]*,##
PBMC-ben DC	1,49 [1,21-2,45]	4,37 [3,53-12,54]**	5,12 [3,58-7,36]*
PBMC-ben mDC	16,14 [11,25-24,27]	31,27 [17,83-41,61]*	19,00 [13,08-25,09]#
PBMC-ben pDC	11,61 [6,25-16,96]	7,91 [4,97-12,23]	3,95 [2,55-12,38]
mDC / pDC arány	1,72 [1,22-2,01]	3,94 [2,75-6,72]**	3,56 [1,61-5,20]
DC-ben TLR2⁺	3,99 [2,30-11,86]	27,10 [19,15-44,50]***	24,32 [17,78-41,39]**
DC-ben TLR4⁺	2,90 [1,23-5,75]	9,08 [5,41-12,84]*	7,84 [4,10-9,13]
PBMC-ben monociták	1,69 [1,22-2,84]	2,65 [0,44-3,58]	2,33 [0,56-4,17]
monocitákban TLR2⁺	28,53 [23,93-31,85]	58,98 [50,05-70,16]***	53,64 [35,41-64,25]*
monocitákban TLR4⁺	5,40 [2,90-19,85]	23,39 [14,54-30,77]*	13,04 [7,91-27,30]

Érdekes módon a **veleszületett immunitás** sejtjes elemeinek eltérései a diétázó cöliákiásokban is megmaradtak, egyedül az APC-k TLR4 expressziója normalizálódott. A már tartósan diétázó gyermekekben (GFD csoport) a transzglutamináz (TG) IgA szintje és a CD8⁺, CD4⁺CD69⁺, CD4⁺HLA-DR⁺, pDC és TLR2 expresszáló monociták prevalenciája között fordított korrelációt mutattunk ki (38. és 39. ábra).

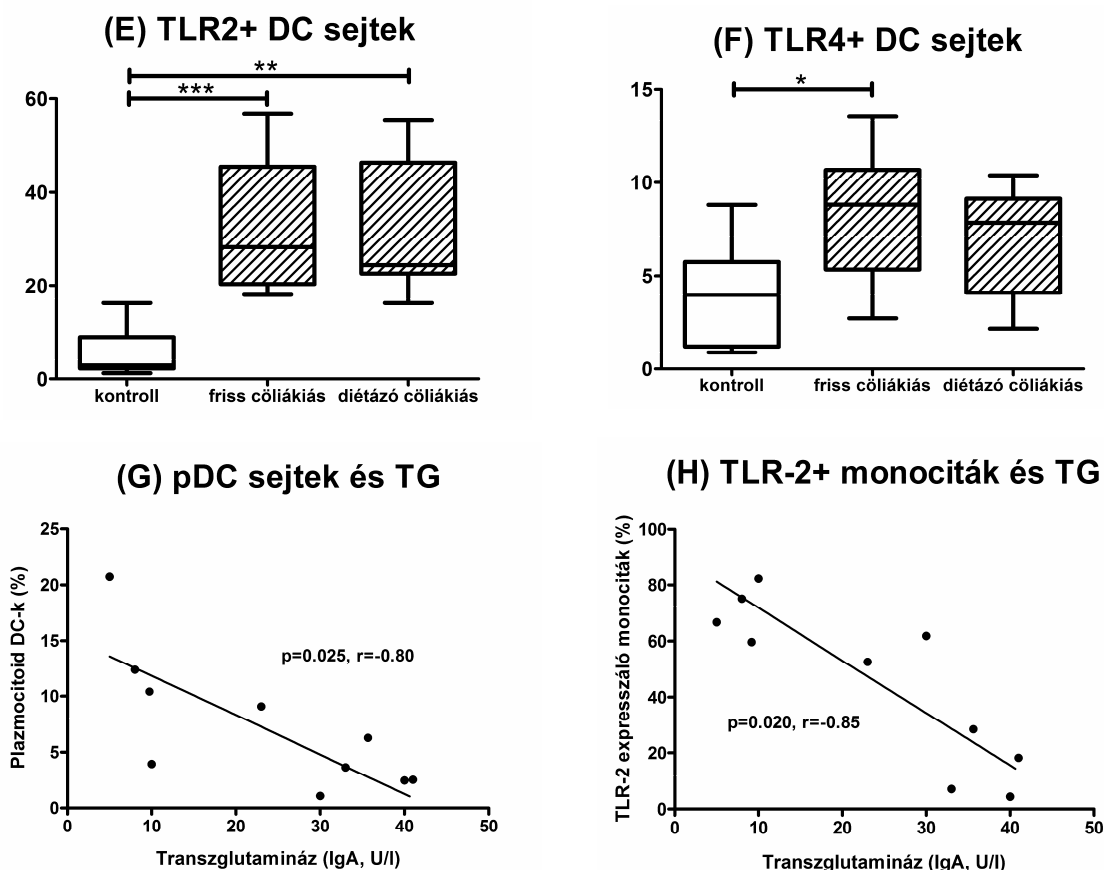


38. ábra. A veleszületett immunitás sejtjei és korrelációi újonnan kórismézett cöliákiásokban, kezelt, gluténmentes diétát folytatókban (GFD) és kontrollokban (A-D).

Whiskers box-plot: középvonal a medián, a doboz az interkvartilisek, a bajusz a tartományt jelöli.

(A) Invariáns természetes ölő sejtek (iNKT, CD3⁺6b11⁺), (B) Természetes ölő sejtek (NK, CD3⁺CD161⁺), (C) Dendritikus sejtek (DC, Lin1HLA-DR⁺), (D) Mieloid DC-k (mDC, CD11c⁺)

Statisztika: vs. kontroll: *p<0,05, **p<0,01; ***p<0,001; vs. friss cöliákiások: #p<0,05, ##p<0,01.



39. ábra. A veleszületett immunitás sejtjei és korrelációi újonnan kórismézett cöliákiasokban, kezelt, gluténmentes diétát folytatókban (GFD) és kontrollokban (E-H).

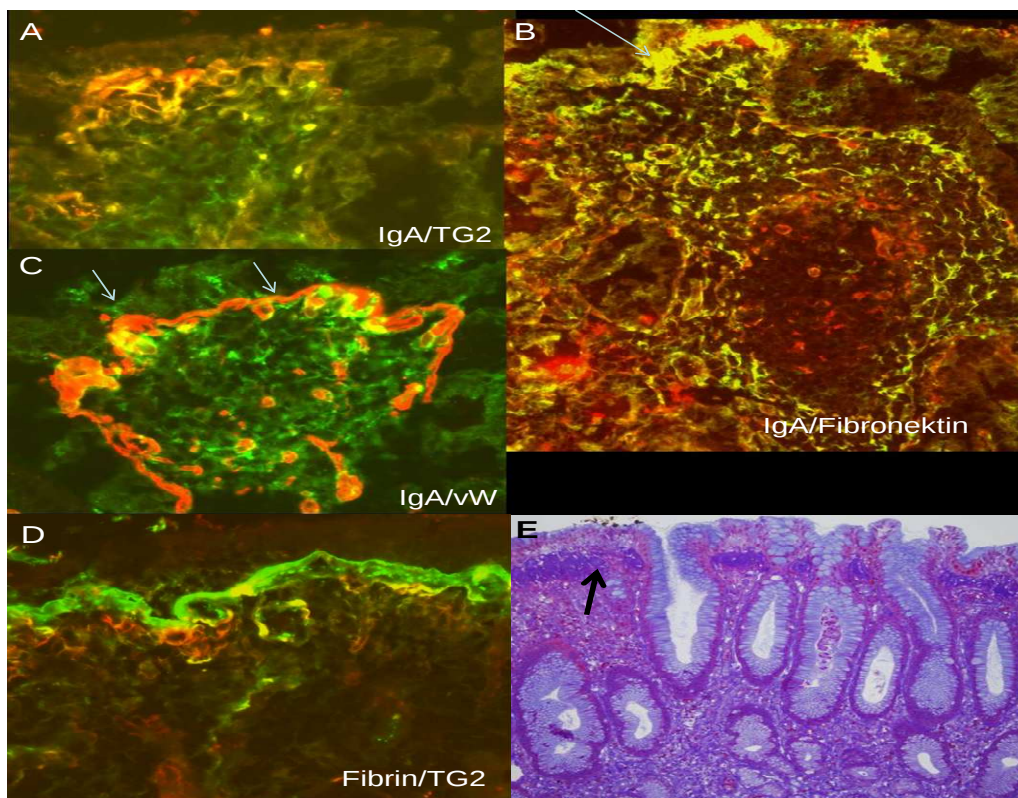
Whiskers box-plot: középvonal a medián, a doboz az interkvartilisek, a bajusz a tartományt jelöli.

(E) Toll-like receptor 2 (TLR2) expresszáló DC-k, (F) TLR4 expresszáló DC-k, (G) Korreláció a plazmocitoid DC-k (pDC, CD123⁺) és transzglutamináz szint (TG, IgA, U/l) között diétázó cöliákiasokban (GFD), (H) Korreláció a TLR2 expresszáló monociták (CD14⁺) és TG szint között GFD-ben. Statisztika: vs. kontroll: * $p<0,05$, ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; vs. friss cöliákiasok: # $p<0,05$, ## $p<0,01$.

VII.2.5. Kóros transzglutamináz és plazminogénhiány a duodenális fekély patomechanizmusában (205)

A beteganyag fejezetben részletesen ismertetett **plazminogén (PLG) hiányos** és cöliákias 6 éves kislánynál az endoszkópia során látott duodenális fekély szomszédságából multiplex biopsziát vettünk. A szövettani elemzésnél Mallory festéssel a PLG hiányra jellemző kórosan fokozódott fibrindepozitumokat lehetett igazolni a fekély közvetlen környezetében. Mivel a kóros depozitumok közelében szokatlan érrajzolat ábrázolódott, fölmerült bennünk, hogy a cöliákia és a PLG hiány nem egyszerűen egy véletlen egybeesés, hanem oki szerepet játszik együtt a 2 kórkép. Feltételeztük, hogy a cöliakiára jellemző TG2 depozitumok és a PLG hiány következtében fölszaporodó fibrin egymással kölcsönhatásba léphetnek, s ennek ulcerogén

hatása lehet. Ezt a föltevésünket speciális, dupla-immunfluoreszcens vizsgálataink igazolták (**40. ábra**). A 40/D ábrán látható zöld színű, szalag formájú fibrin depozitumok egyrészt diszlokálják az ereket, másrészt módosítják a TG2 expressziót (vörös). Ennek a két hatásnak mukózális sérülés, ulceráció és vérzés lehet a következménye.



40. ábra. A-D: Dupla immunfluoreszcens vizsgálat a duodenális mukózában.

A ábra. A transzglutamináz 2 (TG2, vörös szín) szokatlan szubepiteliális expressziója, a hasonló lokalizációjú anti-TG2 IgA depozíció (zöld) és ennek kifejezett együttes megjelenése sárga színben; **B ábra.** Cöliákias IgA (zöld) antitest részleges együttes megjelenése fibronektinnel (vörös), amelyhez a TG2 szorosan kötődik. Ennek mennyisége a „hagymányos” cöliákiasokhoz képest kifejezettebben ábrázolódik az epitélium alatt (nyíl); **C ábra.** A Von Willebrand faktor elleni antitestekkel jelölt erek (vörös) a szokásosnál jóval kanyargósabbak, kiterjedtebbek és intenzív cöliákias IgA depozitum veszi őket körül. Ennek közelében a nyilak a károsodott epitéliumot mutatják; **D ábra.** A szalag formájú fibrin depozitumok (zöld) egyrészt diszlokálják az ereket, másrészt módosítják a TG2 expressziót (vörös); **E ábra.** Az antrális lamina propria fibrines depozitumai (Mallory festés, nyíl).

VII.3. ALLERGIÁS KOLITISZ (AC)

Diagnosztikai jellemzők és immunfenotípus vizsgálatok allergiás kolitiszben (206, 207)

AC-s csecsemők laboratóriumi vizsgálatánál szignifikánsan fokozott trombocitaszámot és vashiányos anémiát találtunk a kontrollhoz képest (**31. táblázat**). A specifikus IgE és a szérum eozinofil sejtszám nem adott diagnosztikus segítséget. A bevezetésben részletesen ismertetett EC populációban (súlyosabb AC variáns) is hasonló laboratóriumi értékek mutatkoztak. Feltételezésünk, miszerint az EC súlyosabb forma, és ezt majd a laboratóriumi és endoszkópos vizsgálat is jelezni fogja, nem igazolódott. A kolonoszkópos vizsgálatnál mindkét populációban egyaránt limfonoduláris hiperpláziát és aftás kolitist láttunk. Ezt a jóindulatú kórképet kezdetben nem lehet elkülöníteni a ritka csecsemőkori CD-től (hasonló a klinikai kép, a laboratóriumi eltérések, és kolonoszkópiánál a makroszkópos és mikroszkópos kép).

30. táblázat. Laboreredményeink az allergiás kolitiszes, az eozinofil kolitiszes és a kontroll csoportban.

ANOVA, Tukey-féle „post hoc” teszt, Átlag $\pm$ SD, * $p < 0,05$ vs. kontroll, ** $p < 0,01$ vs. kontroll.

	Kontroll	Allergiás kolitisz	Eozinofil kolitisz
Trombocita ($\times 10^9/l$)	328,5 $\pm$ 16,23	520,3 $\pm$ 43,86 *	499,3 $\pm$ 45,04
Hemoglobin (g/l)	133,25 $\pm$ 5,36	117,1 $\pm$ 1,75 *	117,3 $\pm$ 7,9
Vas ($\mu\text{mol/l}$)	17,5 $\pm$ 2,25	8,11 $\pm$ 1,18 **	7,25 $\pm$ 1,25 **
Eozinofil (%)	4,95 $\pm$ 1,87	3,66 $\pm$ 0,78	3,25 $\pm$ 1,07

Immunfenotípus vizsgálatok allergiás kolitiszes csecsemők perifériás vérében

Az allergiás kolitiszes (AC) betegekben kezdetben alacsonyabb volt a Treg (CD4⁺FoxP3⁺) prevalencia, mint a kontroll egyénekben. Az AC-s gyermekekben a naív/effektor (CD4⁺CD45RA⁺/CD4⁺CD45RO⁺) sejtek aránya magasabb volt, ellenben az aktivált (CD4⁺CD25⁺) sejtek prevalenciája alacsonyabb, a kontrollhoz viszonyítva. Kiemelésre

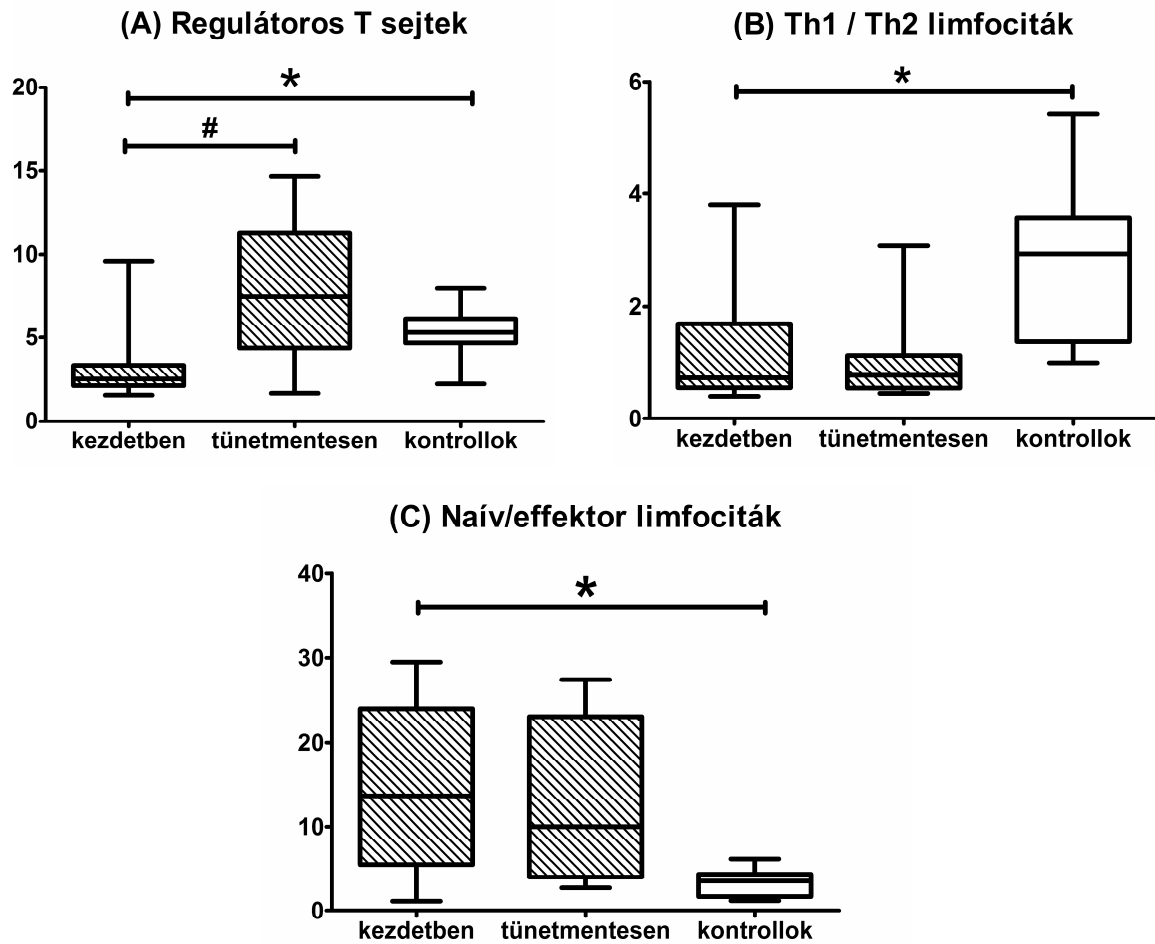
érdekes, hogy kezdetben az AC-s populációban a Th1/Th2 elkötelezett limfociták (CD4⁺CXCR3⁺/CD4⁺CCR4⁺) aránya alacsonyabb volt, és ezzel összhangban az IFN γ /IL4 citokinek aránya is.

A vizsgálat második felében az immunfenotípus változását a hematokézia megszűntével is meghatároztuk. A gyógyult, tünetmentes csecsemőkben a Treg sejtek prevalenciája normális szintre emelkedett. Bár a többi vizsgált sejtcsoport szignifikánsan nem változott a kezdetben mérttől, de a Th1/Th2 elkötelezett sejtek és a citokinek aránya ekkor már nem különbözött a kontrollokéhoz viszonyítva (32. táblázat, 41. ábra).

31. táblázat. Immunfenotípus vizsgálati eredmények, és a citokinek prevalenciája allergiás kolitiszben és kontrollokban.

Az adatok medián (tartomány) formátumban vannak megadva. Rövidítések: AC: allergiás kolitisz; PBMC: perifériás vér mononukleáris sejtek. Statisztika: kezdetben vs. kontroll: *p<0,05; kezdetben vs. tünetmentesen: #p<0,05.

	kontrollok	AC beteg gyermekek	
		kezdetben	tünetmentesen
CD4 ⁺ / PBMC (%)	31,60 [3,20-58,82]	29,19 [8,52-51,10]	35,16 [2,63-57,90]
CD4 ⁺ FOXP3 ⁺ / CD4 ⁺ (%)	5,29 [2,23-7,96]	2,52 [1,56-9,60]*	7,46 [1,67-14,67] [#]
CD4 ⁺ FOXP3 ⁺ (G/l)	0,26 [0,08-0,38]	0,14 [0,09-0,58]*	0,49 [0,16-0,86] [#]
CD4 ⁺ CD25 ^{hi} / CD4 ⁺ (%)	6,04 [2,10-8,33]	2,73 [0,89-4,12]*	7,93 [1,30-10,70] [#]
CD4 ⁺ CXCR3 ⁺ / CD4 ⁺ CCR4 ⁺ (arány)	2,93 [1,00-5,42]	0,77 [0,42-3,80]*	0,85 [0,56-2,90]
IFN γ / IL4 (arány)	10,90 [9,40-20,43]	8,98 [8,24-9,59]*	10,19 [7,91-10,84]
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ / CD4 ⁺ CD45RO ⁺ (arány)	3,54 [1,18-6,17]	13,60 [1,12-29,49]*	10,00 [2,71-27,41]
CD4 ⁺ CD25 ⁺ / CD4 ⁺ (%)	10,03 [4,83-21,24]	4,23 [1,89-10,38]*	8,83 [2,60-14,67]
CD4 ⁺ CD62L ⁺ / CD4 ⁺ (%)	7,84 [0,35-9,28]	4,10 [0,93-9,35]	6,84 [0,97-11,44]



41. ábra. Az immunfenotípus változása allergiás kolitiszben és kontrollban.

Whiskers box-plot: középvonal a medián, a doboz az interkvartilisek, a bajusz a tartományt jelöli.

(A) Regulátoros T sejtek ($CD4^+Foxp3^+$) prevalenciája; (B) Th1/Th2 elkötelezett ($CD4CXCR3^+/CD4CCR4^+$) sejtek aránya; (C) Naív/effektor ($CD4^+CD45RA^+$)/ $CD4^+CD45RO^+$ limfociták aránya. Statisztika: kezdetben vs. kontroll: $p < 0,05$; kezdetben vs. tünetmentesen: $\#p < 0,05$.

VIII. MEGBESZÉLÉS

VIII.1. GYULLADÁSOS BÉLBETEGSÉG

VIII.1.1. Az IBD regiszterrel (HUPIR) kapcsolatos eredmények megbeszélése

Az általam elindított és 2007-óta működtetett országos regiszterünk adatai alapján hazánkban az **IBD incidenciája magas ($7,5/10^5$)** és lényegében megegyezik az észak-amerikai és fejlett európai országokban közölt értékekkel (11,15). Regiszterünk nemzetközi szinten is az első populációs vizsgálat, mely az aktivitási indexeket, a testi paramétereket és a terápiás gyakorlatot egy éves követéssel rögzítette.

A különböző államok, városok epidemiológiai összehasonlítását nehezíti, hogy a különböző felmérésekben az alkalmazott felső korhatár eltérő (15-20 év). Egy USA-ban (Wisconsin) elvégzett, a hazaival összevethető prospektív vizsgálatban a 18 év alattiakban hasonló incidencia értékekkel találkozunk: az észak-amerikai felmérésben az IBD incidenciája $7,05/10^5$, CD-ben $4,56/10^5$, UC-ben pedig $2,14/10^5$ volt (11).

Az elmúlt évtizedekben az IBD növekvő incidenciáját tapasztalták a nyugati kultúrákban mind felnőtteknél, mind gyermekeknél (208,209). A kelet-európai országok felnőtt populációiban is hasonló eredmények születtek, azonban a gyermek populációra vonatkozó adatok hiányosak. A Veszprém megyei IBD regiszter szerint az elmúlt 25 évben a felnőttkori IBD incidencia folyamatosan emelkedett (1977-2001: UC: 1,66-ről $11,01/10^5$ -ra; CD: 0,41-ről $4,68/10^5$ -ra) (210). A 2002-2006 közötti adatok szerint az incidencia tovább nőtt (211), hasonlóképpen a nyugat-európai és észak-európai országokban publikált adatokhoz.

Egy másik figyelemre méltó adat, hogy gyermekkorban a CD incidenciája egyre több felmérésben meghaladja az UC-t. A közelmúltban megjelent, az USA-ban (11), valamint Svédországban (Stockholm, 12) elvégzett prospektív vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a gyermekkori CD incidenciája kétszerese volt az UC-nak. Összhangban ezzel, a HUPIR adatai szerint is az UC incidenciának ($2,32/10^5$ gyerek) kétszerese a CD incidencia ($4,72/10^5$ gyerek).

A **nemek közötti megoszlás** elemzése során megállapítottuk, hogy közel másfélszer (1,44x) több Crohn-beteg fiút regisztráltunk, mint leányt. Ez hasonló a korábban közölt tanulmányok adataihoz (12,212). A jelenség pontos oka ismeretlen (212). UC-ban közel azonos volt a nemek aránya.

Vizsgálatunk nemzetközi szinten is az első, amely prospektív, egy egész országra kiterjed, és leírja a **PCDAI** és **PUCAI** értékeket. Adataink szerint a betegek felének mérsékelt/súlyos aktivitása volt a diagnózis felállításakor mind CD-ben, mind UC-ben. Az egyetlen PCDAI és PUCAI értékeket leíró populációs vizsgálat egy 39 CD-s és 19 UC-s gyermek adatait bemutató Dél-Norvégiából származó tanulmány (213). A PCDAI medián értéke 25, a PUCAI mediánja 35 pont volt ebben a vizsgálatban.

Regiszterünk nyomonkövetéses adatai szerint a betegek aktivitási indexe szignifikánsan csökkent mind CD-ben, mind UC-ben az egy éves kontroll idejére: az IBD-s gyermekek mindössze tizedénél volt mérsékelt/súlyos aktivitás. Dubner és munkatársai is hasonló változásról számoltak be, a medián PCDAI 36-ról 5-re csökkent az egy éves kontrollra (214). Pfefferkorn és munkatársai a mérsékelt/súlyos aktivitású betegek arányát 5%-nak írta le (215). A **betegség viselkedése** (gyulladásos vs. striktúráló/penetráló) a betegség lefolyása során progrediál. A striktúráló/penetráló forma, és a perianális érintettség agresszívebb betegség lefolyással jár, és fokozott kockázatot jelent a sebészeti beavatkozások szükségességének szempontjából. Az újonnan diagnosztizált felnőttek egyharmadánál komplikált formában indul a Crohn-betegség (211). Ezzel ellentétben, egy korábbi tanulmányban a gyermekek többségénél a gyulladásos forma dominál (91,25%) (216), ami összhangban áll a HUPIR-ban talált aránnyal (85,3%). A perianális érintettség szintén hasonló volt a korábbi tanulmányokban leírt arányokkal (15,8% vs. 14,9%) (217).

A **sebészeti beavatkozások** szükségessége a betegség lefolyásának egyik jellemző markere. Mindössze néhány, gyermekek körében végzett elemzésben írták le a betegség első évében történt sebészeti beavatkozások gyakoriságát. A HUPIR-ban talált 4,4%-os arány közel áll az Egyesült Államokban működő Pediatric Consortium-ban bemutatott 6%-os sebészeti gyakorisághoz (218). A HUPIR az első országos gyermek IBD tanulmány, mely az egy éves követés ideje alatt szükségessé vált műtétekről beszámol. A sebészeti beavatkozások ritkábbak voltak azoknál a betegeknél, akiknél a kezdeti PCDAI alacsonyabbnak bizonyult. Ugyanakkor a striktúráló/penetráló forma magasabb kockázatot jelentett műtétek szempontjából, hasonlóan a korábban publikáltakhoz (218). Kolektómia az első évben a kolitisz ulcerózások körében nem történt. Jakobsen és munkatársai a diagnózist követő két évben nem írtak le kolektómiát kolitisz ulcerózás gyermekeknél (219). Gowers-Rousseau és munkatársai egy korábbi vizsgálatban a kolektómia gyakoriságát az első évben 8%-nak, a másodikban 11%-nak, az ötödik évben pedig 20%-nak találták (220). Ebben a vizsgálatban a kolektómia kockázati tényezői az extraintesztinális manifesztáció (diagnóziskor) és a kolitisz nagy kiterjedése voltak.

Felnőtt Crohn-betegekben a sebészet kumulatív gyakorisága az első évben 10-19%, a közelmúltban megjelent tanulmányok szerint. Ez az érték a korábbiakhoz képest csökkenést mutat, feltehetően az immunmodulánsok elterjedésének köszönhetően (221). Lindberg és munkatársai 1962-1987 közötti gyermekpopulációs vizsgálatban az évenkénti sebészeti arányt 13%-nak találták (222). Érdekes módon, ezen adatok alapján gyermek populációban az első év során alacsonyabb volt a sebészeti beavatkozások gyakorisága, mind az immunmoduláció előtti időszakban, mind azt követően. Ebben a közleményben a mérsékelt csökkenés (13%-ról 4,4-7%-ra) megerősítheti a felnőtteknél talált eredményeket. Azonban az alacsonyabb sebészeti arány a gyermekpopulációban figyelem felkeltő, mivel általánosan elfogadott, hogy a gyermekkorban induló gyulladásos bélbetegség súlyosabb lefolyású, mint a felnőttkorban induló (223,224). Továbbá a jellemzően kiterjedtebb bélérintettség miatt is magasabb sebészeti igény volna várható gyermekeknél. Felmerül a kérdés, hogy a gyermekkori CD valóban minden tekintetben agresszívebb-e, mint a felnőttkorban induló forma. A gyulladásos forma dominanciája diagnóziskor és az alacsonyabb sebészeti ráta ellentmond a jellemzően kiterjedtebb (ileokolonikus érintettség felső gasztrointesztinális érintettséggel) betegségnek, gyakoribb EIM-nek és a gyermekekben megfigyelhető növekedésbeli elmaradásnak. Másfelől a sebészeti beavatkozások alacsonyabb aránya tükrözheti a felnőtt és gyermek-gasztroenterológusok eltérő szemléletét. A kortikoszteroidok mellékhatásainak elkerülése érdekében ugyanis gyermekeknél a korai immunmoduláció nagyobb szerepet kap. A gyermekek körében az AZA gyakoribb alkalmazása hozzájárulhat ahhoz, hogy az első évben a sebészeti arány alacsonyabb.

CD-ben a **növekedés elmaradás** a diagnózis idején 9,5-19%, UC-ben 3-10% (225). A HUPIR szerint a növekedés elmaradás gyakorisága alacsonyabb. Az eltérő adatok részben annak köszönhetőek, hogy különböző definíciókat alkalmaznak a növekedés elmaradás meghatározására. Vizsgálatunkban a növekedés elmaradás (testmagasság z score átlaga) az egy éves követés során csak UC-ben javult, CD-ben érdemi változás nem volt. Hildebrand és munkatársai szintén leírták, hogy UC-ben a növekedés elmaradás normalizálódott az első év végére (226).

A **laborparaméterek** (CRP, vérlemezke) gyakrabban voltak kórosak CD-ben, mint UC-ben. Jól ismert, hogy a CRP korrelál a betegség aktivitással, azonban jelentőségét a betegség lefolyása során, a nyomon követésben eddig nem vizsgálták gyermekekben. Felnőtt CD-ben a diagnóziskor mért emelkedett CRP a gyulladásos fenotípussal és az AZA iránti igénnyel pozitív korrelációt mutatott (227). A diagnóziskor rögzített emelkedett CRP a későbbi AZA iránti igénnyel pozitív összefüggésben állt és jó prediktornak bizonyult a rövid- és középtávú

relapszusok terén felnőtt Crohn-betegek körében. Továbbá UC-ben a CRP szorosan összefüggött a betegség kiterjedésének mértékével. Más, a betegség súlyosságát jellemző marker (influximab iránti igény, sebészeti beavatkozások gyakorisága, aktivitási indexek) nem volt szignifikáns összefüggésben a kezdeti emelkedett CRP-vel, sem CD-ben, sem UC-ben.

Regiszterünk adatai alapján **extraintesztinális manifesztációt** (EIM) az IBD-s betegeknél diagnózis felállítása idején 10,9%-ban rögzítettünk. CD-ben az EIM gyakrabban fordult elő, mint UC-ben (12,9% vs. 7%). Leggyakoribb EIM-nek az ízületi érintettség bizonyult. Adataink korrelálnak az észak-amerikai regiszter EIM értékeivel (228). Az EIM felismerése nemcsak a gyermek életminőségét és kezelését befolyásolhatja, de a típusos IBD tünetek jelentkezése előtt kialakuló EIM felhívhatja a figyelmet az IBD-re és elősegítheti a minél korábbi diagnózist.

VIII.1.2. A felső endoszkópia diagnosztikus „hozamának” („diagnostic yield”) megbeszélése

Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a felső gasztrointesztinális rendszerben a CD-s gyermekek 2/3-ában makroszkópos léziót és közel háromnegyedükben mikroszkópos gyulladást igazoltunk. Gyakorlati szempontból ennél fontosabb megállapításunk, hogy a CD-s betegek 9%-ában észleltünk olyan jellemző eltéréseket (fekély, erózió, afta és granulóma), melyek elősegítették a diagnózis felállítását („diagnostic yield”). Vagyis a CD-s gyermekek kb. tizedében a felső endoszkópia segítette a diagnózis fölállítását.

Az UC-s betegeknek csaknem a felében enyhébb fokú makroszkópos és/vagy mikroszkópos elváltozástt regisztráltunk, de ezek az elváltozások aspecifikusak voltak és nem nyújtottak diagnosztikus segítséget.

Korábbi közlemények szintén gyakori felső gasztrointesztinális érintettségről számolnak be az IBD-s gyermekekben. **Makroszkópos eltéréseket** a CD-s betegek 40-64%-ában, míg az UC-s gyermekek 13-50%-ában figyeltek meg. **Mikroszkópos eltéréseket**, nem meglepő módon, még gyakrabban detektáltak: 70-90%-ban CD-ben, és kb 50%-ban UC-ben (95-98). Egy USA-ban végzett prospektív tanulmányban ennél kisebb mértékű felső gasztrointesztinális érintettséget közöltek a PediIBD (Pediatric Inflammatory Bowel Disease Consortium) regiszter adatai alapján, melyben 6 regionális IBD centrum betegeit vizsgálták. Ebben a felmérésben 0-5 év között 5%, 6-12 év között 10%, 13-17 év között 13%-os gasztroduodenális érintettséget találtak a 798 CD-s gyermek adatainak elemzésekor. A közleményből azonban nem derül ki, hogy a felső endoszkópiát rutinszerűen, vagy csak a felső gasztrointesztinális rendszer betegségére utaló tünetek fennállása esetén végezték-e el.

Továbbá a látott elváltozások nincsenek pontosan definiálva és a szövettani vizsgálat is hiányzik (229). Így ez a vizsgálat sem összehasonlításra, sem a precíz diagnosztikus „hozam” megállapítására nem alkalmas.

A korábbi vizsgálatokkal egyezően mi is jelentős százalékban találtunk felső gasztrointesztinális **endoszkópos és hisztológiai eltéréseket gyermekkori UC-ben** is. Ez első pillantásra meglepő, hiszen a betegség neve: kolitisz ulceróza, vagyis a gyulladás a kolonra lokalizálódik.

1997-ben Kaufman 5 olyan kolitiszes gyermekről számolt be, akiknél a kezdeti diagnózis a felső gasztrointesztinális érintettség, krónikus aktív gasztritisz alapján CD volt. A későbbiekben viszont, a hosszú távú nyomonkövetés alapján ezek a gyermekek valójában kolitisz ulcerózásnak bizonyultak (230). Ezt követően több közleményben is beszámoltak felső gasztrointesztinális érintettségéről UC-ben, de az észlelt elváltozások sokszor aspecifikusak és jelenthetik akár a gasztrointesztinális traktusban mindig is jelenlevő fizioiógias gyulladás fokozottabb jelenlétét is. A felső gasztrointesztinális rendszer ennél markánsabb gyulladásának oka nem tisztázott a betegségben. A háttérben eddig nem ismert, a betegséghez társuló immunológiai faktorok hatása feltételezhető, illetve az ezekre adott szekunder immunválasz (231).

A felső gasztrointesztinális traktus **szövettani eltérései UC-ben** nem specifikusak és kevésbé súlyosak, mint CD-ben (232). A nem specifikus, közép súlyos gasztritisz előfordulásában nem észleltek szignifikáns különbséget CD és UC között, vagyis diagnosztikus segítséget nem nyújt. A fokális aktív gasztritisz („focally enhanced gastritis”) szintén mindkét betegségben előfordulhat. Bár CD-ben gyakrabban megfigyelhető, nem mondható ki, hogy ez a CD sajátossága, hiszen korábbi közleményekben a fokális aktív gasztritisz prevalenciáját 43-76%-nak találták CD-ben, és 12-20%-nak UC-ben (233,234). Vizsgálatunk újdonsága pontosan az, hogy a lényegét, vagyis a típusos makroszkópos léziót (afta, erózió, fekély), szövettani vizsgálatnál pedig csak a granulómát tekinti érdemi elváltozásnak egy prospektív, nagy esetszámú vizsgálatban.

Megjegyzésre érdemes még, hogy 35 IBD-s gyermekben (15%) találtunk hisztológiai eltérést (köztük 3 gyermeknél granulómát is), makroszkóposan normálisnak látszó nyálkahártya esetén. Ez megerősíti annak a jelentőségét, hogy biopsziás mintát kell venni a felső gasztrointesztinális traktus minden régiójából, akkor is, ha az endoszkópos kép normális. Másik lehetséges magyarázat lehet még, hogy a szövettani mintákat nem a makroszkópos lézióból vették, hanem közvetlenül mellette lévő területekről. Korábbi vizsgálatok alapján az erózió, fekély közvetlen szomszédságában vett biopsziás mintában lehet a granulómát

legnagyobb találati aránnyal kimutatni. Így előfordulhat, hogy ez ennél messzebből, már az épben történik a mintavétel.

HUPIR regiszterünk adatai alapján az össz **granulóma** 19%-át igazoltuk a felső gasztrointesztinális traktusban és 13%-ban izoláltan csak itt volt kimutatható. Ugyanakkor mindössze egy (2%) kolitiszes betegben verifikáltunk granulómát a felső gasztrointesztinális traktusban, akinél így a diagnózis IBD-U-ról CD-re változott. A nemzetközi adatok alapján a granulóma előfordulása a felső gasztrointesztinális rendszerben gyermekkori CD-ben 24-42%, (235,236). Ez azonban nagymértékben függ a biopsziás minták számától, és a biopsziákból a patológus által készített metszetek mennyiségétől is. A multiplex biopsziás minták jelentőségét és az ebből készített metszetek megfelelő mennyiségét egy philadelphiai közleményben is hangsúlyozták, melyben izoláltan, csak a felső gasztrointesztinális traktusból 13,4 %-ban mutattak ki granulómát a CD-s gyermekekben (235). A tanulmányok szerint a granulomatózus gyulladás a felső gasztrointesztinális traktus bármely részén jelen lehet, de leggyakoribb a gyomorban. Ezt nem csak CD, hanem egyéb kórállapotok is előidézhetik: krónikus granulomás betegség, gombás infekció, *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infekció, a gyomor adenokarcinómája és szarkoidózis is (237). Granulóma kórismézésekor erre is gondolni kell, különös tekintettel a *H. pylori* infekcióra. *H. pylori* jelenléte ugyanakkor nem zárja ki az IBD diagnózist, bár *H. pylori* infekció IBD-ben ritkábban fordul elő, mint a kontroll populációban (238). Ebben a texasi vizsgálatban (344 IBD-s beteg és 4241 kontroll) *H. pylori* negatív gasztritisz az IBD-s betegek 20%-ában (duodenitisz 17 %-ában) volt, míg a kontrollban csak 2%-ban (duodenitisz 2%-ban) fordult elő.

Saját vizsgálatunkban a granulóma kisebb százalékos aránya azzal magyarázható, hogy nem minden betegben és nem minden régióból történt szövettani mintavétel. Irodalmi adatok alapján a felső gasztrointesztinális traktus endoszkópos és hisztológiai eltérései (pl. aftoid típusú nyálkahártya-lézió vagy granulóma) az esetek 25%-ában megerősíthetik a CD diagnózist (216). Ebben a prospektív vizsgálatban 20%-nak (n=11/54) véleményezték az OGD jelentőségét a felső gasztrointesztinális traktusban igazolt granulóma alapján, azonban ebben a tanulmányban 4 betegben (7,4%) ileokolikus lokalizáció állt fenn, mely a CD diagnózisának kimondását a granulóma jelenléte nélkül is lehetővé tette volna. Vizsgálatunkban a CD-re jellemző specifikusabb eltéréseket (erózió, fekély, afta, granulóma) a CD-s gyermekek 1/3-ában (31%) észleltünk, azonban a felső endoszkópia diagnosztikus értéke 9%-ra csökkent, amikor csak az izolált kolitiszes eseteket vettük figyelembe.

Felmérésünkben elemeztük a CD-s gyermekek **betegség-kiterjedését** is, amely az irodalmi adatokkal egyezően a „panentericus” fenotípus dominanciáját (42%) mutatta. Skót és magyar szerzők is a „panentericus” fenotípus (L3+L4) gyakoribb előfordulását írták le CD-s gyermekekben, összehasonlítva CD-s felnőttekkel (43% vs 3 % és 45% vs. 28%) (236,237). Izolált felső gasztrointesztinális érintettséget egy betegnél sem tudtunk igazolni, de ennek gyakorisága az irodalmi adatok szerint is nagyon alacsony (5% alatti) (239).

Prospektív vizsgálatunk egyedisége egyben korlátot is jelent. Egyrészt a nemzetközi szakirodalomban elsőként határoztuk meg egy egész országban a felső endoszkópia diagnosztikus jelentőségét. Korábbi vizsgálatok csak egy, vagy néhány centrum adatait összegezték. Másfelől, mivel az egész ország lefedettségére törekedtünk, vizsgálatunk nem csak IBD centrumok adatait tartalmazza. Ezzel magyarázható, hogy csak a betegek 56%-ában (n=237) végeztek felső endoszkópiát. Ez az arány nem túl magas, de az országos reprezentáció miatt valóságszerűbben tükrözik a mindennapi gyakorlatot. Magyarországon 9 IBD centrumban végzik a felső endoszkópiát protokollszerűen. Ezen centrumok alcsoport analízise szerint felső endoszkópiát a betegek 88%-ában (140/164 beteg) végeztek, amely nemzetközi szinten is kiváló érték. Ezekben a centrumokban specifikus felső gasztrointesztinális eltérést (fekély, afta és erózió) a betegek 35,5%-ában (38/107 beteg) igazoltak, hasonlóan az országos értékhez (31%). Ezen kívül a felső gasztrointesztinális (L4) érintettség aránya sem különbözött érdemben a két csoport között (centrumok vs. országos). Összefoglalásként elmondható, hogy a felső endoszkópiánál CD-re jellemző elváltozást a gyermekek 1/3-ában észleltünk és ez végső soron a CD-s gyermekek 9%-ában segítette a kórismézést. Tekintettel arra, hogy a felső endoszkópia kapcsán szövődmény ritkán jelentkezik, a gyermekkori IBD diagnosztikus algoritmusában a felső endoszkópia elvégzése feltétlenül javasolható.

VIII.1.3. A mannóz-kötő lektin vizsgálata IBD-s gyermekekben

Munkánk az eddigi legnagyobb esetszámú, prospektív vizsgálat, amely az MBL deficiencia előfordulását és a szérumban MBL szinteket vizsgálta gyermekkori IBD-ben. A kontrollhoz képest alacsonyabb átlag MBL szinteket és alacsony MBL szintet (<500 ng/ml) találtuk mind CD-ben, mind UC-ben. Ezen kívül az alacsony MBL szint összefüggést mutatott az izolált terminális ileum érintettséggel, illetve CD-ben az MBL deficiencia (<100 ng/ml) a fiú nemmel.

A korábbi, felnőttekben végzett vizsgálatok alapján az MBL szerepe IBD-ben egyelőre ellentmondásos. Fontos alapismeret, hogy szoros kapcsolat mutatható ki az MBL2 polimorfizmusok és az MBL szérumszintek között, azonban az MBL2 genetikájának ismerete alapján nem lehet a szérumszintet előre megjósolni (240).

Az MBL variánsok gyakorisága (mutáció az 52, 54 és 57-es kodonban) szignifikánsan ritkább volt sporadikus UC-s betegekben (29%), CD-s (43,1%) és kontroll egyénekkel összehasonlítva (40,9%), amely a funkcionális MBL mutációk protektív hatását vetette fel UC-ben (86). Ezzel ellentétben Sivaram és munkatársai az 54-es kodon szignifikánsan gyakoribb mutációit és ehhez társulva alacsonyabb MBL szinteket figyeltek meg a kontrollhoz képest, ugyancsak UC-s betegekben (87). Más tanulmányban az MBL deficiencia gyakorisága és az átlagos MBL szintek a felnőtt CD-s és UC betegekben hasonló volt, mint a kontrollokban (88). Csak egy kis esetszámmal végzett vizsgálatot végeztek gyermekkori IBD-ben, amelyben az MBL2 variánsok előfordulását (az MBL deficienciáért felelős tényezőként) szignifikánsan gyakoribbnak találták CD-ben, mint a kontroll, vagy az UC-s gyermekekben (89).

Eredményeink szerint az **MBL deficiencia** előfordulása az IBD-s, illetve a kontroll gyermekekben hasonló volt, mint a korábbi, felnőttekben végzett kutatásokban (88,241). Azonban a felnőttekben végzett felmérésekkel ellentétben, az **alacsony MBL szint** prevalenciáját gyakoribbnak, az **átlagos MBL szinteket** pedig alacsonyabbnak találtuk az IBD-s gyermekekben, a kontroll csoporttal összehasonlítva. Ezt a különbséget teljes mértékben magyarázni nem tudjuk, különböző genetikai és immunológiai faktorok lehetnek felelősek a jelenségért, hasonlóan ahhoz, hogy a gyermek és felnőttkori IBD számos ponton markáns különbséget mutat (242). A kérdés teljes megválaszolásához további szimultán gyermek és felnőtt IBD-s betegeket vizsgáló tanulmányok szükségesek a jövőben.

Jelen tanulmányunkban nem találtunk összefüggést az **MBL deficiencia** és a vizsgált **szerológiai markerek** (ASCA és pANCA) között CD-ben vagy UC-ben. A korábbi vizsgálatok kapcsolatot találtak a genetikai predispozíció (NOD2/CARD15) és az ASCA antitestek jelenléte között CD-ben (88). Az MBL szerepet játszhat ebben a folyamatban, hiszen képes a *Saccharomyces cerevisiae* megkötésére. Így az MBL deficiencia hozzájárulhat az ASCA termeléshez, hiszen a fokozott mannóz expozíció specifikus immunválaszt és ASCA termelést stimulálhat (243).

Az **MBL szintek** és a **klinikai fenotípus** összefüggésének elemzésekor az alacsony MBL szintek összefüggést mutattak a terminális ileum érintettségével CD-s betegeinkben. Egy

Seibold és munkatársai által publikált közleményben az alacsony MBL szint és a genotípus vékonybél érintettséggel társult (243).

Az **MBL szintek** és a **klinikai fenotípus** közötti összefüggést mostanáig nem vizsgálták gyermekkori IBD-ben. Jelen munkánkban összefüggést találtunk az alacsony MBL szint és a terminális ileum érintettség között. Megfigyelésünket az MBL gén extrahepatikus transzkripciója magyarázhatja a vékonybélben, melyet Seyfath és munkatársai is kimutattak (77). Más vizsgálatban nem találtak szignifikáns MBL2 gén expressziót az intesztinális szövetekben (78). Ugyanakkor ebben a közleményben Müller és munkatársai azt figyelték meg, hogy az MBL deficiencia, a mannózt expresszáló vékonybél patogénekre adott válaszként fokozott ASCA termelést és excesszív experimentális kolitist eredményezett egerekben. Elképzelhető, hogy az MBL2 polimorfizmusok, alacsonyabb MBL szintet eredményezve, a vékonybél bakteriális túlnövekedését eredményezhetik. Így lehetséges, hogy az MBL, mint védő faktor, a fagocitózis fokozása (244), vagy a mikroorganizmusok intesztinális sejtfelszínhez való kapcsolása révén (245) szerepet játszik a vékonybél viszonylagos sterilitásának fenntartásában. Továbbá elképzelhető, hogy az MBL hiány gátolja az apoptotikus sejtek normál eltávolítását és „clearance mechanizmusát”, mely következményesen felfedheti a korábban rejtett saját antigéneket, csökkentheti a saját antigénekkal szembeni toleranciát és autoimmun folyamatok felerősödését eredményezheti (246).

Mivel a **természetes immunitásban** az MBL mellett a TLR2 és TLR4 is igen fontos szerepet tölt be, érthető, hogy a két tényezőt együtt számos gyulladásos folyamatban vizsgálták (247-249). Nazofaringeális kolonizációs vizsgálatokban kimutatták, hogy az MBL és a TLR2, TLR4 polimorfizmusok bizonyos bakteriális kolonizációkra hajlamosították a csecsemőket (248). Újabb tanulmány igazolta, hogy az MBL szénhidrát felismerő lánc kapcsolódik a TLR4 oligoszaharid komponensével, melynek valószínűleg szerepe van a MyD88 mediált jelátvitelben (249). Az MBL TLR4-hez történő kapcsolata dózisdependens, továbbá az MBL-TLR4 interakció gátolja az LPS indukálta NFκB génindukciót, és a következményes citokintermelést (TNFα és IL12) (250). Mivel az MBL és a TLR4 IBD-ben egyaránt kórosan változik (lásd később, a TLR vizsgálatainknál), feltételezhető, hogy ennek szerepe van a patomechanizmusban.

Munkánkban vizsgáltuk az **MBL szintek**, a **CRP** és az **aktivitási indexek** közötti összefüggést. Magyarországi felnőtt IBD-s betegekben végzett felmérés eredményeivel egyezően (88) az MBL szintek nem mutattak összefüggést a CRP és az aktuális betegségaktivitási index értékével, sem CD-ben, sem UC-ben. Ez nem meglepő, hiszen a CRP

koncentrációja gyulladás közben gyorsan, akár 100-1000-szeresére is emelkedhet, szemben az MBL szint mérsékelt (2-3-szoros) és lassú (1-2 héttel a kiváltó esemény után jelentkező) növekedésével (251).

Összefoglalva, vizsgálatunkban az IBD-s gyermekekben alacsonyabb MBL szintet igazoltunk a kontrollokhoz képest. A CD-s és UC-s betegek MBL szintje között nem észleltünk különbséget. Ezen kívül az alacsony MBL szint összefüggést mutatott a terminális ileum érintettségével CD-ben.

VIII.1.4. A PAB, rPAB, GAB, ASCA és pANCA antitestek vizsgálata IBD-ben

Szerológiai vizsgálatunk a legnagyobb esetszámú elemzés a nemzetközi irodalomban, amely a PAB, rPAB és GAB antitestek diagnosztikus értékét, valamint a releváns fenotípus-szerotípus összefüggését vizsgálta gyermekkori IBD-ben. Ezen kívül meghatároztuk az ismert szerológiai markerekkel (ASCA és pANCA) történő kombinációs mintázatot, amely jelentősen javította az alaphelyzetben csekély szenzitivitási értéket.

Vizsgálataink szerint a **PAB pozitivitás** CD-ben (34%) összhangban van a felnőtt IBD-s betegek vizsgálatai alapján ezt megelőzően közölt adatokkal. Az **rPAB prevalenciája** kissé magasabb volt (nem szignifikánsan), mint a PAB-é (CD: 36,5 % vs. 34,3 %, UC: 24,5% vs. 20,4%). A PAB prevalenciáját 27-39%-nak találták felnőtt CD-s betegekben, ezzel szemben UC-ben csak 0-5%-nak (66,69,74). Ismert olyan közlemény is, ahol a PAB antitesteket csak a CD-s betegekben tudták kimutatni (69).

A PAB antitestek specificitása CD és UC vonatkozásában magas, azonban szenzitivitásuk alacsony. Vizsgálatunk egyik legfontosabb gyakorlati értéke, hogy a PAB és ASCA/ANCA tesztek kombinált alkalmazása növeli a **szerológiai markerek szenzitivitását** CD-ben és UC-ben egyaránt (kombináció szenzitivitása CD-ben: 87,4%; UC-ben: 80%). A témával kapcsolatos alap kutatások közül figyelemre méltó, hogy a PAB célantigénje, a GP2, az intesztinális epitel sejtek apikális felszínén expresszálódik és alapvető szerepet játszik a szervezet baktérium-specifikus mukózális immunválaszának kiváltásában (252,253). Vagyis ebben az esetben a GP2 teremti meg a közös pontot a klinikai szerológiai vizsgálat és az IBD patomechanizmusának alap kutatása között.

A korábbi, felnőtt IBD-s betegeket vizsgáló tanulmányokban nem egyértelműek az összefüggések a **PAB antitestek** és a **CD fenotípusa között**. Joossens és munkatársai negatív összefüggést figyeltek meg a PAB antitestek, és a szűkülettel járó CD fenotípus között (71). Ezzel ellentétben, más vizsgálatokban a PAB gyakoribb előfordulását mutatták ki szűkülettel járó és a penetráló fenotípus esetén (70,75). Ezen kívül összefüggést igazoltak PAB

pozitivitás és a perianális érintettség, valamint az extraintesztinális manifesztációk között (70). Jelen tanulmányunkban a PAB sem a gyermekkori CD-ben, sem a gyermekkori UC-ben nem mutatott összefüggést a klinikai tünetekkel, a lokalizációval, a gyógyszeres kezeléssel, a sebészi beavatkozás szükségességével és az extraintesztinális manifesztációkkal sem.

Bogdanos és munkatársainak új, megjelenés alatti közleményében CD-ben az anti-GP2 antitest jelenléte (rPAB analóg, 2-es típus) korrelált az ileokólikus lokalizációval és a striktúrás formával, perianális érintettséggel (252). Ebben a felnőtteket és adolescens korban levő IBD-s gyermekeket elemző tanulmányban érdekes módon a gyermekekben az anti-GP2 antitest szignifikánsan gyakoribb volt az L3 (ileokólikus) lokalizációnál. Sajnos a 271 betegből csak 31 volt gyermek, amely ezt a konklúziót gyengíti. Mivel a gyermekkori CD-n belül az egyre fiatalabb életkor inkább kolon érintettséggel jár (L2), joggal tételezhető fel, hogy egy nagyobb esetszámú és fiatalabb gyermekeket bevonó vizsgálatban az általunk igazolt eredményt kapnánk, vagyis, hogy nincs összefüggés a PAB és a lokalizáció között. Összegezve: felnőttekben a gyakoribb terminalis ileum érintettség (L1) lehet az oka annak, hogy a PAB összefüggést mutathat a súlyosabb formával (penetrancia, szűkület, perianális érintettség).

Felnőttkori UC-ben **kehelysejt elleni antitesteket (GAB)** mutattak ki felnőttekben (69). A kehelysejtek mucint termelnek, melynek egyrészt viszkózus anyagként lubrikáns szerepe van, másrészt a különböző mikrobák megkötésével nem specifikus védelmet nyújt, így szerepet játszik az intesztinális homeosztázis fenntartásában.

Korábbi tanulmányokban a GAB antitesteket 28-30%-os prevalenciával igazolták UC-s betegekben (69). Más közleményben azonban ennél alacsonyabb előfordulásról számoltak be mindkét betegségben (70). Ezek az eltérések valószínűleg a nem teljesen homogén beteganyagból és az eltérő módszertani különbségekből erednek, mert a vizsgálatokat ELISA vagy immunfluoreszcens módszerrel végezték.

Gyermekekben végzett vizsgálatunkban a felnőtt UC-s betegekben igazolt GAB prevalenciánál alacsonyabb előfordulást (12,2%) találtunk. Ennek egyik lehetséges magyarázata lehet a betegek fiatalabb életkora. A korábbi adatokkal összhangban (70) UC-s betegeinkben nem tudtunk összefüggést kimutatni a **GAB antitestek** és a **betegség** fenotípusa, a terápia, a sebészi beavatkozás igénye vagy az extraintesztinális manifesztációk között. Eredményeink alapján a GAB antitestek klinikai alkalmazhatósága a gyermekkori IBD diagnosztikájában csekély, így elemzése nem ajánlott.

Jelen vizsgálatunkban az **ASCA és pANCA** antitestek megjelenését is elemeztük, bár ezek megoszlásáról már számos gyermekkori adat ismert IBD-ben (61,64). Hazai, nagy esetszámú

vizsgálat ebben a témakörben még nem volt, ezért, valamint a PAB és GAB antitestekkel történő, nemzetközi viszonylatban is újdonságnak számító együttes meghatározás miatt vontuk be tanulmányunkba ezt a két szerológiai faktort.

Vizsgálataink alapján az **ASCA prevalenciája CD-ben** (72,8%) hasonló volt az előzőekben publikált gyermekgyógyászati adatokhoz (44-76%) (61,64,255,256). Az egyes tanulmányok közötti különbségeket az eltérő vizsgálati módszerek, a nem homogén életkor (5 év alatt ASCA, pANCA kevésbé termelődik) és a vizsgált betegek eltérő fenotípusa magyarázhatja. Az ASCA antitestek jelentősége CD-ben ismeretlen, leginkább a fokozott intesztinális permeabilitás és bizonyos genetikai tényezők (NOD2/CARD15) állnak kialakulásuk hátterében. Ez utóbbit bizonyítja, hogy az ASCA pozitívitas gyakoriságát 20-25%-nak találták a CD-s betegek első fokú rokonaiban, míg egészséges egyénekben csak ritkán (0-5%) mutathatók ki ezek a pékélesztő elleni antitestek. Tanulmányok bizonyítják, hogy az ASCA antitestek jelenléte összefüggést mutat felnőttekben a fiatalabb életkorral a betegség kezdetekor, az ileális érintettséggel, a sztenotizáló (B2) és penetráló (B3) formával, valamint a sebészi beavatkozások emelkedett rizikójával (256).

Eredményeink igazolták ezeket az összefüggéseket: ASCA pozitívitas és a szövődményes (penetráló és sztenotizáló) betegség, valamint a perianális érintettség között. Ezen kívül azokban a CD-s betegekben, akikben nagyobb számú ASCA antitest válasz volt jelen, a szövődmények (B2, B3) és a perianális komplikációk jelenlétét nagyobb gyakorisággal észleltük.

Érdekes módon az **ASCA pozitívítást UC-s** betegeinkben magasabbnak találtuk a korábbi közlemények eredményeivel összehasonlítva. Ennek hátterében valószínűleg az áll, hogy UC-s betegcsoportunkban a primer szklerotizáló kolangitiszes (PSC) betegek száma viszonylag magas volt (13/49 beteg). Egy közlemény ugyanis arról számolt be, hogy a PSC-s betegekben az ASCA megjelenése magas (44%) (257). Eredményeinknél ezt a tényt figyelembe véve, az ASCA antitestek jelenléte a nem PSC-s UC-s betegeinkben más publikációk eredményeihez hasonló volt (258).

Újabb adat, hogy újonnan kórismézett CD-ben az alacsony súly és testmagasság pozitív összefüggést mutatott az ASCA jelenlétével (259).

A **pANCA prevalenciáját** a korábban publikált eredményekkel egyezőnek találtuk UC-ben és CD-ben is (UC: 77,5%, CD: 33%) (61). Bár a pANCA elsősorban UC specifikus marker, a CD-s betegek kb. negyedében is kimutatható, leginkább ott, ahol a CD a kolonra lokalizálódik (260). Ismertek olyan közlemények is (hasonlóan saját adatainkhoz), ahol a pANCA pozitívitas és a CD lokalizációja között nem volt korreláció (261).

Vizsgálatunkban elemeztük a **kombinált markerek diagnosztikus pontosságát** is. A korábbi, felnőtt IBD-ben igazolt adatokkal egyezően a PAB specificitását 100%-nak, szenzitivitását azonban alacsonynak (CD: 34%, UC: 20,4%) találtuk. A szenzitivitás az ASCA, illetve pANCA kombinációk alkalmazásával emelkedett (CD-ben: 87,4%, UC-ben: 80%). Emellett a kombinált markerek specificitása csak kismértékben csökkent, ezt CD-ben 89,3%-nak, UC-ben 94,2%-nak találtuk.

Szerológiai eredményeinket összefoglalva kijelenthetjük, hogy a pankreász- és kehelysejt elleni antitestek specifikusak ugyan IBD-re, de alkalmazásuk önmagukban -alacsony szenzitivitásuk miatt- diagnosztikus célból nem javasolt. Szerológiai markerek kombinált alkalmazása azonban a szenzitivitást fokozza, ezért használatuk a gyermekkori IBD diagnosztikájában előnyös lehet.

VIII.1.5. A TLR2, TLR3 és TLR4 expressziójának vizsgálata krónikus gyulladásos bélbetegségben szenvedő (IBD-s) gyermekek kolon nyálkahártyájában (199)

Vizsgálatunkban elsőként elemeztük a természetes immunitásban fontos TLR2, TLR3 és TLR4 expressziót frissen kórismézett (fd) IBD-s, kezelt, relapszusban lévő (r) IBD-s és kontroll gyermekek kolon nyálkahártyájában. Új adataink értékét az is növeli, hogy a frissen kórismézett betegek kezelést nem kaptak, vagyis az immunszuppresszió alkalmazása nem befolyásolta az eredményeket. Másrészt ugyanabban az egyénben a kóros-gyulladt és makroszkóposan ép mukózát is elemeztük. Ez a mintavételi módszer azért volt fontos, mert az adott IBD-s betegből a 2 különböző minta (gyulladt és nem gyulladt), értelemszerűen ugyanabban a genetikájú egyénben, ugyanolyan környezeti tényezők, táplálkozás melletti mintavételt jelentette.

Vizsgálatainkban a **TLR2 és TLR4** mRNS és fehérje expresszió szignifikánsan fokozódott mind az fdIBD-s, mind az rIBD-s gyermekek kolon nyálkahártyájának gyulladásban lévő szakaszán a kontrollokhöz képest. Mindkét aktív IBD-s populációban a gyulladt- és nem gyulladt területek hasonló mértékben expresszálták a TLR-eket. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a TLR2 és TLR4 fontos-, de nem iniciáló szerepet töltenek be az IBD patomechanizmusában.

Állatkísérletek alapján ismert, hogy a TLR4 mutáns (C3H/HeJBir) és TLR4 hiányos egerek fokozottan érzékenyek a dextrán-szódium-szulfát (DSS) indukált kolitiszre, a vad típusúakhoz képest (262). Ez arra utal, hogy az intesztinális epiteliális barrier integritásához szükséges a

megfelelő TLR4 működés, hiszen a kommenzális baktériumok által közvetített védelem jelentősen meggyengül a TLR4 csökkent működésekor (263). Az intesztinális epiteliális barrier védelmében a kommenzális baktériumok által indukált TLR2 jelátvitel is szerepet játszhat, bár - ellentétben a TLR4-gyel - a TLR2 csökkent funkciója önmagában nem növeli az epiteliális permeabilitást (264).

A TLR-ek expresszióját IBD-s gyermekekben korábban még nem vizsgálták, felnőttekben is csak néhány közlemény ismert. Elke Cario E és munkatársai már kezelt, felnőtt IBD-s betegek és kontrollok terminális ileum-, valamint kolon biopsziás mintáiban határozták meg a TLR2-TLR5 expressziót (265). A TLR4 fehérjeszint az IBD-s betegek kolon nyálkahártyájának gyulladásban lévő- és gyulladásban nem lévő szakaszán is megemelkedett, míg a TLR2 és TLR5 fehérjeszint változatlan maradt a kontrollokhoz viszonyítva. A TLR3 fehérjeszint a CD-s kolon nyálkahártyájának gyulladásban lévő- és gyulladásban nem lévő szakaszán is csökkent, míg UC-ban változatlan maradt a kontrollokhoz képest.

Eredményeink részben korrelálnak ezekkel az adatokkal, hiszen az IBD-s gyermekek kolon nyálkahártyájának gyulladásban lévő szakaszán mi is magasabb TLR4 fehérjeszintet detektáltunk. Ellenben az IBD-s gyermekek kolon nyálkahártyájának gyulladásban nem lévő szakaszán a TLR4 fehérjeszint nem tért el a kontrolloktól. Továbbá az IBD-s gyermekek kolon nyálkahártyájának gyulladásban lévő szakaszán magasabb TLR2 fehérjeszintet igazoltunk, ami szintén ellentétes Cario és munkatársainak adataival. A különbségek adódhatnak a betegek eltérő életkorából (felnőttek/gyermekek), az eltérő kontroll csoportból (polipektómián, rákszűrésen résztvevők/bélvérzés, székrekedés miatt vizsgált), illetve metodikai okokból.

Egy másik, szintén felnőtt IBD-s populációban TLR1-TLR5 expressziót vizsgáltak szigmoid divertikulitiszes betegeket kontrollokkal összehasonlítva (266). A kontrollok kolon nyálkahártyájában nem tudtak kimutatni TLR1-TLR5 expressziót. A TLR2, TLR4 és TLR5 expresszió gyulladásfüggően indukálódott és expresszáldott a kolon intramukózális makrofágjaiban. Eredményeink korreláltak ezekkel az adatokkal, hiszen a TLR2 és TLR4 gyulladásfüggő expresszióját a kolon mukózában mi is igazoltuk.

A harmadik vizsgálatban szintén felnőtt IBD-s betegek kolon nyálkahártya dendritikus sejtjeinek (DC) TLR2 és TLR4 fehérjeszintjét vizsgálták FACS-al (267). Az egészséges kontrollok mukózális DC-i csak kis mennyiségben expresszáltak TLR2-t és TLR4-et, míg IBD-ben mindkét TLR expresszió szignifikánsan emelkedett, hasonlóan a mi eredményeinkhez. Ebben a közleményben nem találtak összefüggést a betegek immunszuppresszív kezelése (AZA) és a TLR pozitív DC-k száma között, bár a szerzők nem

tértek ki arra, hogy az IBD-s betegek remisszióban, vagy relapszusban voltak-e a biopszia vételének időpontjában.

Az IBD-ben kimutatott fokozott TLR2 és TLR4 expresszió kialakulására az egyik lehetséges magyarázat, hogy az epiteliális barrier károsodása következtében a bélnyálkahártya sejtjei nagyobb mértékben érintkeznek a lumenális bakteriális antigénnel és ez vezet a TLR-ek fokozott expressziójához (266). Másfelől korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a bakteriális komponensek mellett bizonyos citokinek és nekrotizáló sejtkomponensek is módosíthatják a TLR-ek expresszióját. Ezek az INFgamma és a TNFalfa, melyek jelentős patofiziológiai szerepet töltenek be az IBD kialakulásában, mivel fokozzák a mukózális epiteliális sejtek TLR4 expresszióját (268,269). Hasonló folyamatok játszódnak le hipoxiás körülmények között is: vese iszkémiás károsodásakor a renális epiteliális sejtek TLR2 és TLR4 mRNS expressziójának fokozódása INFgamma és TNFalfa hatására következik be (270).

Figyelemre méltó az a közelmúltban megjelent publikáció, ahol Bechet-kórban elemezték a NOD2 és a TLR expressziót (271). A kórkép azért érdekes, mert a klinikai kép nagyon hasonló lehet IBD-hez (hasfájás, fogyás, véres széklet, ízületi fájdalom, ízületi gyulladás), sokszor differenciáldiagnosztikai problémát jelentve a mindennapi gyakorlatban. Ebben a vizsgálatban Bechet-kóros betegekben a NOD2 és a TLR2, TLR4 mRNS expresszió szignifikánsan fokozott volt a kontrollhoz képest. A TLR2 és TLR4, valamint a NOD2 szinergista módon fokozta a proinflammatorikus citokinek (Th1) expresszióját, amit a fokozott T-bet mRNS megjelenés is jelzett.

Egy másik vizsgálatban Bechet-kóros betegek perifériás vérének sejtjeit (PBMC) és intesztinális mukózáját párhuzamosan elemezték (272). Itt is, hasonlóan a mi eredményünkhöz, csak az érintett lézióban találtak fokozott TLR2 és TLR4 expressziót. A sejtes elemek közül a CD68 és a TLR2 pozitív makrofágok töltötték be a legfontosabb szerepet a Th1 irányba generált citokinek termelésével és indukciójával, melyben központi szerepe az általuk termelt IL12-nek volt. Kiemelésre érdemes, hogy a TLR2 ligandja a PBMC-k felszínén és az intesztinális mukózában is a HSP60 volt.

IBD-s gyermekekben a TLR expresszió vizsgálatáról publikált közleményünk megjelenése óta az elmúlt években számos tanulmány és citáció született, melyek igazolták, hogy a fokozott TLR expresszió elősegíti a mikrobiális produktumok felismerését és fokozza a velük szemben kialakuló immunválaszt (273,274). A mikrobiális termékek és citokinek által aktivált TLR-eken keresztül a CD40 expresszió fokozódik az IBD-s betegek gyulladásban lévő mukózájában (275,276). A CD40/CD40L interakció a dendritikus sejtekben Th1 irányú

citokinválaszt generál (TNFalfa, IL1, IL6, IL8), amely fontos szerepet játszik az IBD patogenezisében (277,278).

Részleteiben nem ismert viszont, hogy a fokozott TLR2 és TLR4 expresszió mennyiben tölt be központi szerepet az IBD patomechanizmusában. Mennyiben tekinthető iniciatív faktornak és mennyiben csak egy következményes, gyulladásal kapcsolatos jelenségnek?

Vizsgálataink alapján, miszerint a frissen kórismézett és a kezelt, de relapszusban levő betegekben a mukózális TLR2 és TLR4 egyaránt magas volt, továbbá a makroszkóposan nem érintett IBD-s mukózán megjelenő expresszió a kontrollhoz hasonló volt, arra utal, hogy a TLR inkább a gyulladás elmélyítésében tölt be fontos szerepet, a korábban leírtak szerint (mukózális károsodás, permeabilitás növekedés).

Más vélemények szerint gyulladásos mediátorok hatására TLR pozitív DC-k vándorolnak újonnan a vérből a gyulladásban lévő mukózába és ez vezet a fokozott TLR expresszióhoz (279). Ennek az elméletnek ellentmond, hogy a gyulladt bélnyálkahártya intesztinális DC sejteiben nem tudtak kimutatni fokozott TLR1 és TLR3 expressziót (266).

Akár primer, akár szekunder szerepet játszik a TLR az IBD patomechanizmusában, az biztos, hogy fontos tényező, és a jövőben akár terápiás cél („target”) is lehet, hasonlóan az anti-TNFalfa terápiához. Korábban alapkutatások igazolták, hogy a TNFalfa fontos szerepet játszik IBD-ben. Bár nem csak ebben a kórképben fontos, és nem kiváltó tényező, az elmúlt másfél évtizedben mégis óriási sikert és előrelépést jelentett az anti-TNFalfa terápia az IBD kezelésében (280,281).

Eredményeinket összefoglalva megállapítható, hogy a fokozott TLR2 és TLR4 expressziónak szerepe van az IBD patogenezisében. Azonban az a tény, hogy a TLR2 és TLR4 expresszió csak a gyulladt mukózában volt emelkedett, arra utal, hogy szerepük nem elsődleges, azaz nem a betegség kiváltásáért felelősek, hanem másodlagos, vagyis a betegség fenntartásában játszanak szerepet.

VIII.1.6. Az iAP expressziójának vizsgálata gyulladásos bélbetegségben szenvedő (IBD-s) gyermekek kolon nyálkahártyájában (200)

Az IBD-s gyermekekben végzett TLR kutatásunkhoz szervesen kapcsolódik az intesztinális alkalikus foszfatáz (iAP) vizsgálata, hiszen ez az enzim defoszforilálja az LPS-t, ezáltal egy inaktív, nem toxikus formát hoz létre. Ez a defoszforilálás lehetetlenné teszi az LPS és a TLR4 közötti interakció kialakulását, így a veleszületett immunválasz aktiválódása nem következik be, a mukózális integritás nem sérül (17).

A nemzetközi szakirodalomban elsőként vizsgáltuk az iAP enzimet olyan IBD-s gyermekekben, akik terápiában még nem részesültek. Továbbá elsőként elemeztük az iAP megjelenését fehérjeszinten és a TLR4-gyel történő esetleges közös megjelenését. Vizsgálatainkkal igazoltuk az iAP csökkent expresszióját IBD-s gyermekek gyulladt kolon mukózájában és a TLR4-gyel történő együttes előfordulását.

Korábban csak egyetlen humán tanulmány jelent meg, amely felnőtt IBD-s betegekben vizsgálta az iAP szerepét, de itt a betegek már immunszuppresszív kezelésben részesültek és nem mérték az iAP fehérje mennyiségét sem. Ebben a vizsgálatban csökkent LPS-defoszforiláló aktivitást találtak, amelyet az iAP aktivitás csökkenésével magyaráztak. Eredményeik szerint ugyanis az iAP mRNS expresszió csökkent a CD-s felnőtt betegek gyulladt mukózájában, a kontroll mintákhoz képest (183). A mi vizsgálatunkban az iAP mRNS expressziója a vizsgált csoportok között szignifikánsan nem különbözött. Az eltérésre egyik lehetséges magyarázat, hogy Tuin és munkatársainak közleményében a betegek több mint fele immunszuppresszív kezelésben (influximab, metotrexát, kortikoszteroidok és tiopurin) részesült a mintagyűjtés idején, amelyek nagymértékben befolyásolhatják az iAP mRNS szintézisét. Ezt a gondolatmenetet erősíti egy olyan tanulmány, amelyben kimutatták, hogy a gyulladt szövetek által termelt reaktív oxigén gyökök a mukózális sejtek megnövekedett iAP aktivitását okozzák (282). Vagyis mi, legalábbis részben, azért nem tudtuk mRNS szinten a csökkenést kimutatni, mert a betegeink még kezelést nem kaptak.

Klinikai relevancia szempontjából az mRNS-nél sokkal fontosabb, hogy a transzlációkor ebből mi valósul meg; létrejön-e az enzim, kialakul-e az aktív fehérje? Ha hiányzik, beadásának lehet-e terápiás konzekvenciája? Éppen ezért kiemelt jelentőségű, hogy eredményeink alapján kezelésben még nem részesült IBD-s gyermekek kolon nyálkahártyáját vizsgálva csökkent iAP fehérjeszintet mutattunk ki, amely a korábbi vizsgálatok alapján csökkent LPS detoxifikációval, következményesen megnövekedett TLR4 aktivációval jár. Immunfluoreszcens vizsgálatunk egyértelműen igazolta, hogy az iAP és a TLR4 térben szorosan együtt expresszálódik.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy kezeletlen IBD-s gyermekekben csökkent az iAP fehérje. Ennek alapján felmerül, hogy az iAP adásnak esetleg adjuváns terápiás szerepe lehet az IBD kezelésében a jövőben. Ezt támasztják alá korábbi vizsgálatok is: több állatmodellben kimutatták az iAP bélgyulladásra gyakorolt kedvező hatását. IAP knock-out (KO) és vad-típusú (WT) egerek összehasonlító vizsgálatában az iAP KO egerekben megnövekedett bakteriális transzlokációt és TNFalfa expressziót mutattak ki, a WT állatokhoz képest (283). Egy másik, DSS által indukált kolitiszes modellben az iAP KO állatokban a bélgyulladás

súlyosabb volt, továbbá az orálisan adott iAP tabletta mindkét csoportban csökkentette a kolitisz tüneteit (284). Ezeket a pozitív hatásokat egy újabb tanulmány is igazolta (iAP adásra csökkent kolitisz és bakteriális transzlokáció), amelynek újdonsága az volt, hogy az iAP kezelést rektális enema (beöntés, klízma) formájában is alkalmazták (285). Az összehasonlító vizsgálatok azt mutatták, hogy a lokális, klízmás beadás az orális kezelésnél hatékonyabbnak bizonyult. Ennek humán vonatkozása is lehet a jövőben, hiszen kolitiszes gyermekekben is lehetne az iAP-ot klízma formájában alkalmazni.

A korábban említett, felnőtt IBD-s betegeket elemző iAP tanulmányban DSS indukált kolitiszes patkánymodellt is vizsgáltak: iAP tablettás terápiás intervenciót alkalmazva (183). A székletben mért iAP enzimaktivitás megemelkedett az iAP tabletta hatására, a kolitisz tünetei pedig makroszkóposan és mikroszkóposan egyaránt csökkentek a placebo csoporthoz képest (183).

Az állatkísérletek mellett egy felnőtt UC-s betegekben végzett „pilot” vizsgálat is igazolta az iAP kezelés kolitiszre gyakorolt jótékony hatását (286). Ebben a cseh tanulmányban 21 hagyományos kezelésre rezisztens beteget (23-54 év) vontak be, ahol a betegek 30.000 egység iAP-enzimet kaptak intraduodenálisan. A kezelés után 3 héttel az aktivitási index, a C-reaktív protein és a széklet kalprotektin szintjei szignifikánsan csökkentek. Ezek az eredmények ígéretesek, iAP adása a jövőben javasolt lehet az IBD adjuváns terápiájaként, de fontos megjegyezni, hogy ebben a vizsgálatban hiányzott a placebo kontrollcsoport (286), így még további vizsgálatok szükségesek.

VIII.1.7. Immunfenotípus elemzés aktív és remisszióban levő CD-s gyermekekben (201)

Immunfenotípussal kapcsolatos PBMC-s vizsgálatunkban **frissen diagnosztizált CD-s** gyermekekben a **veleszületett immunitásban** szerepet játszó NK és NKT sejtek alacsonyabb prevalenciáját találtuk, Th2 eltolódással párhuzamosan. Ezen kívül az antigén prezentáló sejtek, így a monociták és DC-k prevalenciájának, valamint az mDC/pDC arányának növekedését is megfigyeltük. Ezek az immunsejtek az immunválasz elindítói, így az effektor, vagy memória sejtek arányának növekedéséhez is hozzájárulnak. Az újabb adatok alapján megállapítható, hogy az mDC és pDC szubpopulációknak sajátos szabályozó szerepük van, mert az mDC sejtek a citokin miliótól függően az immunválaszt nem csak Th1, hanem Th2 irányba is tolhatják (287). Ez magyarázhatja (mDC/pDC arány növekedése) a perifériás vérben megfigyelt Th2 dominanciát. További új eredményünk, hogy a frissen kórismezett CD-s betegekben a TLR2 és TLR4 markereket expresszáló monociták és DC-k prevalenciája

magasabb volt az egészséges kontrollokhöz képest. Ezzel az adattal korrelál korábban ismertetett közleményünk eredménye: a frissen kórismézett CD-s gyermekek mukózájában fokozott TLR2 és TLR4 expressziót találtunk (199).

Újjonnan kórismézett CD-s betegekben az **adaptív immunitással** kapcsolatos paraméterek közül kiemelendő, hogy a perifériás CD4⁺ sejtek prevalenciája nem különbözött a kontrolltól, hasonlóan a korábban felnőtt IBD-s betegek vizsgálata alapján publikált adatokhoz (288). Ezen kívül, a felnőttkori eltérésekhez hasonlóan (289-291), az aktivált CD4⁺ sejtek magasabb arányát találtuk. Előzetesen feltételeztük, hogy ennek hátterében a Treg sejtek alacsonyabb száma áll, hiszen felnőtt IBD-s betegekben ennek a sejttypusnak alacsonyabb prevalenciáját figyelték meg (292). Eredményeink ezt a feltételezést nem igazolták, mivel a FoxP3⁺ sejtek prevalenciája nem tért el a kontrolloktól. Ez az eredményünk tehát ellentétben áll az IBD-s felnőttekben leírtakkal. A különbség hátterében az életkori sajátosságok mellett az állhat, hogy vizsgálatunkban a Treg sejteket nem CD25^{hi} expresszió alapján, hanem a sokkal specifikusabb FoxP3⁺ transzkripciós faktor révén azonosítottuk.

A különböző metodikák közti különbségességet ki lehet záni, ha egyszerre, ugyanazzal a technikával mérünk gyermek- és felnőttkori IBD-s mintákat egyaránt. Ezt alkalmazták egy norvég tanulmányban, ahol IBD-s betegekből (gyermek és felnőtt) vett intesztinális mukózában határozták meg a FoxP3⁺ Treg sejteket és a CD25⁺ aktivált makrofágokat (293). Mindkét sejttypus expressziója fokozott volt, a gyermekkori és a felnőttkori mintákban egyaránt, azonban érdekes módon a terminális ileumban a Treg sejtek gyermekkori megjelenése nagyobb arányú volt, mint felnőttkorban. A szerzők ezzel magyarázták azt a jól ismert tényt, hogy gyermekkorban az izolált terminális ilum érintettsége ritkább, mint felnőttkorban.

Immunfenotípus vizsgálatunk másik részében CD-s gyermekekben elemeztük a **kezelés hatását** az aktivitási index (PCDAI) függvényében. Remisszióban a **veleszületett immunválaszt** szabályozó NK és NKT sejtek aránya megnövekedett, továbbá az mDC/pDC aránya, valamint a TLR2-t és TLR4-et expresszáló monociták és DC-k prevalenciája normalizálódott. Tehát az immunszuppresszív kezelés következtében, a PCDAI normalizálódásával együtt a jellegzetes immunfenotípus eltérések visszatértek a kiindulási szintre. Ez részben eltér az IBD-s felnőttekben leírtakkal, ahol az aktivált és effektor T sejtek prevalenciája magasabb maradt a terápia ellenére (294,295), továbbá UC-ben a Treg sejtek száma még magasabbak volt, mint CD-ben (296). Vizsgálataink alapján a Treg sejtek feltehetően nem játszanak szerepet a remissziós folyamatban, ugyanis prevalenciájuk változatlan maradt az aktivitás megszűnése után. Itt az **adaptív immunitás** oldaláról azt

találtuk, hogy a Th1 prevalencia megnőtt a kezelést még nem kapókhoz képest, továbbá a Th1/Th2 aránnyal együtt normalizálódott az első remisszió alkalmával.

Immunfenotípus vizsgálatunk harmadik részébe **relapszusban** lévő, a hagyományos kezelésre nem reagáló CD-s gyermekeket vontunk be és kezeltünk **infiximabbal** (IFX). Ezekben a betegekben a természetes- és a veleszületett immunitás fenotípusa hasonló volt a kezelésben még nem részesültekéhez.

Az IFX kezelés következtében a **veleszületett immunitás** sejtes elemeinek, így az mDC-knek, a TLR2-t és TLR4-et expresszáló DC-knek prevalenciája és az mDC/pDC sejteknek aránya normalizálódott. Másfelől az IFX terápia adását követő 6. héten markáns eltéréseket figyeltünk meg a relapszusos állapothoz képest: a Th1 és APC-k prevalenciája normalizálódott.

Érdekes módon, az **adaptív immunitás** elemei közül az aktivált T sejtek, memória sejtek és FoxP3⁺ Treg sejtek prevalenciája tovább emelkedett az IFX kezelés hatására. A Th1 irányba elkötelezett sejtek és citokinek arányának növekedését reumatoid arthritiszben már leírták IFX kezelés hatására (297), továbbá ismert, hogy az IFX növeli az aktivált és effektor T sejtek prevalenciáját a perifériás vérben (298). Ennek hátterében az állhat, hogy az IFX gátolja a Th1 és aktivált T sejtek vándorlását a gyulladásos területekre, ezáltal azok felszaporodnak a perifériás vérben (299).

Érdekes módon, az IFX kezelés a Treg számot is növelte a vizsgált betegekben. Ez a jelenség már ismert volt felnőtt CD-s betegek perifériás vérében (292) és CD-s gyermekek mukózális mintáiban is (300). Magyarázata feltehetően az, hogy a Treg sejtek ellenállóbbak az IFX indukálta apoptózissal szemben.

Mivel téziseim egy részében központi elem a természetes és az adaptív immunrendszer kölcsönhatásainak elemzése, figyelemre méltó az a közlemény, amelyben IBD-s gyermekek PMBC sejteit TLR agonistákkal stimulálták és elemezték a következményes pro- és anti-inflammatórikus citokin expressziót. Az aktív IBD-s gyermekek TLR agonistára fokozott IL6 termeléssel reagáltak. A CD-s gyermekek hasonló stimulusra anti-inflammatórikus citokinprofilt mutattak, ellenben Candida hatásra proinflammatorikus citokineket (IFN γ és IL17) generáltak (301).

A természetes és adaptív immunitásnak a növekedésre kifejtett hatását egy komplex, gyermekkori IBD-s betegeket és állatmodellt egyaránt alkalmazó kísérlet igazolta, ahol az LPS és az emelkedett gyulladásos aktivitás korrelált a növekedési zavarral (302). Az állatmodellben a vad típusban generált kolitisz (TNBS adás) együtt járt a TNF α , IL6, IL10 citokinek és a Treg sejtek számának emelkedésével. Kiemelésre érdemes, hogy a TLR4

hiányos egerben egyrészt csökkent a gyulladásos aktivitás, másrészt a Foxp3 Treg sejtek expansiója is visszafogottnak bizonyult. Ezeknek a hatásoknak az lett a klinikai következménye, hogy csökkent a TNBS indukálta súlycsökkenés. A mi vizsgálatunkban IFX kezelés mellett a CD-s gyermekek testsúlya szintén emelkedett.

Bár immunfenotípus vizsgálatunkban a regulátoros makrofágok megjelenését nem elemeztük, figyelemre méltó az a kutatási eredmény, ahol felnőtt IBD-s betegekben IFX kezelés hatására aktivált regulátoros makrofágok mukózális expansióját mutatták ki és ezek jelenléte összefüggött a mukózális gyógyulással (303). Ezen kívül IFX és AZA együttes adása nagyobb mértékben indukálta a regulátoros makrofágok megjelenését, mint az IFX monoterápia. Gyermekekben ilyen vizsgálatot még nem végeztek (304).

Összefoglalásképpen megállapíthatjuk, hogy a frissen kórismézett Crohn beteg gyermekekben a felnőttektől eltérő immunfenotípus eltérések vannak jelen. Továbbá a veleszületett és az adaptív immunitást is érintő eltérések a remisszióba kerültekben a hagyományos terápiát követően többnyire normalizálódtak, míg a relapszusban lévőkben csak az infliximab kezelés hatására változtak.

VIII.2. CÖLIÁKIA

VIII.2.1. Klaudin (CLDN) expresszió cöliákiás gyermekek proximális és disztális duodenumában (202)

Klaudinokkal kapcsolatos kutatásunkban a CLDN expresszió mellett azt is vizsgáltuk, hogy vajon a proximális, vagy a disztális duodenum jelzi-e jobban a boholykárosodást. Vizsgálatunk alapján megállapítható, hogy a mindennapi gyakorlatban a duodenum proximális és disztális régiója egyaránt alkalmas a cöliákiás egyének boholykárosodásának igazolására. Bár disztális területen a károsodás mértéke és a CD3 denzitás magasabb volt, mint proximálisan, a különbség nem érte el a szignifikancia határát. A CLDN2 és CLDN3 expressziója a disztális régióban nagyobb volt, mint proximálisan, ez indirekt módon kissé jelentősebb mukózális károsodásra utalhat, bár ennek jelentősége a klinikai gyakorlatban csekély lehet.

Korábbi vizsgálatok szerint felnőtt cöliákiásokban 95%-os egyezést találtak a proximális és a disztális biopsziás minták között (305). Csupán három esetben volt olyan eltérés, ahol a két régió egymástól jelentősen különbözött: proximálisabban enyhébb elváltozást, míg disztálisabban jelentősebb atrófiát igazoltak. Ravelli és munkatársai 120 gyermektől vettek biopsziás mintát a bulbusztól a jejunumig (4 helyről). Eredményeik alapján a disztális

szakaszokon szignifikánsan gyakrabban mutatkozott totális boholyatrófia, bár összehasonlítva az egy betegből vett mintákat, a különbségek nem voltak szignifikánsak (306). A szerzők megállapították, hogy a diagnózis megbízható felállításához elegendő az egy helyről vett biopsziás minta, ami nem feltétlen a legtávolabbi bélszakasz. Eredményeink korrelálnak ezekkel az adatokkal. Újabb, főként felnőtt cöliákiásokban végzett vizsgálatok alapján a proximális duodenális, valamint a disztális duodenális mintavételt egyaránt fontosnak tartják a boholyatrófia biztos megítélésére (307-309). Mindenesetre nem hagyható figyelmen kívül az, hogy ezekben a vizsgálatokban a proximális duodénumban látott boholykárosodást nem csak a cöliákia, hanem *H. pylori*, savas reflux és gyógyszerek egyaránt okozhatják és ezek a faktorok a felnőtt populációban eleve gyakrabban fordulnak elő.

Kutatásunk másik fontos megállapítása, hogy a CLDN2 és CLDN3 expressziója kezeletlen cöliákiás gyermekek mukózájában nagyobb, mint a kontrollban, továbbá a súlyosabb elváltozásban még nagyobb a denzitás. A CLDN expresszióját cöliákiásokban korábban még nem elemezték. A klaudinok a sejtek közötti kapcsolóelem, a „tight junction” részei, felelősek a szövetenként eltérő elektromos rezisztenciáért és a paracelluláris ion-szelektivitásért is (122). Mivel a daganatos kórképekben igen fontos tényező a sejt-sejt közötti integráció meg bomlása, nem meglepő, hogy a klaudinokkal kapcsolatos kutatások döntő részét ezen a területen végezték (310,311). Karcinómákban a klaudinok mindig jelen vannak és tumor-specifikusan expresszálódnak (312). Érdekes módon a nem epiteliális tumorokban (például limfómában) a klaudin egyáltalán nem, vagy csak a citoplazmában jelenik meg. Hazai vizsgálatok szerint a CLDN2 expressziója adenokarcinómában nagyobb, mint Barrett-özofagitiszben, míg a CLDN3 és CLDN4 Barrett-özofagitiszben és adenokarcinómában egyaránt emelkedett (125). A klaudinok szerepét gyulladásos bélbetegségben (IBD) is vizsgálták már (313). A tanulmány eredményei szerint a CLDN2 expressziója fokozott volt az IBD-s betegekben, míg a CLDN3 és CLDN4 expressziója csökkent, vagy átrendeződést mutatott a szövettani mintákban. Ebben a munkában T84 sejtmoddelt is alkalmazva az IFN-gamma és TNFalfa kezelés csökkentette a CLDN2 és CLDN3 expressziót, valamint növelte a permeabilitást. Érdekes módon, IL13 kezelés hatására, bár nőtt a CLDN2 expressziója, a permeabilitás mégis növekedett. Ezek alapján megállapítható, hogy IBD-ben a permeabilitás változását nem lehet csupán a CLDN expresszió alapján meghatározni.

Cöliákiában a megnövekedett permeabilitás hátterében szerepet tulajdonítanak a kóros sejt-sejt közötti kapcsolódásnak is, vagyis a klaudin ebben a folyamatban szerepet játszhat. Fasano és munkatársainak korábbi vizsgálatai igazolták, hogy kezeletlen cöliákiásokban a „tight junction” fontos alkotójának, a zonulinnak expressziója fokozódott és a mukózális

permeabilitás nőtt (314). Ismert továbbá, hogy a gliadin a zonulin-1 és az okkludin stimulációjával képes fokozni a permeabilitást (315). A gliadin ugyanis szinte azonnal megváltoztatja a bélnyálkahártya barrier funkcióját, átszervezi az aktin-filamentumokat, növeli az okkludin, a zonulin és az E-kadherin expresszióját, ezáltal csökken a transzepiteliális rezisztencia és növekszik a permeabilitás (316). Vizsgálataink klaudinokkal kapcsolatos eredményei, a fokozott CLDN2 és CLDN3 expresszió összhangban van ezekkel a megfigyelésekkel.

Vizsgálataink eredményeit összefoglalva megállapítható, hogy a proximális és a disztális duodenum egyaránt megbízható helye a biopsziás mintavételnek, hogy igazoljuk a boholykárosodást cöliákiás betegekben. A fokozott CLDN2 és CLDN3 expresszió a „tight-junction” strukturális károsodására utal, amelynek szerepe lehet a cöliákiás betegekben megfigyelt fokozott permeabilitásban, illetve a megváltozott sejt-sejt kapcsolatban és a boholykárosodás kialakulásában.

VIII.2.2. HSP72 expresszió (mRNS és fehérje) és lokalizáció vizsgálata cöliákiások duodenumában (203)

Mivel korábbi kutatásaink során kimutattuk, hogy a TLR2 és TLR4 expressziója fokozódik cöliákiában (317), továbbá tudjuk, hogy a HSP72 potenciális immunstimulációs és antiapoptotikus hatásokkal rendelkezik (128), és képes kapcsolódni a TLR-rel, célul tűztük ki a HSP72 szerepének vizsgálatát cöliákiás gyermekek duodenális mukózájában.

Nemzetközi szinten is elsőként vizsgálva a HSP72-t cöliákiában, kimutattuk, hogy kezeletlen cöliákiás gyermekek duodenumában a lamina propria immunsejtjeiben és az enterocitákban a HSP72 expresszió fokozódott. A gluténmentes diétát tartó gyermekek duodenumában a HSP72 expressziója csökkent a frissen kórismézettekéhez képest, bár szintje továbbra is magasabb volt, mint a kontrollokban.

A HSP72 leginkább ismert funkciója, hogy naív, nem megfelelően tekeredett, vagy mutáción átesett fehérjék molekuláris „chaperonja” lehet (128). Ezen kívül extracelluláris, citokin-szerű hatásai is lehetnek (318). Munkánk indításakor, korábbi kutatások alapján feltételeztük, hogy a HSP72 részt vesz a duodenum nyálkahártyájának védelmében: cöliákiában ennek sérülése központi tényező. Ezek a közlemények arról számoltak be, hogy az intesztinális epitélsejtek *Lactobacillus GG* kezelésre fokozták HSP72 expressziójukat (132), ami hozzájárulhat ennek a probiotikumnak klinikai hatásához úgy, hogy segít megőrizni a citoszeletális integritást (319). A HSP72 ugyanis képes a „tight junction” asszociált fehérjékhez kötődni (alfa-aktinin,

zonula okkludens) és azokat stabilizálni (320). Itt utalnék az általunk is vizsgált, az előző fejezetben ismertetett **klaudinra**, amely szintén a sejt-sejt kapcsolat fontos faktora.

Ezen kívül a HSP72 képes stabilizálni a mitokondriális membránokat és azokat a fehérjéket, melyek a sejt strukturális integritásáért felelősek. Humán C2 kolon sejteken végzett kísérletekben a kaszpáz-9 aktivációja korábban következett be azokban a sejtekben, melyek a HSP72-t kisebb mértékben expresszálták (132). Ez arra utal, hogy a HSP72 antiapoptotikus hatása révén is kifejtheti protektív hatását.

Mivel számos gliadinpeptid képes a veleszületett immunrendszert aktiválni a TLR-en keresztül (321), kiemelésre érdemes, hogy ebben a folyamatban a HSP72 is szerepet játszhat, mint TLR ligand (322). Újra utalnék arra a közleményünkre, amelyben a TLR2 és TLR4 fokozott expresszióját mutattuk ki cöliákiás gyermekek duodenumában (317). A HSP72 specifikusan aktiválhatja az antigén prezentáló sejtek felszínén található TLR2 és TLR4 molekulákat, így különféle immunregulációs hatást fejthet ki: fokozott adhéziós molekula expressziót, kostimulációs molekulák expresszióját, valamint citokinek és kemokinek indukcióját (131).

Az már korábban ismert volt, hogy a TLR2 és a TLR4 a bélbolyhok enterocitáira és a lamina propria immunsejtjeire lokalizálódik (317). Jelenlegi munkánkban speciális immunfluoreszcens festéssel a HSP72 hasonló lokalizációját mutattuk ki, vagyis igazoltuk a térbeli közös lokalizációt.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a HSP72-TLR2/TLR4 jelátvitel megváltoztathatja az enterociták integritását és a toxikus gluténnal szembeni immunválaszt. Ezt a véleményt igazolják azok az eredmények, ahol a TLR2 és TLR4 ligandokon keresztüli fiziológiás kapcsolat segített megőrizni a zonulin-1 asszociált intesztinális barrier integritást (323). Továbbá ismert, hogy a HSP72 monocitákban - a TLR2 és TLR4 molekulákon keresztül - proinflammatorikus citokinek termelődését fokozza, így endogén szignálként immunválaszt indukálhat és segítheti a szervezet védekezését (324).

Összefoglalva, eredményeink arra utalnak, hogy a HSP72-nek fontos szerepe lehet a gliadin-mediált citotoxicitás elleni védelemben. Antiapoptotikus hatása révén elősegítheti az epiteliális sejtek túlélését és csökkenti a boholyatrófia mértékét. A HSP72, mint stresszfaktorok hatására aktiválódó celluláris „chaperon”, vészjelként szolgálhat a veleszületett immunrendszer sejtjei számára a károsodás elleni védelem beindításához. Ebbe a folyamatba illik az intesztinális alkalikus foszfatáz (iAP) is, melyet a következő fejezetben ismertetek részleteiben.

VIII.2.3. Az intesztinális alkalikus foszfatáz (iAP) expressziójának vizsgálata cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában (204)

Az előző fejezetben leírt gondolatmenetet folytatva, feltételeztük, hogy aktív cöliákiában az **intesztinális alkalikus foszfatáz** expressziója alacsony és a csökkent iAP aktivitás fokozza az LPS-TLR4 interakciót, amely egyértelműen kedvezőtlen irányba tolja el a mukózális integritást.

Eredményeink igazolták a feltételezést. Tudomásunk szerint az iAP mRNS és fehérjeexpresszióját elsőként vizsgáltuk újonnan diagnosztizált (gluténmentes diéta előtt) és gluténmentes diétát tartó cöliákiás gyermekek duodenális biopsziás mintáiban. Az **iAP fehérjeszintek** szignifikánsan csökkentek az aktív, diétát még nem folytató cöliákiás betegekben a kontrollhoz képest. Korábban kimutatták, hogy a kefeszegélyhez kötött enzimek (így az iAP is) aktivitásának csökkenése korrelál a cöliákiás betegek szövettani léziójának súlyosságával (184). Ennek egyik magyarázata lehet, hogy az iAP enzimaktivitás függ az enterociták számától, így az iAP a mukózális regeneráció indikátora is lehet (325). Eredményeink alapján feltételezhető, hogy nem csak az enzimaktivitás, hanem az iAP enzimfehérje is összefüggésben lehet a cöliákiában megfigyelhető mukózális lézió súlyosságával.

Felnőtt cöliákiásokban (6 hónapos gluténmentes diétát követően) duodenális iAP aktivitást vizsgáltak intraduodenálisan bejuttatott glutén III frakció adása előtt és után, kontrollokhoz viszonyítva (326). A kontrollokban az iAP enzimaktivitás a normál tartományban maradt a gluténfrakció beadását követően. A GFD-t folytatott cöliákiás csoportban az iAP enzimaktivitás az alapértékre nőtt a fél éves diéta alatt, de szignifikáns aktivitáscsökkenést tapasztaltak a glutén III frakció adása után (indukció) 3-4 órával. Ezek az adatok korreálnak a mi eredményeinkkel, vagyis aktív szakban csökken az iAP aktivitás, gluténmentes étrend hatására pedig közelít a normálhoz. Így a csökkent iAP proteinszint markere is lehet a cöliákia súlyosságának és a gluténmentes diéta hatékonyságának.

Cöliákiás gyermekek mukózájában, hasonlóan a korábban ismertetett IBD-s betegeinkben, az iAP mRNS expressziója nem követte a gyulladt, károsodott bélszakaszban kimutatott iAP fehérjecsökkenést. Az mRNS és fehérje diszkrepancia nem ritka jelenség, pl. poszt-transzkripcióos modifikáció állhat a háttérben (részletesebben lásd: iAP-IBD, VIII.1.6. fejezet).

Immunfluoreszcens vizsgálatunkkal sikerült kimutatni, hogy a cöliákiások duodenális nyálkahártyájában az iAP kizárólag az intraepiteliális kompartmentre lokalizálódik.

Kolokalizációs vizsgálatunkban az iAP a TLR4-gyel együtt jelent meg, amely valószínűsíti a két entitás funkcionális kapcsolatát. Itt jegyezném meg, hogy cöliákiában és IBD-ben is fokozott TLR4 expressziót és csökkent iAP fehérjeszintet igazoltunk, melynek szerepe lehet az intesztinális barrierintegritás felbomlásában cöliákiában, valamint IBD-ben egyaránt.

Ennek terápiás vonzatát IBD-ben korábban részletesen ismertettem. Cöliákiában a gluténmentes diéta kiváló terápiás mód, mellékhatása nincs, ezért kisebb az igény alternatív terápiák keresésére. Annak ellenére is, hogy a diéta igen költséges és a pubertáskor után, valamint felnőttkorban a diéta betartása nehézségekbe ütközik (327). Szisztematikus, 38 releváns közlemény feldolgozása alapján megállapítható, hogy felnőttekben a GFD aránya csupán 42-91%-os (328). Legrosszabb arányt az etnikai minoritások körében mértek és azokban, akiknél a cöliákiát már gyermekkorban diagnosztizálták. Bár az IBD-vel ellentétben sem humán, sem állatkísérlet nem ismert cöliákia és iAP vonatkozásában, az iAP adásának adjuváns terápiás lehetősége - válogatott esetekben szóba jöhet a jövőben.

VIII.2.4. Cöliákiás gyermekek perifériás vérének immunfenotípus elemzése

IBD-s gyermekekhez hasonlóan, a mukózális biopsziák elemzése mellett, cöliákiások perifériás mononukleáris sejtjeiben is vizsgáltuk a természetes és az adaptív immunitás jegyeit.

Az újonnan diagnosztizált, még nem diétázó cöliákiás gyermekekben a **természetes immunitás** sejtes elemei közül a kontrollhoz képest alacsonyabb NK, NKT és iNKT prevalenciát tapasztaltunk, hasonlóan a korábbi adatokhoz (329). Ezen kívül magasabb mDC prevalencia, és mDC/pDC arány volt jellemző betegeinkre. Felnőtt cöliákiásokban végzett hasonló jellegű tanulmányban csökkent pDC szintet mértek, melynek hátterében az állt, hogy ezek a sejtek a mukózális lézióban csoportosultak (330). A mi eredményeink is erre utalnak, miszerint a mukózális pDC kivándorlásra válaszul a csontvelő növeli a perifériás vérben az mDC alakokat. Ezen kívül az mDC-k hozzájárulhatnak a Th1/Th2 arány megváltozásához, hiszen képesek az immunválaszt Th2 irányba eltolni (287).

További fontos eredményünk, hogy – elsőként a nemzetközi szakirodalomban - perifériás vérben is igazoltuk az APC sejtek fokozott **TLR2 és TLR4** expresszióját cöliákiában. Újabb adatok szerint a TLR mukózális megjelenése felnőttkori és gyermekkori cöliákiában hasonló (331). Ebben az összehasonlító vizsgálatban a TLR4 mukózális expressziója aktív cöliákiában kétszerese volt a kontrollénak, felnőttben és gyermekben egyaránt. Az emelkedett TLR4 szint fokozott interleukin (IL1, IL6 és IL17) és transzkripciós faktorok (IRAK4, MyD88 és NFkB) megjelenésével járt.

Mivel a TLR-ek átmenetileg expresszálódnak aktiváció hatására, fokozott megjelenésük folyamatos APC aktivációt jelent. Bár didaktikai okból az immunfenotípus elemzéssel nyert eredményeinket természetes és adaptív immunitásra osztottam, a kettőt nem lehet mereven elhatárolni. Hiszen ebben az esetben is, a fokozott TLR stimuláció megemeli az aktivált $CD4^+$ sejtek számát, amely már az adaptív immunitás fontos szereplője.

Az újonnan kórismézett cöliákiás gyermekekben számos eltérést figyeltünk meg az **adaptív immunitás oldaláról** is: a $CD4^+$ limfociták prevalenciája és a Th1/Th2 hányados alacsonyabb volt, a felnőttkori friss cöliákiás betegekhez hasonlóan (332,333). Ezek a PBMC immunfenotípus változások eltérőek a biopsziás mintákban megfigyelttel, ahol emelkedett $CD4^+$ és Th1 sejt számot detektáltak (334). A korábban leírtak szerint feltételezhető, hogy a perifériásan csökkent sejt szám abból adódik, hogy az érintett sejtpopuláció felszaporodik a mukózában.

Munkánkban a $CD25^+$ T helper sejtek prevalenciája megegyezett a vizsgált csoportokban, ellentétben azzal, amit felnőttekben tapasztaltak (332,335). A többi aktivált sejt jelenléte a felnőttekéhez hasonló volt, a limfociták eltérései a szisztémás gyulladás jelenlétét jelezték az újonnan kórismézett cöliákiás gyermekekben. Megjegyzendő, hogy vizsgálatunkban a FoxP3-at expresszáló Treg-ek perifériás prevalenciájában nem találtunk eltérést, hasonlóan a korábbi adatokhoz (336). Ezzel ellentétben cöliákiás felnőttekben a FoxP3⁺ Treg számot magasabbnak találták (337). A diszkrepancia pontos oka nem ismert, de szerepet játszhat az a tény, hogy a vizsgálat során az idősebb korban obezitás, metabolikus szindróma, vagy degeneratív kórképek enyhe formájában szenvedő „beteget” az egészséges kontrollcsoportba sorolják, miközben ezek az elváltozások befolyásolhatják a Treg perifériás megjelenését (338).

Vizsgálatunk második részében a **GFD után** is rögzítettük az immunfenotípus változásait. Érdekes módon a diétát követően a **természetes immunválasz** számos eleme nem normalizálódott. Az NK és NKT prevalencia csökkent, de a DC és a TLR2-t és TLR4-et expresszáló APC-k aránya emelkedett maradt. Ezen kívül az emelkedett TLR2-t és TLR4-et expresszáló sejtek száma korrelált a diétát követő csökkent TG szinttel, mutatva azt, hogy a tünetek megszűntével a veleszületett immunitás eltérései továbbra is jelen vannak. Ezek alapján a veleszületett immunitás dinamikájában eltérő módon változik a GFD hatására, normalizációja lassúbb lehet, szemben az adaptív immunitással (lásd később). Ezt a gondolatmenetet támasztja alá, hogy újonnan kórismézett cöliákiásokban a gammadeltaT sejtek száma a diéta hatására sem normalizálódik (339), annak ellenére, hogy GFD következtében megszűnik a boholyatrófia, normalizálódik a korábban magas IEL szubpopulációk aránya, valamint a kóros Th1 citokinek mennyisége. Ezt igazolja többször

idézett közleményünk eredménye, miszerint újonnan kórismézett cöliákiások mukózájában a TLR2 és TLR4 fokozott expressziója GFD után sem normalizálódott teljes mértékben (317). Mivel a gammadeltaT sejtek és a TLR-ek fontos szerepet töltenek be a veleszületett immunitásban, feltételezhető, hogy cöliákiában a kezdeti noxa tartós változásokat rögzít a természetes immunitás egyes elemeiben. Másik lehetséges magyarázat, hogy a mukózális károsodás még nem teljesen regenerálódott és a veleszületett immunitás sejtjes elemei ezzel párhuzamosan még aktívabb szereplők, mint az adaptív immunitás sejtjei. Erre utalhat Wahab és munkatársainak közleménye, amelyben kimutatták, hogy a vékonybél makroszkópos és mikroszkópos regenerációja a cöliákiás betegek mindössze 65%-ban következik be 2 éves gluténmentes étrendet követően (340).

A GFD bevezetése után az **adaptív immunsejtek** közül a CD4, Th1 és az aktivált limfociták nagy része szintén normalizálódott, bár a természetes immunfenotípushoz hasonlóan itt is találtunk a kontroll TG és a CD8⁺, CD4⁺CD69⁺, valamint a CD4⁺HLADR⁺ prevalenciák között összefüggést. Korábbi közleményekben az adaptív immunitás normalizációját már részben leírták, de nem követéses vizsgálatokban, hanem eltérő egyénekből álló betegcsoportokban (diéta előtt és után) (332,337). Eredményeink követéses vizsgálatból származtak, így elvileg az életkor változása befolyásolhatta volna az immunitás eltéréseit is (341), ez azonban nem valószínű, mivel a két mintavétel között csak 3 hónap eltérés volt.

VIII.2.5. Kóros transzglutamináz és plazminogénhiány a duodenális fekély patomechanizmusában (205)

A bevezetőben említettem, hogy egyre gyakrabban figyelnek meg cöliákiában fekélyt (7). Ennek oka ismeretlen, hiszen cöliákiára ez nem jellemző, csak a boholyatrófia. Vizsgálataink alapján előfordulásának egyik lehetséges magyarázata lehet, amikor a cöliákia plazminogénhiánnyal (PLG hiány) társul. Duodenális fekélyes betegünknel a cöliákia és a PLG hiány együttes megjelenése lehetne véletlen egybeesés is, azonban a fekély környezetéből vett duodenális biopsziás minta speciális immunfluoreszcens vizsgálata egyértelműen arra utalt, hogy a két entitás között oksági kapcsolat van.

A PLG hiánnyal foglalkozó publikált esetek száma több száz fölött van (342). PLG hiány következményeként fibrinben gazdag pszeudomembrán alakulhat ki, mely a betegek különböző szerveiben (konjunktiva, gingiva, középfül, orofaringsz, légutak, urogenitális traktus és központi idegrendszer) lerakódhat és klinikai tüneteket okozhat. Érdekes módon a gasztrointesztinális traktus szinte sohasem érintett (342). Ez azért nagyon rejtélyes és nehezen magyarázható, mert homozigóta PLG negatív egérmodellben a gasztrointesztinális traktus

nagyon gyakran érintett (343): gyomorfekély 59%, rektális fekély 77%-ban alakulhat ki. A PLG hiánnyal foglalkozó humán kutatások erre érdemi magyarázattal nem szolgáltak, de feltételezték, hogy valamilyen protektív tényezőnek a gasztrointesztinális traktusban lennie kell. Vizsgálataink alapján a cöliákiában megjelenő antitestek, pontosabban a módosult szöveti transzglutamináz2 (TG2) jelenléte lehet az oki tényező abban, hogy a mukózális homeosztázis egyensúlya megbomlik. Korábbi vizsgálatok megállapították, hogy a cöliákiában megjelenő antitestek csökkentik a TGFβ szintet, amely egy gátló citokin és fontos szerepet tölt be az intesztinálisan jelen levő orális tolerancia kialakításában (344). Ebben a folyamatban a TG2 kulcsszerepet játszik, hiszen állatkísérletben a TG2 gátlószerek (cisztamin) peptikus fekélyt generáltak. Másrészt a kongenitális cisztinózis kezelésében szerepet játszó cisztamin mellékhatásként szintén okozhat felső gasztrointesztinális fekélyt (345). Ezek alapján úgy tűnik, hogy a cöliákiában megjelenő antitest, leginkább a TG2 megjelenése lesz az a tényező, amely bizonyos körülmények hatására módosul (PLG hiány) és hajlamosíthatja az egyént a fekélyek gasztrointesztinális megjelenésére (346).

A TG2 intracelluláris fehérje, amely a sérült sejtből kijutva kapcsolódhat a fibronectinnel. Ennek megfelelően cöliákiásokban a TG2 ellenes antitestek a különböző szövetekben megfigyelhető fibronectin mintázatot jelölik, így a retikuláris szövethez, a simaizmot burkoló endomiziális szövethez és a bélbolyhokban is megjelenő kiserek bazális membránjához kapcsolódhat. Betegünkben a PLG hiány következtében létrejött excesszív fibrin felhalmozódás rendellenes kiser mintázattal járt, továbbá abnormális fibronectin-TG2 expressziót okozott. Ezt mutatta a cöliákiásoktól eltérő anti-TG2 IgA lerakódás is.

Korábbi alapkutatások szerint a TG2 egyben a fibronectin integrin-kötő adhéziós molekulája is (347,348), így a cöliákiásokban megjelenő anti-TG2 antitestek a TG2 mediált sejt-adhéziót is kórosan befolyásolhatják, így sérülhet a mukózális integritás is. Fentiek alapján nem meglepő, hogy a két kórkép (cöliákia: kóros TG2 és PLG hiány: kóros fibrin felhalmozódás) együtt fekélyes elváltozást okozott.

Ezt a gondolatmenetet erősítik azok a vizsgálatok, melyek szerint a cöliákiában megfigyelt autoantitestek (TG2 ellen irányulva) az angiogenesis számos lépcsőjét gátolják (349) és a sejt-extracelluláris mátrix kapcsolat integritását kórosan befolyásolják. Ezen kívül a cöliákiásokban jelen levő TG2 ellenes antitestek az aktin-citoszkeleton rendszert dezorganizálva nem teszik lehetővé a normális celluláris migrációt (350). Cöliákiásokban a boholysorvadással párhuzamosan az érstruktúra is szegényesebb, valószínűleg ez lehet a magyarázata annak, hogy a fenti folyamatok nem érnek el olyan szintet, hogy cöliákiában fekély alakuljon ki. PLG hiányban viszont a kóros fibrin lerakódás angienezist fokozó

tényező lehet, amely a cöliákiásokban jelen levő fokozott TG2 antitesttel reagálva mukózális dezintegrációt, fekélyt idézhet elő.

Összefoglalva: vizsgálataink egyértelműen igazolták, hogy PLG hiányos cöliákiásokban a kóros fibrin és TG2 egymásra hatva okozhat mukózális károsodást, fekélyt. Így javasoljuk, hogy cöliákiások ismeretlen eredetű gasztrointesztinális fekélyes elváltozásának észlelésekor keressük a PLG hiányt.

VIII.3. ALLERGIÁS KOLITISZ

Diagnosztikai jellemzők és immunfenotípus vizsgálatok allergiás kolitiszben (206, 207)

Téziseimbe azért vontam be az allergiás kolitiszes (AC) csecsemőket, mert a kórképet kezdetben nem lehet elkülöníteni (hasonló klinikai kép, laboratóriumi eltérések, kolonoszkópiánál makroszkópos- és mikroszkópos kép) a csecsemőkori Crohn-betegségtől (CD). Rendkívül jelentős felfedezés lenne rájönni, hogy AC-ben miért gyógyul meg az aftás fekély és miért lesz progresszió CD-ben. Az AC-s csecsemők laboratóriumi vizsgálatánál szignifikánsan magasabb trombocitaszámot és vashiányos anémiát találtunk a kontrollhoz képest. Bármennyire is meglepő, utóbbi új eredmény, mert legjobb tudomásom szerint AC-ben vasszintet nem néztek, annak ellenére, hogy a krónikus hematokézia miatt kézenfekvő lett volna. Korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan a specifikus IgE és a szérum eozinofil sejtszám nem adott diagnosztikus segítséget (139). Újabb lehetőség a diagnosztikában a bőrre helyezhető „patch test”, amit egy olasz prospektív tanulmányban viszonylag jó hatásfokkal alkalmaztak (351). Ebben a 14, anyatejjel táplált AC csecsemőnben a „patch test” 50%-ban volt pozitív tejszóra, 28%-ban szójára, 21%-ban tojásra és 7%-ban búzára.

A bevezetésben részletesen ismertetett eozinofil sejtes kolitisz (EC) populációban (súlyosabb AC variáns, több mint 20 eozinofil sejt/NNL) hasonló laboratóriumi értékeket találtunk, mint AC-ben és a kolonoszkópos vizsgálatnál mindkét populációban egyaránt limfonoduláris hiperpláziát és aftás kolitist láttunk. Ennek alapján kijelenthetjük, hogy az AC és EC felosztása mesterkélt, az EC nem jelent súlyosabb formát.

Az allergiás csecsemők immunfenotípezálásakor megállapítottuk, hogy kezdetben a Treg prevalencia alacsony, a naív/memória sejtek aránya megnövekedett, az aktivált T sejtek száma csökkent és a CD4⁺ limfociták Th2 irányba tolódtak el. A hematokézia megszűntével ezek az eltérések normalizálódtak.

Az AC patomechanizmusa részleteiben mind a mai napig nem ismert (141). Cöliákiával és IBD-vel összehasonlítva nagyságrenddel kevesebb közlemény született, ami érhető, hiszen

nincsenek jól felállított diagnosztikus kritériumok, jóval ritkábban kell kolonoszkópiás vizsgálatot végezni, utóbbi nem is szükséges a kórismézéshez. A nemzetközi szakirodalomban AC-ben kiterjedt immunfenotípus vizsgálatot még nem végeztek. Egyedül egy régi finn vizsgálat ismert, ahol kevert etiológiájú infantilis kolitiszes betegek vastagbelének epitéliumában a T sejtek megnövekedett számát írták le (352).

Későbbi életkorban, néhány éves allergiás gyermekekben már rendelkezünk releváns adatokkal, de szeretném hangsúlyozni, hogy ez más klinikai kórkép, mint a csecsemőkori véres széklettel jellemezhető AC. Ezek alapján megállapítható, hogy a Treg-eknek fontos szerepük lehet mind a gyermekkori, mind pedig a felnőttkori ételallergia kialakulásában. Egy norvég tanulmányban 21 tejallergiás gyermekben elemezték, hogy az allergia elmúlása vajon összefüggésben van-e a Treg jelenlétével (353). A mi AC-s eredményünkhöz hasonlóan, a Treg sejtek száma magasabb volt azokban, akik már „kinőtték” az allergiát. Amennyiben ezeket a Treg sejteket depletálták, akkor a béta-laktoglobulinnal szembeni in vitro proliferációs aktivitás ötszörösére nőtt.

Adataink alapján viszont az alacsonyabb Treg ($CD4^+FoxP3^+$) prevalencia mellett a korai és késő aktivációs markereket ($CD25^+$ és $CD62L^+$) expresszáló sejtek, valamint az effektor vagy memória sejtek ($CD45RO^+$) aránya nem magasabb AC-s gyermekekben. Ez az eltérés nem utal arra, hogy a Treg sejtek az aktivált limfociták számát és működését befolyásolnák. Az általunk megfigyelt immunfenotípus eltérések viszont jól magyarázhatók a mikrobiommal kapcsolatos interakciókkal (354). Ennek megfelelően a mikrobiális antigének jól ismert iniciáló tényezői a Treg differenciálódásnak, valamint a memória sejtek és a T limfociták aktivációjának. Az AC-s betegeinkben megfigyelt csökkent Treg prevalencia és a memória- és aktivált T sejtek számának ezzel párhuzamos csökkenése, az adaptív immunitás éretlenségét és a szuboptimális antigén expozíció lehetőségét jelezheti. Ez az immunmechanizmus járulhat hozzá az ugyancsak megfigyelt Th1/Th2 arány csökkenéséhez.

Újabb vizsgálatok alapján a gasztrointesztinális flóra és bizonyos probiotikumoknak az ételallergiákban kifejtett jótékony hatása részben a Treg indukció révén valósul meg. Két probiotikum, a *Lactobacillus reuteri* és a *Lactobacillus casei* által indukált antigén prezentáló sejtek fokozták a Treg sejtek számát, javítva az allergiás tüneteket (355,356).

Ebbe a gondolatmenetbe illik egy újabb tanulmány, melyben megállapították, hogy a korai mikrobiom expozíció meghatározó a veleszületett immunitás szempontjából, valamint bizonyos immunmediált kórképek kivédése szempontjából is (357). Normális mikrobiomú és csíramentes egerekben végzett összehasonlító elemzés kimutatta, hogy az előbbi állatokban kevésbé alakult ki IBD és asztmaszerű immunmediált elváltozás, mint azokban, akiknél

meggátolták a normális bélflóra kialakulását. Ezt a hatást a CXCL16 kemokin ligand és az invariáns láncot hordozó NKT sejt (iNKT) közvetítette.

Összefoglalásképpen elmondható, hogy elsőként igazoltuk AC-ben a Treg sejtek csökkent számát, amely a hematokézia elmúlása után normalizálódott. Vizsgálatunk értékét emeli, hogy a Treg sejteket a FoxP3 expresszió alapján azonosítottuk, ami ma a legelfogadottabb markere ennek a sejtpopulációnak és más meghatározási móddal ellentétben jól reprodukálható paraméter. Másfelől azonban ismert, hogy létezhetnek FoxP3⁺ Treg sejtek is (358), továbbá ezeket az eltéréseket nem a gyulladás helyén, az intesztinális mukózában, hanem a perifériás vérben detektáltuk, ami nem biztos, hogy tükrözi a patomechanizmusban betöltött centrális szerepét. Az allergiás tünetek, a véres széklet elmúltával egyszerre volt jelen a Treg prevalencia normalizálódása és a Th1/Th2 arány helyreállása, de az nem egyértelmű, hogy ok-okozati összefüggésekben melyik folyamat az elsődleges.

IX. ÖSSZEFOGLALÁS. A TÉZISEK LEGFONTOSABB ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSAI

1. Magyarországon az **IBD gyermekkori incidenciája** $7,48/10^5$. Ez az index Crohn betegségben (CD) $4,72/10^5$, kolitisz ulcerózában (UC) pedig $2,32/10^5$. A CD kétszer gyakoribb, mint az UC. A betegek tizede fisztulával jelentkezik.
2. Hazánkban az IBD-s gyermekek fele a **középsúlyos-súlyos formába** tartozik a diagnózis fölállításánál. Egy éves nyomon követés után ez az arány a tizedére csökken.
3. A **felső endoszkópia** (fekély, erózió, afta, granulóma igazolása) a CD-s betegek harmadában segíti a diagnózis felállítását. Perdöntő szerepet ennél kisebb arányban, a Crohn-beteg gyermekek tizedében játszik („diagnostic yield”).
4. Országos felmérésben **IFX-ra** a gyermekek 82%-a kedvező terápiás választ mutatott, a fisztulák 70%-a bezárult. Nemzetközi szinten végzett felmérésem alapján 4458 IFX kezelést összegezve 3,8%-os gyakorisággal fordult elő akut infúziós reakció, amely hasonló a felnőttekhez.
5. Az **MBL** szérumkoncentrációk szignifikánsan alacsonyabbak és az alacsony MBL szinttel rendelkezők aránya is nagyobb az IBD-s gyermekekben a kontrollhoz képest, CD-ben és UC-ben egyaránt. CD-ben az alacsony MBL szint izolált ileális érintettséggel társul.
6. A **PAB antitestek** jelenléte szignifikánsan magasabb CD-ben és UC-ben, de a szenzitivitás alacsony. Kombinációk alkalmazásával ez javul, PAB és ASCA/pANCA együttes alkalmazásával a szenzitivitás CD-ben 87,4%, UC-ben 79,6%. Ekkor a specificitás 89,3% (CD) illetve 93,2% (UC).
7. A **GAB antitestek** előfordulását szignifikánsan magasabbnak észleltük UC-ben a CD-s, és a kontroll csoporthoz viszonyítva, azonban ennek aránya nem éri el azt a szintet, hogy értelme lenne alkalmazni a klinikai gyakorlatban.
8. **TLR2 és TLR4** expressziója az IBD-s gyermekek gyulladt kolonmukózájában magasabb, mint a kontrollokéban és az IBD-s betegek ép mukózájában. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a TLR2 és TLR4 fontos szerepet tölt be az IBD pathomechanizmusában.
9. **CD aktív szakában** a Th1 prevalencia csökken, ezzel párhuzamosan az aktivált limfociták, dendritikus- és a memória sejtek aránya magasabb. Az újonnan kórismétett

CD-ben a mieloid/plazmocitoid sejtek aránya, a TLR2/TLR4+ dendritikus sejtek aránya magasabb, mint a kontrollban.

10. **Az iAP fehérjeszintek** az IBD-s betegek és a cöliákiások mukózájában is csökken. Az immunfluoreszcens festés mindkét betegségben igazolta az iAP és a TLR4 intraepiteliális kompartmenten belüli együttes lokalizációját. Ezek az adatok arra utalhatnak, hogy az alacsonyabb IAP enzim okozta csökkent LPS detoxifikációnak szerepe lehet mindkét kórkép patomechanizmusában.
11. A **CLDN2 és CLDN3** mukózális expressziója cöliákiában fokozott és ennek szerepe lehet a kórképben megfigyelt fokozott bélpermeabilitásban, valamint a boholykárosodás kialakulásában.
12. A **HSP72** expresszió cöliákiás gyermekek duodenális mukózájában magas, gluténmentes diétát követően azonban normalizálódik. Ez arra utal, hogy a fehérje szerepet játszhat a cöliákia patomechanizmusában.
13. **Cöliákiás gyermekekben** a Th1 és NK sejtek aránya alacsonyabb, ellenben az aktivált CD4⁺ T sejtek, a mieloid dendritikus sejtek, a TLR2 és TLR4 pozitív dendritikus sejtek aránya magasabb. Gluténmentes diéta után a legtöbb eltérés normalizálódott, bár érdekes módon a **veleszületett immunitás** sejtes elemeinek eltérései a diétázó cöliákiásokban is megmaradtak, egyedül az APC-k TLR4 expressziója normalizálódott.
14. Cöliákiás egyénben a **plazminogénhiány** kóros TG2 kötéssel jár, amelynek szerepe lehet a fekély patomechanizmusában. Ennek alapján a cöliákiásokban egyre gyakrabban kórismézett ismeretlen eredetű fekélynél javasolható a plazminogénhiány kizárása.
15. **AC-s** csecsemők kisebb mértékben rendelkeznek CD4⁺CD25⁺ és FoxP3⁺ T regulációs sejtekkel, továbbá a Thelper2 sejtek aránya magasabb. Ez arra utal, hogy a kezdeti antigén terhelés döntő tényező a limfonoduláris hiperpláziával jellemezhető AC kialakulásában.

X. SUMMARY

1. The incidence of pediatric **IBD in Hungary is 7.48/10⁵**. More specifically, the incidence of Crohn disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC) is 4.72/10⁵ and 2.32/10⁵ respectively. The frequency of CD is twice that of UC. 10% of pediatric patients with CD have fistulae.
2. At diagnosis, 50% of patients with IBD have a **moderate to severe form** which is decreased to 10% after one year of follow-up.
3. Lesions characteristic of CD (ulcers, erosions, aphta and granulomata) found at upper endoscopy are helpful in making the diagnosis. However, the **diagnostic yield of EGD** is only 9% in CD patients.
4. **Response to infliximab (IFX)** after induction therapy was 82% and the rate of **fistula closure** was 70% in pediatric CD patients in Hungary. Analyzing 4458 courses of IFX treatment, the rate of acute adverse IFX reactions was 3.8%, which is similar to adult data.
5. Levels of Mannose binding lectin (MBL) were found to be significantly lower in patients with IBD (CD and UC) when compared with controls. Low MBL level correlated with isolated ileal localization (L1).
6. The prevalence of **pancreatic autoantibodies (PAB)** was significantly higher in CD and in UC compared with a pediatric control cohort. The specificity of PAB was 100%; however, sensitivity was low. The combination of PAB and other antibodies (ASCA, ANCA) improved the sensitivity of serological markers in CD (87.4%) and in UC (79.6%). Specificity was 89,3% in CD and 93,2% in UC.
7. **Autoantibodies against goblet cells (GAB)** were significantly increased in patients with UC compared with both CD and controls. Nevertheless, due to low sensitivity, measurement is not currently recommended as part of the diagnostic algorithm.
8. **Expression of Toll-like receptors (TLR2 and TLR4)** was increased in the inflamed colonic mucosa of patients with IBD in comparison to both controls and the non-inflamed mucosa of IBD patients. This data indicates that TLR2 and TLR4 may play an important role in the pathophysiology of IBD.
9. Prevalence of Th1 cells is decreased and activated lymphocytes, dendritic- and memory cells are increased in pediatric patients with active CD. In newly diagnosed CD patients,

there is an increased number of myeloid/plasmacytoid cells and TLR2/TLR4+ dendritic cells in comparison to controls.

10. **Intestinal alkaline phosphatase (iAP)** enzyme was decreased in the mucosa of pediatric patients with CD and celiac disease. Immunofluorescent staining revealed iAP and TLR4 colocalization in the intraepithelial compartment. These findings indicate that decreased LPS detoxification due to decreased iAP enzyme may have a role in the mucosal deterioration seen in both disorders.
11. Increased expression of **claudin2 and -3 (CLDN)** in celiac disease may have a role in the increased mucosal permeability and development of villous atrophy seen in this gluten sensitive disease.
12. Expression of **Heat-shock protein 72 (HSP)** was increased in patients with celiac disease, which normalized on a gluten-free diet. This suggests that HSP72 may play a role in the pathophysiology.
13. Numbers of Th1 and NK cells are decreased while numbers of activated CD4+ T cells, myeloid dendritic cells and TLR2, TLR4+ dendritic cells are increased in pediatric patients with **celiac disease**. After the introduction of a gluten-free diet, most abnormalities returned to within normal limits, except, interestingly, abnormalities of **innate immunity**.
14. **Plasminogen deficiency** in a patient with celiac disease caused abnormal transglutaminase2 binding and this may have a role in the pathophysiology of ulcer formation in celiac disease. Our results suggest a potential role for excluding plasminogen deficiency in celiac patients with ulcers.
15. **CD4⁺CD25⁺ and FoxP3⁺ T regulatory cells** are decreased and Th2 cells are increased in patients with allergic colitis. These results indicate that early antigen exposure is important in the development of lymphonodular hyperplasia observed in allergic colitis.

XI. A DOKTORI TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE (PH.D. ÉRTEKEZÉS ÓTA)

XI.1. A TÉZISEK ALAPJÁT ADÓ ELSŐ, VAGY UTOLSÓ SZERZŐS IDEGEN NYELVŰ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE.

Veres G, Baldassano RN, Mamula P. Infliximab therapy in children and adolescents with inflammatory bowel disease. *Drugs*. 2007;67:1703-23. **IF: 3,726**

Szebeni B, Veres G, (megosztott első szerzők) Dezsőfi A, Rusai K, Vannay A, Mraz M, Majorova E, Arató A. Increased expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol*. 2008;151:34-41. **IF: 2,853**

Nagy Szakál D, Gyorffy H, Arató A, Cseh A, Molnár K, Papp M, Dezsőfi A, **Veres G**. Mucosal expression of claudins 2, 3 and 4 in proximal and distal part of duodenum in children with coeliac disease. *Virchows Arch*. 2010;456:245-50. **IF: 2,336**

Cseh A, Vásárhelyi B, Szalay B, Molnár K, Nagy-Szakál D, Treszl A, Vannay A, Arató A, Tulassay T, **Veres G**. Immune Phenotype of Children with Newly Diagnosed and Gluten-Free Diet-Treated Celiac Disease. *Dig Dis Sci*. 2011;56:792-8. **IF: 2,06**

Cseh A, Molnár K, Pintér P, Szalay B, Szebeni B, Treszl A, Arató A, Vásárhelyi B, **Veres G**. Regulatory T Cells and T Helper Subsets in Breast-fed Infants With Hematochezia Caused by Allergic Colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;51:675-7. **IF: 2,180**

Sziksz E, Veres G, (megosztott első szerzők) Vannay A, Prókai A, Gál K, Onody A, Korponay-Szabó IR, Reusz G, Szabó A, Tulassay T, Arató A, Szebeni B. Increased Heat Shock Protein 72 Expression in Celiac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;51:573-8. **IF: 2,180**

Cseh Á, Vásárhelyi B, Molnár K, Szalay B, Svec P, Treszl A, Dezsőfi A, Lakatos P, Arató A, Tulassay T, **Veres G**. Immune phenotype in children with therapy-naïve, remitted and relapsed Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2010;16:1600-9 **IF: 2,24**

Veres G, Korponay-Szabó I, Maka E, Glasz T, Mamula P, Papp M, Dezsőfi A, Arató A. Duodenal Ulceration in a Patient With Celiac Disease and Plasminogen I Deficiency: Coincidence or Cofactors? *Pediatrics*. 2011;128(5):e1302-6. **IF: 5,437**

Kovacs M, Muller KE, Arato A, Lakatos PL, B. Kovacs J, Varkonyi Á, Solyom E, Polgar M, Nemes É, Guthy I, Tokodi I, Toth G, Horvath Á, Tarnok A, Tomsits E, Csoszánsszky N, Balogh M, Vass N, Bodi P, Dezsofi A, Gardos L, Micskey É, Papp M, Szucs D, Cseh D, Molnar K, Szabo D, **Veres G**. Diagnostic yield of upper endoscopy in paediatric patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. Subanalysis of the HUPIR registry. *J Crohn's Colitis*, 2012;6:86-94, **IF: 2,566**

Molnár K, Vannay A, Sziksz E, Bánki NF, Györffy H, Arató A, Dezsőfi A, **Veres G**. Decreased mucosal expression of intestinal alkaline phosphatase in children with coeliac disease. *Virchows Arch*. 2012;460:157-161. **IF: 2,491**

Molnár K, Vannay Á, Szebeni B, Bánki NF, Sziksz E, Cseh Á, Györffy H, Lakatos PL, Papp M, Arató A, **Veres G**. Intestinal Alkaline Phosphatase in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2012; 18:3254-9. **IF: 2,471**

Kovacs M, Papp M, Lakatos P, Jacobsen S, Nemes É, Polgar M, Solyom E, Bodi P, Horvath Á, Molnar K, Szabo D, Cseh Á, Muller KE, Dezsofi A, Arato A, **Veres G**. Low mannose-binding lectin (MBL) is associated with paediatric inflammatory bowel diseases and ileal involvement in patients with Crohn disease. *J Crohn's Colitis*, 2012 DOI: 10.1016/j.crohns.2012.03.008. (közlésre elfogadva) **IF: 2,566**

Kovacs M, Lakatos PL, Papp M, Jacobsen S, Nemes E, Polgar M, Solyom E, Bodi P, Horvath A, Muller KE, Molnar K, Szabo D, Cseh A, Dezsofi A, Arato A, **Veres G**. Pancreatic autoantibodies and autoantibodies against goblet cells in pediatric patients with inflammatory bowel disease (IBD). *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012;55:429-435. **IF: 2,298**

XI.2. A TÉZISEKHEZ KAPCSOLÓDÓ MAGYAR NYELVŰ PUBLIKÁCIÓK

Veres G. Az ételallergia gasztrointesztinális manifesztációi. Gyermekorvos Továbbképzés, 2006;5:206-211.

Arató A, **Veres G**, Dezsőfi A. Gastrointestinális vérzések csecsemő- és gyermekkorban. A Csecsemő- és Gyermekgyógyászati Szakmai Kollégium ajánlása. Lege Artis Medicinae, 2006;16:345-352.

Szebeni B, D, **Veres G**, Rusai K, Vannay Á, Bokodi G, Arató A. Toll-szerű receptor 2 (TLR2-), TLR3- és TLR4-expresszió cöliákiás gyermekek vékonybél-nyálkahártyájában. Gyermekgyógyászat, 2006;57:299-306.

Veres G, Maka E, Domsa P, Glasz T, Szabó T, Szőnyi L, Dezsőfi A, Bodánszky H, Vojnisek Zs, Kovács L, Farkas V, Arató A. Gyermekkori antralis és duodenális fekély eddig ismeretlen oka: plazminogén-I hiány. Gyermekgyógyászat, 2007;58:45-48.

Bodánszky H, **Veres G**. Gyulladásos bélbetegségek gyermekkorban. Lege Artis Medicinae, 2007;17:537-544.

Szebeni B, **Veres G**, Mraz M, Dezsőfi A, Vannay Á, Vásárhelyi B, Majorova E, Szőnyi L, Arató A. Toll-like receptor 2, 3 és 4 expressziója gyermekkori gyulladásos bélbetegségben (IBD). Gyermekgyógyászat, 2007;58:318-325.

Veres G. A gyulladásos bélbetegség diagnosztikája. Gyermekorvos Továbbképzés, 2007;4:221-227.

Veres G. A cöliákia és felnőttkori vonatkozásai. Focus medicane, 2007;2:31-35.

Veres G, Miheller P. Infliximab alkalmazása gyermekkori és felnőttkori Crohn-betegségben. Eur J Gastroent Hepat (magyar kiadás) 2008;12:1-9.

Veres G. Hagyományos és új gyógyszeres kezelési lehetőségek gyermekkori Crohn-betegségben. Gyermekorvos továbbképzés, 2008;7:238-244.

Nagy Szakál D, Györffy H, Tőkés A, Arató A, Dezsőfi A, **Veres G.** Claudin 2, 3 és 4 expressziója coeliakiás gyermekek proximális és distalis duodenumában. Gyermekgyógyászat, 2008;59:272-276

Pintér V, Györffy H, Arató A, Dezsőfi A, Molnár K, **Veres G.** Eosinophil- és allergias colitises csecsemők laboratóriumi és colonoscopiás jellemzői. Gyermekgyógyászat, 2008;59:291-295

Veres G. és a Magyar Gyermekek IBD regiszter résztvevői. A magyarországi gyermekkori gyulladásos bélbetegségek (IBD) regiszterének első éves (2007) elemzése. Gyermekgyógyászat, 2008;59:282-287.

Veres G. A gyermekkori krónikus gyulladásos bélbetegség (IBD) sajátosságai. Magy Belorv Arch. 2008;61:7-12.

Szebeni B, Sziksz E, Prókai Á, Gál K, Vannay Á, Cseh Á, **Veres G**, Dezsőfi A, Korponay-Szabó I, Bodánszky H, Arató A. Fokozott szérum és glükokortikoid regulált kináz-1 expresszió gyermekkori cöliákiában. Gyermekgyógyászat 2009;60:67-74.

Veres G, Putz R, Szabó D, Molnár K, Bodánszky H, Dezsőfi A, Arató A. [Adalimumab treatment in infliximab resistant pediatric patient with Crohn's disease.]. Orv Hetil. 2009;150:1858-60.

Veres G, Szabó D, Várkonyi A, Tari B, Polgár M, Kovács J, Horváth A, Tomsits E, Tokodi I, Bodánszky H, Dezsőfi A, Szakos E, Vass N, Ruszinkó V, Kovács M, Müller KE, Arató A. [Analysis of infliximab treated pediatric patients with Crohn disease in Hungary.]. Orv Hetil. 2010;151:179-83.

Müller KE, a Magyar Gyermekek IBD Regiszter résztvevői, **Veres G.** Az extraintesztinális manifesztáció gyakorisága a gyulladásos bélbetegségben szenvedő gyermeknél a Magyar Gyermekek IBD Regiszter 2008-as adatai alapján. Gyermekgyógyászat, 2010;61:15-21.

Kovács M, Müller K. E, a Magyar Gyermekek IBD regiszter résztvevői, **Veres G.** A felső endoszkópia jelentősége a gyermekkori gyulladásos bélbetegségben (IBD) szenvedő gyermekekben. Gyermekgyógyászat, 2010;61:25-31.

Veres G. A csecsemőkori kólikával kapcsolatos új ismeretek és a probléma kezelése. Gyermekorvos továbbképzés, 2010;4:195-197.

Sziksz E, Veres G, Vanay Á, Prókai Á, Himer L, Ónody A, Korponay-Szabó I, Reusz Gy, Szabó A, Arató A, Szebeni B. Fokozott hősokkfehérje72 expresszió gyermekkori coeliakiában. Gyermekgyógyászat, 2011;62:55-59.

Veres G. A csecsemőkori táplálkozás szerepe az allergia prevenciójában. Gyermekgyógyászati Továbbképző szemle, 2011;16:78-81.

Molnár K, Vannay Á, Szebeni B, Györffy H, Sziksz E, Cseh Á, Bánki N, Dezsőfi A, Lakatos PL, Papp M, Arató A, Tulassay T, **Veres G.** Intestinalis alkalikus phosphatase vizsgálata krónikus bélgyulladásban (IBD) szenvedő gyermekek bélnyálkahártyájában. Gyermekgyógyászat, 2011;62:105-109.

Veres G. Infliximab-terápia alkalmazása gyermekkori Crohn-betegségben. Gyermekgyógyászati Továbbképző szemle, 2011;16:123-126.

Szabó D, Arató A, Dezsőfi A, Molnár K, Müller KE, **Veres G.** Rövid távú infliximab kezelés hatása Crohn-beteg gyermekekben. Gyermekgyógyászat, 2011;6:297-300.

Molnár K, Vannay Á, Szebeni B, Györffy H, Sziksz E, Cseh Á, Bánki N, Dezsőfi A, Lakatos PL, Papp M, Arató A, Tulassay T, **Veres G.** Intestinalis alkalikus phosphatase vizsgálata krónikus bélgyulladásban (IBD) szenvedő gyermekek bélnyálkahártyájában. Gyermekgyógyászat, 2011;62:105-109.

Veres G. Infliximab-terápia alkalmazása gyermekkori Crohn-betegségben. Gyermekgyógyászati Továbbképző szemle, 2011;16:123-126.

Kovács M, Arató A, **Veres G.** Diagnosztikus nehézségek Crohn-betegségben.
Gyermekegyógyászat 2012;63,29-33.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom mindennekelőtt Dr. Tulassay Tivadar professzor úrnak, az I. Sz. Gyermekklinika igazgatójának és kutatócsoportunk vezetőjének, aki biztosította számomra a tudományos munka elvégzéséhez szükséges szellemi műhelyt, akinek az irányítása alatt láthattam és élvezhettem a komplex orvosi és emberi gondolkodás, alkotás és szervezés szerteágazó elemeit.

Ez a munka nem jöhetett volna létre témavezetőm, Dr. Arató András professzor úr nélkül, aki elindított a tudományos úton, és jelenleg is támogat. Köszönöm, hogy mind szakmailag, mind emberileg mellettem állt és áll.

Köszönettel tartozom Dr. Vásárhelyi Barnának, valamint Ph.D. hallgatóimnak, Dr. Cseh Áronnak, Dr. Molnár Krisztának, Dr. Szabó Dolóresznek, Dr. Müller Katalin Eszternek és Dr. Kovács Mártának, valamint Dr. Györffy Hajnalkának és Dr. Korponay-Szabó Ilmának. Kutatói munkám első felében köszönöm Dr. Szebeni Beátának, majd Dr. Vannay Ádámnak, Dr. Sziksz Ernának, és a kutatólaboratórium munkatársainak az alap kutatásban nyújtott munkájukat, kiemelve Bernáth Mária szerepét.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Bodánszky Hedvig professzor asszonynak, Dr. Szőnyi Lászlónak és Dr. Dezsőfi Antalnak, TDK hallgatóimnak, valamint az ország 27 IBD-vel foglalkozó egészségügyi intézményének centrumaiban dolgozóknak az önzetlen közreműködésükért, hogy az IBD regiszter létrejöhetett és működhet. Továbbá az I. Sz. Gyermekklinika valamennyi munkatársának, hogy segítők, baráti körülmények között végezhettem tudományos munkámat, kiemelve osztályunk nővéreit és főnővérét: Zsebők Andreát.

Köszönettel tartozom a hazai- és nemzetközi együttműködésünk kiemelkedő kutatóinak, Dr. Papp Máriának és Dr. Lakatos Péter Lászlónak, valamint Dr. Bob Baldassano professzor úrnak, Dr. Peter Mamulának (Philadelphia, CHOP) és Dr. Frank Rümmele professzor úrnak (Párizs, Necker Kórház) az önzetlen támogatásukért, barátságukért.

Végül, de nem utoljára, hálámat fejezem ki családtagjaimnak, különösképpen feleségemnek, Dr. Fazekas Rékának és három gyermekünknek, Katának, Botondnak és Annának, valamint szüleimnek, családtagjaimnak, akiknek megértő türelmessége és szeretete nélkül ezeket az eredményeket nem érhettem volna el.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Veres G, Helin T., Arató András, Färkkilä M., Kantele A., Suomalainen H., Savilahti E. Increased expression of intercellular adhesion molecule-1 and mucosal adhesion molecule $\alpha_4\beta_7$ integrin in small intestinal mucosa of adult patients with food allergy. *Clin Immunol.* 2001; 99: 353-359.
2. Veres G, Westerholm-Ormio M, Kokkonen J, Arató A, Savilahti E. Cytokines and adhesion molecules in duodenal mucosa of children with delayed-type food allergy. *J Pediatr Gastr Nutr.* 2003; 37: 27-34.
3. Mubarak A, Houwen RH, Wolters VM. Celiac disease: an overview from pathophysiology to treatment. *Minerva Pediatr.* 201;64:271-87.
4. Bao F, Green PH, Bhagat G. An update on celiac disease histopathology and the road ahead. *Arch Pathol Lab Med.* 2012;136:735-45.
5. Schulzke JD, Ploeger S, Amasheh M, Fromm A, Zeissig S, Troeger H, Richter J, Bojarski C, Schumann M, Fromm M. Epithelial tight junctions in intestinal inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1165:294-300.
6. Petit CS, Barreau F, Besnier L, Gandille P, Riveau B, Chateau D, Roy M, Berrebi D, Svrcek M, Cardot P, Rousset M, Clair C, Thenet S. Requirement of cellular prion protein for intestinal barrier function and mislocalization in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2012;143:122-132.e15.
7. Levine A, Domanov S, Sukhotnik I, Zangen T, Shaoul R. Celiac-associated peptic disease at upper endoscopy: how common is it? *Scand J Gastroenterol.* 2009;44:1424-8.
8. Lucarelli S, Di Nardo G, Lastrucci G, D'Alfonso Y, Marcheggiano A, Federici T, Frediani S, Frediani T, Cucchiara S. Allergic proctocolitis refractory to maternal hypoallergenic diet in exclusively breast-fed infants: a clinical observation. *BMC Gastroenterol.* 2011 Jul 16;11:82.
9. Cabré E, Domènech E. Impact of environmental and dietary factors on the course of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2012;18:3814-22.
10. Latella G, Papi C. Crucial steps in the natural history of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2012;18:3790-9.
11. Kugathasan S, Judd RH, Hoffmann RG, Heikenen J, Telega G, Khan F, Weisdorf-Schindele S, San Pablo W Jr, Perrault J, Park R, Yaffe M, Brown C, Rivera-Bennett MT, Halabi I, Martinez A, Blank E, Werlin SL, Rudolph CD, Binion DG; Wisconsin Pediatric Inflammatory Bowel Disease Alliance. Epidemiologic and clinical characteristics of children with newly diagnosed inflammatory bowel disease in Wisconsin: a statewide population-based study. *J Pediatr.* 2003;143:525-31.

12. Hildebrand H, Finkel Y, Grahnquist L, Lindholm J, Ekblom A, Askling J. Changing pattern of paediatric inflammatory bowel disease in northern Stockholm 1990-2001. *Gut*. 2003;52:1432-4.
13. Lev-Tzion R, Turner D. Is pediatric IBD treatment different than in adults? *Minerva Gastroenterol Dietol*. 2012;58:137-50.
14. Abraham BP, Mehta S, El-Serag HB. Natural History of Pediatric-onset Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review. *J Clin Gastroenterol*. 2012;46:581-9.
15. Braegger CP, Ballabeni P, Rogler D, Vavricka SR, Friedt M, Pittet V; Swiss IBD Cohort Study Group. Epidemiology of inflammatory bowel disease: Is there a shift towards onset at a younger age? *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011;53:141-4.
16. Heitzeneder S, Seidel M, Förster-Waldl E, Heitger A. Mannan-binding lectin deficiency - Good news, bad news, doesn't matter? *Clin Immunol*. 2012;143:22-38.
17. Lallès JP. Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. *Nutr Rev*. 2010;68:323-32.
18. Abraham C, Medzhitov R. Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2011;140:1729-37.
19. Yamamoto-Furusho JK, Podolsky DK. Innate immunity in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2007;13:5577-80.
20. Kinnebrew MA, Pamer EG. Innate immune signaling in defense against intestinal microbes. *Immunol Rev*. 2012;245:113-31.
21. Cario E. Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16:1583-97.
22. Bodánszky H, Veres G. Gyulladásos bélbetegségek gyermekkorban. *Lege Artis Medicinae*, 2007; 17: 537-544.
23. Veres G. A gyermekkori krónikus gyulladásos bélbetegség (IBD) sajátosságai. *Magy Belorv Arch*. 2008;61:7-12
24. Veres G. A gyulladásos bélbetegség diagnosztikája. *Gyermekeorvos Továbbképzés*, 2007; 4: 221-227.
25. Vasseur F, Gower-Rousseau C, Vernier-Massouille G, Dupas JL, Merle V, Merlin B, Lerebours E, Savoye G, Salomez JL, Cortot A, Colombel JF, Turck D. Nutritional status and growth in pediatric Crohn's disease: a population-based study. *Am J Gastroenterol*. 2010;105:1893-900.
26. Gerasimidis K, McGrogan P, Edwards CA. The aetiology and impact of malnutrition in paediatric inflammatory bowel disease. *J Hum Nutr Diet*. 2011;24:313-26.
27. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*. 2006;55:749-53.

28. Molinié F, Gower-Rousseau C, Yzet T, Yzet T, Merle V, Grandbastien B, Marti R, Lerebours E, Dupas JL, Colombel JF, Salomez JL, Cortot A. Opposite evolution in incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Northern France (1988-1999). *Gut*. 2004; 53:843-8.
29. Pozler O, Maly J, Bonova O, Dedek P, Frühauf P, Havlickova A, Janatova T, Jimramovsky F, Klimova L, Klusacek D, Kocourkova D, Kolek A, Kotalova R, Marx D, Nevoral J, Petro R, Petru O, Plasilova I, Seidl Z, Sekyrova I, Semendak N, Schreierova I, Stanek J, Sykora J, Sulakova A, Toukalkova L, Travnickova R, Volf V, Zahradnicek L, Zenisková I. Incidence of Crohn disease in the Czech Republic in the years 1990 to 2001 and assessment of pediatric population with inflammatory bowel disease. *Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2006; 42:186-9.
30. Benchimol EI, Guttman A, Griffiths AM, Rabeneck L, Mack DR, Brill H, Howard J, Guan J, To T. Increasing incidence of paediatric inflammatory bowel disease in Ontario, Canada: evidence from health administrative data. *Gut*. 2009;58:1490-7.
31. Eidelwein AP, Thompson R, Fiorino K, Abadom V, Oliva-Hemker M. Disease presentation and clinical course in black and white children with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007; 44:555-60.
32. Gupta N, Bostrom AG, Kirschner BS, Ferry GD, Winter HS, Baldassano RN, Gold BD, Abramson O, Smith T, Cohen SA, Heyman MB. Gender differences in presentation and course of disease in pediatric patients with Crohn disease. *Pediatrics*. 2007;120:e1418-25.
33. Weinstein TA, Levine M, Pettei MJ. Age and family history at presentation of pediatric inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2003;37:609-13.
34. Lesage S, Zouali H, Cézard JP. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet*. 2002;70:845-57.
35. Russell RK, Drummond HE, Nimmo EE, Anderson N, Smith L, Wilson DC, Gillett M, McGrogan P, Hassan K, Weaver LT, Bisset M, Mahdi G, Satsangi J. Genotype-phenotype analysis in childhood-onset Crohn's disease: NOD2/CARD15 variants consistently predict phenotypic characteristics of severe disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2005;11:955-64.
36. de Ridder L, Weersma RK, Dijkstra G, van der Steege G, Benninga MA, Nolte IM, Taminiu JA, Hommes DW, Stokkers PC. Genetic susceptibility has a more important role in pediatric-onset Crohn's disease than in adult-onset Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007; 13:1083-92.
37. Lakatos PL, Lakatos L, Szalay F, Willheim-Polli C, Osterreicher C, Tulassay Z, Molnar T, Reinisch W, Papp J, Mozsik G, Ferenci P. Toll-like receptor 4 and NOD2/CARD15 mutations in Hungarian patients with Crohn's disease: phenotype-genotype correlations. *World J Gastroenterol*. 2005;11:1489-95.

38. Kugathasan S, Loizides A, Babusukumar U. Comparative phenotypic and CARD15 mutational analysis among African American, Hispanic, and White children with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2005;11:631-8.
39. Levine A, Kugathasan S, Annese V, Biank V, Leshinsky-Silver E, Davidovich O, Kimmel G, Shamir R, Palmieri O, Karban A, Broeckel U, Cucchiara S. Pediatric onset Crohn's colitis is characterized by genotype-dependent age-related susceptibility. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13:1509-15.
40. Van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER. Autophagy gene ATG16L1 influences susceptibility and disease location but not childhood-onset in Crohn's disease in Northern Europe. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14:338-46.
41. Baldassano RN, Bradfield JP, Monos DS, Kim CE, Glessner JT, Casalunovo T, Frackelton EC, Otieno FG, Kanterakis S, Shaner JL, Smith RM, Eckert AW, Robinson LJ, Onyiah CC, Abrams DJ, Chiavacci RM, Skraban R, Devoto M, Grant SF, Hakonarson H. Association of the T300A non-synonymous variant of the ATG16L1 gene with susceptibility to paediatric Crohn's disease. *Gut.* 2007;56:1171-3.
42. Baldassano RN, Bradfield JP, Monos DS, Kim CE, Glessner JT, Casalunovo T, Frackelton EC, Otieno FG, Kanterakis S, Shaner JL, Smith RM, Eckert AW, Robinson LJ, Onyiah CC, Abrams DJ, Chiavacci RM, Skraban R, Devoto M, Grant SF, Hakonarson H. Association of variants of the interleukin-23 receptor gene with susceptibility to pediatric Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007;5:972-6.
43. Dubinsky MC, Wang D, Picornell Y, Wrobel I, Katzir L, Quiros A, Dutridge D, Wahbeh G, Silber G, Bahar R, Mengesha E, Targan SR, Taylor KD, Rotter JI. IL-23 receptor (IL-23R) gene protects against pediatric Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13:511-5.
44. Amre DK, Mack D, Israel D, Morgan K, Lambrette P, Law L, Grimard G, Deslandres C, Krupoves A, Bucionis V, Costea I, Bissonauth V, Feguery H, D'Souza S, Levy E, Seidman EG. Association between genetic variants in the IL-23R gene and early-onset Crohn's disease: results from a case-control and family-based study among Canadian children. *Am J Gastroenterol.* 2008;103:615-20.
45. Castiglione F, Diaferia M, Morace F, Labianca O, Meucci C, Cuomo A, Panarese A, Romano M, Sorrentini I, D'Onofrio C, Caporaso N, Rispo A. Risk factors for inflammatory bowel diseases according to the "hygiene hypothesis": a case-control, multi-centre, prospective study in Southern Italy. *J Crohns Colitis.* 2012;6:324-9.
46. Lee JC, Bridger S, McGregor C, Macpherson AJ, Jones JE. Why children with inflammatory bowel disease are diagnosed at a younger age than their affected parent. *Gut.* 1999;44:808-11.
47. Bridger S, Lee JC, Bjarnason I, Jones JE, Macpherson AJ. In siblings with similar genetic susceptibility for inflammatory bowel disease, smokers tend to develop Crohn's disease and non-smokers develop ulcerative colitis. *Gut.* 2002;51:21-5.

48. Klement E, Cohen RV, Boxman J. Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80:1342-52.
49. Haslam N, Mayberry JF, Hawthorne AB. Measles, month of birth, and Crohn's disease. *Gut.* 2000; 47:801-3.
50. Levine A, Griffiths A, Markowitz J, Wilson DC, Turner D, Russell RK, Fell J, Ruemmele FM, Walters T, Sherlock M, Dubinsky M, Hyams JS. Pediatric modification of the Montreal classification for inflammatory bowel disease: the Paris classification. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17:1314-21.
51. Turner D, Otley AR, Mack D, Hyams J, de Bruijne J, Uusoue K, Walters TD, Zachos M, Mamula P, Beaton DE, Steinhart AH, Griffiths AM. Development, validation, and evaluation of a Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index: A prospective multicenter study. *Gastroenterology.* 2007;133:423-432.
52. Levine A, de Bie CI, Turner D, Cucchiara S, Sladek M, Murphy MS, Escher JC; and the EUROKIDS Porto IBD Working Group of ESPGHAN (see Appendix). Atypical disease phenotypes in pediatric ulcerative colitis: 5-year analyses of the EUROKIDS Registry. *Inflamm Bowel Dis.* 2012 May 8. doi: 10.1002/ibd.23013.
53. Turner D, Otley AR, Mack D, Hyams J, de Bruijne J, Uusoue K, Walters TD, Zachos M, Mamula P, Beaton DE, Steinhart AH, Griffiths AM. Development, validation, and evaluation of a pediatric ulcerative colitis activity index: a prospective multicenter study. *Gastroenterology.* 2007;133:423-32.
54. Turner D, Hyams J, Markowitz J, Lerer T, Mack DR, Evans J, Pfefferkorn M, Rosh J, Kay M, Crandall W, Keljo D, Otley AR, Kugathasan S, Carvalho R, Oliva-Hemker M, Langton C, Mamula P, Bousvaros A, LeLeiko N, Griffiths AM; Appraisal of the pediatric ulcerative colitis activity index (PUCAI). *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15:1218-23.
55. Romano C, Famiani A, Gallizzi R, Comito D, Ferrau' V, Rossi P. Indeterminate colitis: a distinctive clinical pattern of inflammatory bowel disease in children. *Pediatrics.* 2008;122:e1278-81.
56. Carvalho RS, Abadom V, Dilworth HP, Thompson R, Oliva-Hemker M, Cuffari C. Indeterminate colitis: a significant subgroup of pediatric IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:258-62.
57. Mamula P, Telega GW, Markowitz JE, Brown KA, Russo PA, Piccoli DA, Baldassano RN. Inflammatory bowel disease in children 5 years of age and younger. *Am J Gastroenterol.* 2002;97:2005-10.
58. Glocker E, Grimbacher B. Inflammatory bowel disease: is it a primary immunodeficiency? *Cell Mol Life Sci.* 2012;69:41-8.
59. Urlep D, Mamula P, Baldassano R. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2005;51:147-63.

60. Dubinsky MC, Ofman JJ, Urman M, Targan SR, Seidman EG. Clinical utility of serodiagnostic testing in suspected pediatric inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2001;96:758-65.
61. Zholudev A, Zurakowski D, Young W, Leichtner A, Bousvaros A. Serologic testing with ANCA, ASCA, and anti-OmpC in children and young adults with Crohn's disease and ulcerative colitis: diagnostic value and correlation with disease phenotype. *Am J Gastroenterol*. 2004;99:2235-2241.
62. Khan K, Schwarzenberg SJ, Sharp H, Greenwood D, Weisdorf-Schindele S. Role of serology and routine laboratory tests in childhood inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Disease*. 2002;8:325-9.
63. Bartunková J, Kolárová I, Sedivá A, Hölzelová E. Antineutrophil cytoplasmic antibodies, anti- *Saccharomyces cerevisiae* antibodies, and specific IgE to food allergens in children with inflammatory bowel disease. *Clin Immunol*. 2002;102:62-8.
64. Mainardi E, Villanacci V, Bassotti G, Liserre B, Rossi E, Incardona P, Falchetti D, Tonegatti L, Montanelli A, Barabino A, Coccia C, Gambini C. Diagnostic value of serological assays in pediatric inflammatory bowel disorders. *Digestion*. 2007;75:210-4.
65. Elitsur Y, Lawrence Z, Tolaymat N. The diagnostic accuracy of serologic markers in children with IBD: The West Virginia experience. *J Clin Gastroenterol*. 2005;39:670-3.
66. Desplat-Jégo S, Johanet C, Escande A, Goetz J, Fabien N, Olsson N, Ballot E, Sarles J, Baudon JJ, Grimaud JC, Veyrac M, Chamouard P, Humbel RL. Update on Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies, anti-nuclear associated anti-neutrophil antibodies and antibodies to exocrine pancreas detected by indirect immunofluorescence as biomarkers in chronic inflammatory bowel diseases: results of a multicenter study. *World J Gastroenterol*. 2007;13:2312-8.
67. Vasiliauskas EA, Kam LY, Karp LC, et al. Marker antibody expression stratifies Crohn's disease into immunologically homogeneous subgroups with distinct clinical characteristics. *Gut*. 2000;47:487-496.
68. Amre DK, Lu SE, Costea F, Seidman EG. Utility of serological markers in predicting the early occurrence of complications and surgery in pediatric Crohn's disease patients. *Am J Gastroenterol*. 2006;101:645-52.
69. Stöcker W, Otte M, Ulrich S, Normann D, Finkbeiner H, Stöcker K, Jantschek G, Scriba PC. Autoimmunity to pancreatic juice in Crohn's disease. Results of autoantibody screening in patients with chronic inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1987;22:41-52.
70. Lakatos PL, Altorjay I, Szamosi T, Palatka K, Vitalis Z, Tumpek J, Sipka S, Udvardy M, Dinya T, Lakatos L, Kovacs A, Molnar T, Tulassay Z, Miheller P, Barta Z, Stocker W, Papp J, Veres G, Papp M; Hungarian IBD Study Group. Pancreatic autoantibodies are associated with reactivity to microbial antibodies, penetrating disease behaviour, perianal disease, and extraintestinal manifestations, but not with NOD2/CARD15 or TLR4 genotype in a Hungarian IBD cohort. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15:365-74.

71. Joossens S, Vermeire S, Van Steen K, Godefroidis G, Claessens G, Pierik M, Vlietinck R, Aerts R, Rutgeerts P, Bossuyt X. Pancreatic autoantibodies in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2004;10:771-7.
72. Roggenbuck D, Hausdorf G, Martinez-Gamboa L, Reinhold D, Büttner T, Jungblut PR, Porstmann T, Laass MW, Henker J, Büning C, Feist E, Conrad K. Identification of GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, as autoantigen of pancreatic antibodies in Crohn's disease. *Gut.* 2009;58:1620-8.
73. Roggenbuck D, Reinhold D, Wex T, Goihl A, von Arnim U, Malfertheiner P, Büttner T, Porstmann T, Porstmann S, Liedvogel B, Bogdanos DP, Laass MW, Conrad K. Autoantibodies to GP2, the major zymogen granule membran glycoprotein, are new markers in Crohn's disease. *Clin Chim Acta.* 2011;412:718-24.
74. Klebl FH, Bataille F, Huy C, Hofstädter F, Schölmerich J, Rogler G. Klebl FH, Bataille F, Huy C, et al. Association of antibodies to exocrine pankreas with subtypes of Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2005;17:73-7.
75. Koutroubakis IE, Drygiannakis D, Karmiris K, Drygiannakis I, Makreas S, Kouroumalis EA. Pancreatic autoantibodies in Greek patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 2005;50:2330-4.
76. Brouwer N, Dolman KM, van Houdt M, Sta M, Roos D, Kuijpers TW. Mannose-binding lectin (MBL) facilitates opsonophagocytosis of yeasts but not of bacteria despite MBL binding. *J Immunol.* 2008;180:4124-32.
77. Seyfarth J, Garred P, Madsen HO. Extra-hepatic transcription of the human mannose-binding lectin gene (mbl2) and the MBL-associated serine protease 1-3 genes. *Mol Immunol.* 2006;43:962-71.
78. Müller S, Schaffer T, Flogerzi B, Seibold-Schmid B, Schnider J, Takahashi K, Darfeuille-Michaud A, Vazeille E, Schoepfer AM, Seibold F. Mannan-binding lectin deficiency results in unusual antibody production and excessive experimental colitis in response to mannose-expressing mild gut pathogens. *Gut.* 2010;59:1493-500.
79. Ip WK, Takahashi K, Moore KJ, Stuart LM, Ezekowitz RA. Mannose-binding lectin enhances Toll-like receptors 2 and 6 signaling from phagosome. *J Exp Med.* 2008;205:169-181.
80. Garred P, Larsen F, Seyfarth J, Fujita R, Madsen HO. Mannose-binding lectin and its genetic variants. *Genes Immun.* 2006;7:85-94.
81. Ytting H, Christensen IJ, Thiel S, Jensenius JC, Svendsen MN, Nielsen L, Lottenburger T, Nielsen HJ. Biological variation in circulating levels of mannan-binding lectin (MBL) and MBL-associated serine protease-2 and the influence of age, gender and physical exercise. *Scand J Immunol.* 2007;66:458-464.
82. Sorensen CM, Hansen TK, Steffensen R, Jensenius JC, Thiel S. Hormonal regulation of mannan –binding lectin synthesis in hepatocytes. *Clin Exp Immunol.* 2006;145:173-82.

83. Koch A, Melbye M, Sørensen P, Homøe P, Madsen HO, Mølbak K, Hansen CH, Andersen LH, Hahn GW, Garred P. Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. *JAMA*. 2001; 285:1316-21.
84. Bowmann LH, Roep BO, Roos A. Mannose-binding lectin: clinical implications for infection, transplantation, and autoimmunity. *Hum Immunol*. 2006;67:247-56.
85. Boniotto M, Braidà L, Baldas V, Not T, Ventura A, Vatta S, Radillo O, Tedesco F, Percopo S, Montico M, Amoroso A, Crovella S. Evidence of a correlation between mannose binding lectin and celiac disease: a model for other autoimmune diseases. *J Mol Med*. 2005;83:308-15.
86. Rector A, Lemey P, Laffut W, Keyaerts E, Struyf F, Wollants E, Vermeire S, Rutgeerts P, Van Ranst M. Mannan-binding lectin (MBL) gene polymorphisms in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Genes Immun*. 2001;2:323-328.
87. Sivaram G, Tiwari SK, Bardia A, Manoj G, Santhosh B, Saikant R, Aejaaz H, Vishnupriya S, Khan AA, Habibullah C. Association of genetic variants of mannan-binding (MBL) lectin-2 gene, MBL levels and function in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Innate Immun*. 2011;17:526-31.
88. Papp M, Lakatos PL, Harsfalvi J, Farkas G, Palatka K, Udvardy M, Molnar T, Farkas K, Nagy F, Veres G, Lakatos L, Kovacs A, Dinya T, Kocsis AK, Papp J; Hungarian IBD Study Group, Altorjay I. Mannose-binding lectin level and deficiency is not associated with inflammatory bowel diseases, disease phenotype, serology profile, and NOD2/CARD15 genotype in a large Hungarian cohort. *Hum Immunol*. 2010;71:407-413.
89. Bak-Romaniszyn L, Szala A, Sokolowska A, Mierzwa G, Czerwionka-Szaflarska M, Swierzko AS, Zeman K, Cedzynski M. Mannan-binding lectin deficiency in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2011;46:1275-1278.
90. Koulaouzidis A, Douglas S, Rogers MA, Arnott ID, Plevris JN. Fecal calprotectin: a selection tool for small bowel capsule endoscopy in suspected IBD with prior negative bi-directional endoscopy. *Scand J Gastroenterol*. 2011;46:561-6.
91. Quail MA, Russell RK, Van Limbergen JE, Rogers P, Drummond HE, Wilson DC, Gillett PM. Fecal calprotectin complements routine laboratory investigations in diagnosing childhood inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15:756-9.
92. Ashorn S, Honkanen T, Kolho KL, Ashorn M, Välineva T, Wei B, Braun J, Rantala I, Luukkaala T, Iltaanen S. Fecal calprotectin levels and serological responses to microbial antigens among children and adolescents with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15:199-205.
93. Diamanti A, Colistro F, Basso MS, Papadatou B, Francalanci P, Bracci F, Muraca M, Knafelz D, De Angelis P, Castro M. Clinical role of calprotectin assay in determining histological relapses in children affected by inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14:1229-35.

94. IBD Working Group of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN): Inflammatory bowel disease in children and adolescents: Recommendations for diagnosis—the Porto Criteria. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005;41:1-7.
95. Castellaneta SP, Afzal NA, Greenberg M, Deere H, Davies S, Murch SH, Walker-Smith JA, and Thomson M. Diagnostic role of upper endoscopy in pediatric inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004;39:257-61.
96. Tobin JM, Sinha B, Ramini P, Saleh AR, Murphy MS. Upper gastrointestinal mucosal disease in pediatric Crohn disease and ulcerative colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2001;32:443-8.
97. Abdullah BA, Gupta SK, Croffie JN, Pfefferkorn MD, Molleston JP, Corkins MR, Fitzgerald JF. The role of esophagogastroduodenoscopy in the initial evaluation of childhood inflammatory bowel disease a 7-year study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;35:636-40.
98. Lemberg DA, Clarkson CM, Bohane TD, Day AS. Role of esophagogastroduodenoscopy in the initial assessment of children with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005;20:1696-700.
99. Vind I, Riis L, Jess T, Knudsen E, Pedersen N, Elkjaer M, Bak Andersen I, Wewer V, Nørregaard P, Moesgaard F, Bendtsen F, Munkholm P; DCCD study group. Increasing in incidences of inflammatory bowel disease and decreasing surgery rates in Copenhagen city and county, 2003-2005: a population-based study from the Danish Crohn colitis database. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:1274-82.
100. Jess T, Riis L, Vind I, Winther KV, Borg S, Binder V, Langholz E, Thomsen OQ, Munkholm P. Changes in clinical characteristics, course, and prognosis of inflammatory bowel disease during the last 5 decades: a population-based study from Copenhagen, Denmark. *Inflamm Bowel Disease.* 2007;13:481-9.
101. Heyman MB, Kirschner BS, Gold BD, Ferry G, Baldassano R, Cohen SA, Winter HS, Fain P, King C, Smith T, El-Serag HB. Children with early-onset inflammatory bowel disease (IBD) analysis of a pediatric IBD consortium registry. *J Pediatr.* 2005;146:35-40.
102. Ammourey RF, Pfefferkorn MD. Significance of esophageal Crohn disease in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011;52:291-294.
103. Sawczenko A, Sandhu BK. Presenting features of inflammatory bowel disease in Great Britain and Ireland. *Arch Dis Child.* 2003;88:995-1000.
104. De Matos V, Russo PA, Cohen AB, Mamula P, Baldassano RN, Piccoli DA. Frequency and clinical correlations of granulomas in children with Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008;46:392-8.
105. Critch J, Day AS, Otley A, King-Moore C, Teitelbaum JE, Shashidhar H. Use of enteral nutrition for the control of intestinal inflammation in pediatric Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;54:298-305.

106. Michail S, Ramsy M, Soliman E. Advances in inflammatory bowel diseases in children. *Minerva Pediatr.* 2012;64:257-70.
107. Veres G. Hagymányos és új gyógyszeres kezelési lehetőségek gyermekkori Crohn-betegségben. *Gyermekeorvos továbbképzés.* 2008;7, 238-244.
108. Veres G, Baldassano RN, Mamula P. Infliximab therapy for pediatric Crohn's disease. *Expert Opin Biol Ther.* 2007;7:1869-80.
109. Veres G, Miheller P. Infliximab alkalmazása gyermekkori és felnőttkori Crohn-betegségben. *Eur J Gastroent Hepat (magyar kiadás).* 2008;12:1-9.
110. Hyams J, Crandall W, Kugathasan S, Griffiths A, Olson A, Johannis J, Liu G, Travers S, Heuschkel R, Markowitz J, Cohen S, Winter H, Veereman-Wauters G, Ferry G, Baldassano R: Induction and maintenance infliximab therapy for the treatment of moderate-to-severe Crohn's disease in children. *Gastroenterology.* 2007;132:863-873.
111. Crandall W, Hyams J, Kugathasan S, Griffiths A, Zrubek J, Olson A, Liu G, Heuschkel R, Markowitz J, Cohen S, Winter H, Veereman-Wauters G, Ferry G, Baldassano RN. Infliximab therapy in children with concurrent perianal Crohn disease: observations from REACH. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;49:183-90.
112. Hyams JS, Griffiths A, Markowitz J, Baldassano RN, Faubion WA Jr, Colletti RB, Dubinsky M, Kierkus J, Rosh J, Wang Y, Huang B, Bittle B, Marshall M, Lazar A. Safety and efficacy of adalimumab for moderate to severe Crohn's disease in children. *Gastroenterology.* 2012; 143: 365-374.
113. van der Windt DA, Jellema P, Mulder CJ, Kneepkens CM, van der Horst HE. Diagnostic testing for celiac disease among patients with abdominal symptoms: a systematic review. *JAMA.* 2010;303:1738-46.
114. Mustalahti K, Catassi C, Reunanen A, Fabiani E, Heier M, McMillan S, Murray L, Metzger MH, Gasparin M, Bravi E, Mäki M; Coeliac EU Cluster, Project Epidemiology. The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Ann Med.* 2010;42:587-95.
115. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, Troncone R, Giersiepen K, Branski D, Catassi C, Leigeman M, Mäki M, Ribes-Koninckx C, Ventura A, Zimmer KP; ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis; ESPGHAN Gastroenterology Committee. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;54:136-60.
116. Lindfors K, Kaukinen K. Contribution of celiac disease autoantibodies to the disease process. *Expert Rev Clin Immunol.* 2012;8:151-4.
117. Salmi TT, Collin P, Järvinen O, Haimila K, Partanen J, Laurila K, Korponay-Szabo IR, Huhtala H, Reunala T, Mäki M, Kaukinen K. Immunoglobulin A autoantibodies against transglutaminase 2 in the small intestinal mucosa predict forthcoming coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;24:541-52.

118. Hadjivassiliou M, Mäki M, Sanders DS, Williamson CA, Grünewald RA, Woodroffe NM, Korponay-Szabó IR. Autoantibody targeting of brain and intestinal transglutaminase in gluten ataxia. *Neurology*. 2006;66:373-7.
119. Sárdy M, Kárpáti S, Merkl B, Paulsson M, Smyth N. Epidermal transglutaminase (TGase 3) is the autoantigen of dermatitis herpetiformis. *J Exp Med*. 2002;195:747-57.
120. Malamut G, Meresse B, Cellier C, Cerf-Bensussan N. Refractory celiac disease: from bench to bedside. *Semin Immunopathol*. 2012;34:601-13.
121. Kurien M, Evans KE, Hopper AD, Hale MF, Cross SS, Sanders DS. Duodenal bulb biopsies for diagnosing adult celiac disease: is there an optimal biopsy site? *Gastrointest Endosc*. 2012;75:1190-6.
122. Takizawa Y, Kishimoto H, Kitazato T, Tomita M, Hayashi M. Changes in protein and mRNA expression levels of claudin family after mucosal lesion by intestinal ischemia/reperfusion. *Int J Pharm*. 2012;426:82-9.
123. Marsh MN. Studies of intestinal lymphoid tissue. IV--The predictive value of raised mitotic indices among jejunal epithelial lymphocytes in the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy. *J Clin Pathol*. 1982;35:517-25.
124. Vécsei A, Amann G, Hegenbart S, Liedlgruber M, Uhl A. Automated Marsh-like classification of celiac disease in children using local texture operators. *Comput Biol Med*. 2011;41:313-25.
125. Györffy H, Holczbauer A, Nagy P, Szabó Z, Kupcsulik P, Páska C, Papp J, Schaff Z, Kiss A. Claudin expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Virchows Arch*. 2005;447:961-8.
126. Szebeni B, Vannay A, Sziksz E, Prókai A, Cseh A, Veres G, Dezsofi A, Györffy H, Szabó IR, Arató A. Increased expression of serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1 in the duodenal mucosa of children with coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;50:147-53.
127. Vannay A, Sziksz E, Prókai A, Veres G, Molnár K, Szakál DN, Onódy A, Korponay-Szabó IR, Szabó A, Tulassay T, Arató A, Szebeni B. Increased expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in coeliac disease. *Pediatr Res*. 2010;68:118-22.
128. Whitham M, Fortes MB. Heat shock protein 72: release and biological significance during exercise. *Front Biosci*. 2008;13:1328-39.
129. Odashima M, Otaka M, Jin M, Konishi N, Sato T, Kato S et al. Induction of a 72-kDa heat-shock protein in cultured rat gastric mucosal cells and rat gastric mucosa by zinc L-carnosine. *Dig Dis Sci*. 2002;47:2799-804.
130. Asea A, Jean-Pierre C, Kaur P, Rao P, Linhares IM, Skupski D et al. Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids. *J Reprod Immunol*. 2008;79:12-7.

131. Wheeler DS, Chase MA, Senft AP, Poynter SE, Wong HR, Page K et al. Extracellular Hsp72, an endogenous DAMP, is released by virally infected airway epithelial cells and activates neutrophils via Toll-like receptor (TLR)-4. *Respir Res.* 2009;10:31.
132. Liu TS, Musch MW, Sugi K, Walsh-Reitz MM, Ropeleski MJ, Hendrickson BA et al. Protective role of HSP72 against *Clostridium difficile* toxin A-induced intestinal epithelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;284:1073-82.
133. Lanneau D, de Thonel A, Maurel S, Didelot C, Garrido C. Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. *Prion.* 2007;1:53-60.
134. Eigenmann PA. Mechanisms of food allergy. *Pediatr Allergy Immunol.* 2009;20:5-11.
135. Fox VL. Gastrointestinal bleeding in infancy and childhood. *Gastroenterol Clin North Am.* 2000;29:37-66.
136. Troncone R, Discepolo V. Colon in food allergy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;48 Suppl 2:S89-91.
137. Moon A, Kleinman RE. Allergic gastroenteropathy in children. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1995;74:5-12;
138. Machida HM, Catto Smith AG, Gall DG, et al. Allergic colitis in infancy: clinical and pathologic aspects. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1994;19:22-6.
139. Arvola T, Ruuska T, Keränen J, et al. Rectal bleeding in infancy: clinical, allergological, and microbiological examination. *Pediatrics.* 2006;117:e760-8.
140. Vandenplas Y, Koletzko S, Isolauri E, et al. Guidelines for the diagnosis and management of cow's milk protein allergy in infants. *Arch Dis Child.* 2007;92:902-8.
141. Xanthakos SA, Schwimmer JB, Melin-Aldana H, et al. Prevalence and outcome of allergic colitis in healthy infants with rectal bleeding: a prospective cohort study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005;41:16-22
142. Pott J, Hornef M. Innate immune signalling at the intestinal epithelium in homeostasis and disease. *EMBO Rep.* 2012;13:684-98.
143. Cherrier M, Ohnmacht C, Cording S, Eberl G. Development and function of intestinal innate lymphoid cells. *Curr Opin Immunol.* 2012;24:277-83.
144. Ruan Q, Chen YH. Nuclear factor- κ B in immunity and inflammation: the Treg and Th17 connection. *Adv Exp Med Biol.* 2012;946:207-21.
145. Corthay A. How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol.* 2009;70:326-36.
146. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:490-500.
147. Chatenoud L, Bach JF. Adaptive human regulatory T cells: myth or reality? *J Clin Invest.* 2006;116:2325-2327.

148. Ding Y, Xu J, Bromberg JS. Regulatory T cell migration during an immune response. *Trends Immunol.* 2012;33:174-80.
149. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ Treg cells. *J Exp Med.* 2006;203:1701-1711.
150. d'Hennezel E, Bin Dhuban K, Torgerson T, Piccirillo C. The immunogenetics of immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet.* 2012;49:291-302.
151. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol.* 2010;11:7-13.
152. Mahnke K, Bedke T, Enk AH. Regulatory conversation between antigen presenting cells and regulatory T cells enhance immune suppression. *Cell Immunol.* 2007;250:1-13.
153. Walker LS. Regulatory T cells overturned: the effectors fight back. *Immunology.* 2009;126:466-74.
154. Matta BM, Castellana A, Thomson AW. Tolerogenic plasmacytoid DC. *Eur J Immunol.* 2010;40:2667-76.
155. Hubert P, Jacobs N, Caberg JH, Boniver J, Delvenne P. The cross-talk between dendritic and regulatory T cells: good or evil? *J Leukoc Biol.* 2007;82:781-94.
156. Cardenas PA, Huang Y, Ildstad ST. The role of pDC, recipient T(reg) and donor T(reg) in HSC engraftment: Mechanisms of facilitation. *Chimerism.* 2011;2:65-70.
157. Cole JE, Georgiou E, Monaco C. The expression and functions of toll-like receptors in atherosclerosis. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:393946.
158. Venet F, Pachot A, Debard AL, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A, Powell WS, Monneret G. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T lymphocytes inhibit lipopolysaccharide-induced monocyte survival through a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. *J Immunol.* 2006;177:6540-7.
159. Nowak M, Stein-Streilein J. Invariant NKT cells and tolerance. *Int Rev Immunol.* 2007;26:95-119.
160. Ralainirina N, Poli A, Michel T, Poos L, Andrès E, Hentges F, Zimmer J. Control of NK cell functions by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Leukoc Biol.* 2007;81:144-53.
161. Ghiringhelli F, Ménard C, Martin F, Zitvogel L. The role of regulatory T cells in the control of natural killer cells: relevance during tumor progression. *Immunol Rev.* 2006;214:229-38.
162. Zhang C, Zhang J, Tian Z. The regulatory effect of natural killer cells: do "NK-reg cells" exist? *Cell Mol Immunol.* 2006;3:241-54.
163. Szymczak-Workman AL, Delgoffe GM, Green DR, Vignali DA. Cutting edge: regulatory T cells do not mediate suppression via programmed cell death pathways. *J Immunol.* 2011;187:4416-20.

164. Liu N, Zheng Y, Zhu Y, Xiong S, Chu Y. Selective impairment of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells by paclitaxel is explained by Bcl-2/Bax mediated apoptosis. *Int Immunopharmacol*. 2011;11:212-9.
165. Spits H, Cupedo T. Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:647-75.
166. Caprioli F, Caruso R, Sarra M, Pallone F, Monteleone G. Disruption of inflammatory signals by cytokine-targeted therapies for inflammatory bowel diseases. *Br J Pharmacol*. 2012;165:820-8.
167. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125:S3-23.
168. Spits H, Di Santo JP. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat Immunol*. 2011;12:21-7.
169. Cario E. Heads up! How the intestinal epithelium safeguards mucosal barrier immunity through the inflammasome and beyond. *Curr Opin Gastroenterol*. 2010;26:583-90.
170. Cario E. Barrier-protective function of intestinal epithelial Toll-like receptor 2. *Mucosal Immunol*. 2008;1 Suppl 1:S62-6.
171. Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, Thaiss CA, Kau AL, Eisenbarth SC, Jurczak MJ, Camporez JP, Shulman GI, Gordon JI, Hoffman HM, Flavell RA. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*. 2012;482(7384):179-85.
172. Fukata M, Abreu MT. What are toll-like receptors and what role may they have in IBD? *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14 Suppl 2:S90-2.
173. Tewari R, Choudhury SR, Ghosh S, Mehta VS, Sen E. Involvement of TNF α -induced TLR4-NF- κ B and TLR4-HIF-1 α feed-forward loops in the regulation of inflammatory responses in glioma. *J Mol Med (Berl)*. 2012;90:67-80.
174. Troutman TD, Bazan JF, Pasare C. Toll-like receptors, signaling adapters and regulation of the pro-inflammatory response by PI3K. *Cell Cycle*. 2012;11(19).
175. Veerappan SG, O'Morain CA, Daly JS, Ryan BM. Review article: the effects of antitumour necrosis factor- α on bone metabolism in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;33:1261-72.
176. Olsen L, Bressendorff S, Troelsen JT, Olsen J. Differentiation-dependent activation of the human intestinal alkaline phosphatase promoter by HNF-4 in intestinal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;289:G220-6.
177. Mizumori M, Ham M, Guth PH, Engel E, Kaunitz JD, Akiba Y. Intestinal alkaline phosphatase regulates protective surface microclimate pH in rat duodenum. *J Physiol*. 2009;587(Pt 14):3651-63.

178. Jackson DA, Mabury SA. Enzymatic kinetic parameters for polyfluorinated alkyl phosphate hydrolysis by alkaline phosphatase. *Environ Toxicol Chem.* 2012;31:1966-71.
179. Fan MZ, Adeola O, Asem EK, King D. Postnatal ontogeny of kinetics of porcine jejunal brush border membrane-bound alkaline phosphatase, aminopeptidase N and sucrase activities. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2002;132:599-607.
180. Richter JM, Schanbacher BL, Huang H, Xue J, Bauer JA, Giannone PJ. LPS-binding protein enables intestinal epithelial restitution despite LPS exposure. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;54:639-44.
181. Geddes K, Philpott DJ. A new role for intestinal alkaline phosphatase in gut barrier maintenance. *Gastroenterology.* 2008;135:8-12.
182. Tamura Y, Torigoe T, Kutomi G, Hirata K, Sato N. New paradigm for intrinsic function of heat shock proteins as endogenous ligands in inflammation and innate immunity. *Curr Mol Med.* 2012 Jul 17. [Epub ahead of print]
183. Tuin A, Poelstra K, de Jager-Krikken A, Bok L, Raaben W, Velders MP, Dijkstra G. Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats. *Gut.* 2009;58:379-87.
184. Prasad KK, Thapa BR, Nain CK, Sharma AK, Singh K. Brush border enzyme activities in relation to histological lesion in pediatric celiac disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23(8 Pt 2):e348-52.
185. Minchinton RM, Dean MM, Clark TR, Heatley S, Mullighan CG. Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population. *Scand J Immunol* 2002;56:630-41.
186. Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, Webb G, Spottl T, Andus T, Scholmerich J, Herfarth H, Ray K, Falk W, Rogler G. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology.* 2002;122: 1987-2000.
187. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, Shapiro M, Vasconcellos L, Harmon W, Strom TB. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1997;94:695-700.
188. Veres G. és a Magyar Gyermekek IBD regiszter részvevői. A magyarországi gyermekkori gyulladásos bélbetegségek (IBD) regiszterének első éves (2007) elemzése. *Gyermekegyógyászat.* 2008;59:282-287.
189. Kovacs M, Muller KE, Arato A, Lakatos PL, B. Kovacs J, Varkonyi Á, Solyom E, Polgar M, Nemes É, Guthy I, Tokodi I, Toth G, Horvath Á, Tarnok A, Tomsits E, Csoszánzky N, Balogh M, Vass N, Bodi P, Dezsofi A, Gardos L, Micskey É, Papp M, Szucs D, Cseh D, Molnar K, Szabo D, Veres G. Diagnostic yield of upper endoscopy in paediatric patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. Subanalysis of the HUPIR registry. *J Crohn's Colitis.* 2012;6:86-94.

190. Veres G, HUPIR, M. Papp, P. Lakatos. A nation-wide registry of pediatric IBD: epidemiology, activity indices, laboratory data, therapeutic managements, and one year follow-up. JCC 2012;06:S179 (absztrakt).
191. Müller KE, a Magyar Gyermekek IBD Regiszter részvevői, Veres G. Az extraintesztinális manifesztáció gyakorisága a gyulladásos bélbetegségben szenvedő gyermeknél a Magyar Gyermekek IBD Regiszter 2008-as adatai alapján. Gyermekgyógyászat. 2010;61:15-21.
192. Veres G, Szabó D, Várkonyi A, Tari B, Polgár M, Kovács J, Horváth A, Tomsits E, Tokodi I, Bodánszky H, Dezsöfi A, Szakos E, Vass N, Ruzinkó V, Kovács M, Müller KE, Arató A. [Analysis of infliximab treated pediatric patients with Crohn disease in Hungary.]. Orv Hetil. 2010;151:179-83.
193. Veres G, Baldassano RN, Mamula P. Infliximab therapy for pediatric Crohn's disease. Expert Opin Biol Ther. 2007;7:1869-80.
194. Veres G. Infliximab-terápia alkalmazása gyermekkori Crohn-betegségben. Gyermekgyógyászati Továbbképző szemle. 2011;16:123-126.
195. Szabó D, Arató A, Dezsöfi A, Molnár K, Müller KE, Veres G. Rövid távú infliximab kezelés hatása Crohn-beteg gyermekekben. Gyermekgyógyászat. 2011;6:297-300.
196. Veres G, Putz R, Szabó D, Molnár K, Bodánszky H, Dezsöfi A, Arató A. [Adalimumab treatment in infliximab resistant pediatric patient with Crohn's disease.]. Orv Hetil. 2009;150:1858-60.
197. Kovacs M, Papp M, Lakatos P, Jacobsen S, Nemes É, Polgar M, Solyom E, Bodi P, Horvath Á, Molnar K, Szabo D, Cseh Á, Muller KE, Dezsöfi A, Arato A, Veres G. Low mannose-binding lectin (MBL) is associated with paediatric inflammatory bowel diseases and ileal involvement in patients with Crohn disease. J Crohn's Colitis, 2012 (közlésre elfogadva) DOI: 10.1016/j.crohns.2012.03.008.
198. Kovacs M, Lakatos PL, Papp M, Jacobsen S, Nemes E, Polgar M, Solyom E, Bodi P, Horvath A, Muller KE, Molnar K, Szabo D, Cseh A, Dezsöfi A, Arato A, Veres G. Pancreatic autoantibodies and autoantibodies against goblet cells in pediatric patients with inflammatory bowel disease (IBD). J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2012;55:429-35.
199. Szebeni B, Veres G (mindketten első szerzők), Dezsöfi A, Rusai K, Vannay A, Mraz M, Majorova E, Arató A. Increased expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease. Clin Exp Immunol. 2008;151:34-41.
200. Molnár K, Vannay Á, Szebeni B, Bánki NF, Sziksz E, Cseh Á, Györffy H, Lakatos PL, Papp M, Arató A, Veres G. Intestinal Alkaline Phosphatase in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol 2012;18:3254-9.
201. Á. Cseh, B. Vásárhelyi, K. Molnár, B. Szalay, P. Svec, A. Treszl, A. Dezsöfi, PL. Lakatos, A. Arató, T. Tulassay, G. Veres. Immune phenotype in children with therapy-naïve, remitted and relapsed Crohn's disease. World J Gastroenterol 2010;16:1600-9

202. Nagy Szakál D, Gyorffy H, Arató A, Cseh A, Molnár K, Papp M, Dezsöfi A, Veres G. Mucosal expression of claudins 2, 3 and 4 in proximal and distal part of duodenum in children with coeliac disease. *Virchows Arch.* 2010;456:245-50.
203. Sziksz E, Veres G (mindketten elsőszerek), Vannay A, Prókai A, Gál K, Onody A, Korponay-Szabó IR, Reusz G, Szabó A, Tulassay T, Arató A, Szebeni B. Increased Heat Shock Protein 72 Expression in Celiac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010;51:573-8.
204. Molnár K, Vannay A, Sziksz E, Bánki NF, Györffy H, Arató A, Dezsöfi A, Veres G. Decreased mucosal expression of intestinal alkaline phosphatase in children with coeliac disease. *Virchows Arch.* 2012;460:157-161.
205. Veres G, Korponay-Szabó I, Maka E, Glasz T, Mamula P, Papp M, Dezsöfi A, Arató A. Duodenal Ulceration in a Patient With Celiac Disease and Plasminogen I Deficiency: Coincidence or Cofactors? *Pediatrics.* 2011;128:e1302-6.
206. Cseh A, Molnár K, Pintér P, Szalay B, Szebeni B, Treszl A, Arató A, Vásárhelyi B, Veres G. Regulatory T Cells and T Helper Subsets in Breast-fed Infants With Hematochezia Caused by Allergic Colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010;51:675-7.
207. Pintér V, Györffy H, Arató A, Dezsöfi A, Molnár K, Veres G. Eosinophil- és allergias colitises csecsemők laboratóriumi és colonoscopiás jellemzői. *Gyermekegyógyászat,* 2008;59:291-295.
208. Sawczenko A, Sandhu BK, Logan RFA. Prospective survey of childhood inflammatory bowel disease in the British Isles. *Lancet.* 2001;357:1093-1094.
209. Turunen P, Kolho KL, Auvinen A. Incidence of inflammatory bowel disease in Finnish children, 1987-2003. *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12:677-683.
210. Lakatos L, Mester G, Erdélyi Zs. Striking elevation in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in a province of western Hungary between 1977-2001. *World J Gastroenterol.* 2004;10:404-409.
211. Lakatos L, Kiss LS, David G. Incidence, disease phenotype at diagnosis, and early disease course in inflammatory bowel diseases in Western Hungary, 2002–2006. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17: 2558–2565.
212. Sawczenko A, Sandhu BK, Logan RFA. Prospective survey of childhood inflammatory bowel disease in the British Isles. *Lancet.* 2001;357:1093-1094.
213. Perminow G, Brackmann S, Lyckander LG, Franke A, Borthne A, Rydning A, Aamodt G, Schreiber S, Vatn MH; IBSEN-II Group. A characterization in childhood inflammatory bowel disease, a new population-based inception cohort from South-Eastern Norway, 2005-07, showing increased incidence in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol.* 2009;44:446-56.
214. Dubner SE, Shults J, Baldassano RN, Zemel BS, Thayu M, Burnham JM, Herskovitz RM, Howard KM, Leonard MB. Longitudinal assessment of bone density and structure

- in an incident cohort of children with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2009;136:123-30.
215. Pfefferkorn M, Burke G, Griffiths A, Markowitz J, Rosh J, Mack D, Otley A, Kugathasan S, Evans J, Bousvaros A, Moyer MS, Wyllie R, Oliva-Hemker M, Carvalho R, Crandall W, Keljo D, Walters TD, LeLeiko N, Hyams J. Growth abnormalities persist in newly diagnosed children with crohn disease despite current treatment paradigms. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2009;48:168-74.
 216. Van Limbergen J, Russell RK, Drummond HE, Aldhous MC, Round NK, Nimmo ER, Smith L, Gillett PM, McGrogan P, Weaver LT, Bisset WM, Mahdi G, Arnott ID, Satsangi J, Wilson DC. Definition of phenotypic characteristics of childhood-onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2008;135:1114-22.
 217. Guariso G, Gasparetto M, Visonà Dalla Pozza L, D'Incà R, Zancan L, Sturniolo G, Brotto F, Facchin P. Inflammatory bowel disease developing in paediatric and adult age. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;51:698-707.
 218. Gupta N, Cohen SA, Bostrom AG, Kirschner BS, Baldassano RN, Winter HS, Ferry GD, Smith T, Abramson O, Gold BD, Heyman MB. Risk factors for initial surgery in pediatric patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2006;130:1069-77.
 219. Jakobsen C, Paerregaard A, Munkholm P, Wewer V. Paediatric inflammatory bowel disease during a 44-year period in Copenhagen County: occurrence, course and prognosis--a population-based study from the Danish Crohn Colitis Database. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2009;21:1291-301.
 220. Gower-Rousseau C, Dauchet L, Vernier-Massouille G, Tilloy E, Brazier F, Merle V, Dupas JL, Savoye G, Baldé M, Marti R, Lerebours E, Cortot A, Salomez JL, Turck D, Colombel JF. The natural history of pediatric ulcerative colitis: a population-based cohort study. *Am J Gastroenterol*. 2009;104:2080-8.
 221. Ramadas AV, Gunesh S, Thomas GA, Williams GT, Hawthorne AB. Natural history of Crohn's disease in a population-based cohort from Cardiff (1986-2003): a study of changes in medical treatment and surgical resection rates. *Gut*. 2010;59:1200-6.
 222. Lindberg E, Lindquist B, Holmquist L, Hildebrand H. Inflammatory bowel disease in children and adolescents in Sweden, 1984-1995. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000;30:259-64.
 223. Van Limbergen J, Russell RK, Drummond HE, Aldhous MC, Round NK, Nimmo ER, Smith L, Gillett PM, McGrogan P, Weaver LT, Bisset WM, Mahdi G, Arnott ID, Satsangi J, Wilson DC. Definition of phenotypic characteristics of childhood-onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2008;135:1114-22.
 224. Polito JM 2nd, Childs B, Mellits ED, Tokayer AZ, Harris ML, Bayless TM. Crohn's disease: influence of age at diagnosis on site and clinical type of disease. *Gastroenterology*. 1996;111:580-6.

225. V, Dupas JL, Savoye G, Baldé M, Marti R, Lerebours E, Cortot A, Salomez JL, Turck D, Colombel JF. The natural history of pediatric ulcerative colitis: a population-based cohort study. *Am J Gastroenterol*. 2009;104:2080-8.
226. Hildebrand H, Karlberg J, Kristiansson B. Longitudinal growth in children and adolescent with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1994;18:165-173.
227. Kiss L, Papp M, Dorottya Lovasz B, Vegh Z, Anna Golovics P, Janka E, Varga E, Szathmari M, Lakatos PL. High-sensitivity C-reactive protein for identification of disease phenotype, active disease, and clinical relapses in Crohn's disease: A marker for patient classification? *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18:1647-54.
228. Jose FA, Garnett EA, Vittinghoff E, Ferry GD, Winter HS, Baldassano RN, Kirschner BS, Cohen SA, Gold BD, Abramson O, Heyman MB. Development of extraintestinal manifestations in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15:63-8.
229. Nguyen GC, Torres EA, Requeiro M, Bromfield G, Bitton A, Stempak J, Dassopoulos T, Schumm P, Gregory FJ, Griffiths AM, Hanauer SB, Hanson J, Harris ML, Kane SV, Orkwis HK, Lahaie R, Oliva-Hemker M, Pare P, Wild GE, Rioux JD, Yang H, Duerr RH, Cho JH, Steinhardt AH, Brant SR, Silverberg MS. Inflammatory bowel disease characteristics among Africans, Americans, Hispanics, and non-Hispanic Whites: characterization of a large North American cohort. *Am J Gastroenterol*. 2006;101:1012-1023.
230. Kaufman SS, Vanderhoof JA, Young R, Perry D, Raynor SC, Mack DR. Gastroenteric inflammation in children with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 1997;92:209-12.
231. Berrebi D, Languetin J, Ferkdadjji L, Foussat A, De Lagausie P, Paris R, Emilie D, Mougenot JF, Cezard JP, Navarro J, Peuchmaur M. Cytokines, chemokine receptors, and homing molecule distribution in the rectum and stomach of pediatric patients with ulcerative colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2003;37:300-8.
232. Sharif F, McDermot M, Dillon M, Drumm B, Rowland M, Imrie C, Kelleher S, Harty S, Bourke B. Focally enhanced gastritis in children with Crohn disease and ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 2002;97:1415-20.
233. Parente F, Cucino C, Bollani S, Imbesi V, Maconi G, Bonetto S, Vago L, Bianchi Porro G. Focal gastric inflammatory infiltrates in inflammatory bowel disease: prevalence immunohistochemical, characteristics and diagnostic role. *Am J Gastroenterol*. 2000;95:705-11.
234. Xin W, Greenson JK. The clinical significance of focally enhanced gastritis. *Am J Surg Pathol* 2004;28:1347-51.
235. De Matos V, Russo PA, Cohen AB, Mamula P, Baldassano RN, Piccoli DA. Frequency and clinical correlations of granulomas in children with Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2008;46:392-8.

236. de Bie CI, Paerregaard A, Kolacek S, Ruemmele FM, Koletzko S, Fell JM, Escher JC; the EUROKIDS Porto IBD Working Group of ESPGHAN (see Appendix). Disease phenotype at diagnosis in pediatric Crohn's disease: 5-year analyses of the EUROKIDS registry. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 May 9. doi: 10.1002/ibd.23008.
237. Maeng L, Lee A, Choi K, Kang CS, Kim KM. Granulomatous gastritis: a clinicopathologic analysis of 18 biopsy cases. *Am J Surg Pathol* 2004;28:941-945.
238. Genta RM, Sonnenberg A. Non-*Helicobacter pylori* gastritis is common among paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;35:1310-6.
239. Lakatos PL, David G, Pandur T, Erdelyi Z, Mester G, Balogh M, Szipocs I, Molnar C, Komaromi E, Kiss LS, Lakatos L. IBD in the elderly population: Results from a population-based study in Western Hungary, 2007-2008. *J Crohns Colitis*. 2011;5:5-13.
240. Swierczko AS, Szala A, Cedzynski M, Domzalska-Popadiuk I, Borkowska-Klos M, Jopek A, Szczapa J, Szemraj J, Atkinson AP, MacDonald SL, Turner ML, Kilpatrick DC. Mannan-binding lectin genotypes and genotype-phenotype relationship in a large cohort of Polish neonates. *Hum Immunol*. 2009;70:68-72.
241. Hoffmann C, Hoffmann P, Lun A, Büning C, Hiepe H, Scherer HU, et al. Is there a role for mannan-binding lectin in the diagnosis of inflammatory bowel disease? *Immunogenetics*. 2010;62:231-235.
242. Turner D, Levine A, Escher JC, Griffiths AM, Russell RK, Dignass A, Dias JA, Bronsky J, Braegger CP, Cucchiara S, de Ridder L, Fagerberg UL, Hussey S, Hugot JP, Kolacek S, Kolho KL, Lionetti P, Pærregaard A, Potapov A, Rintala R, Serban DE, Staiano A, Sweeny B, Veerman G, Veres G, Wilson DC, Ruemmele FM. Management of Pediatric Ulcerative Colitis: Joint ECCO and ESPGHAN Evidence-based Consensus Guidelines. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012;55:340-361.
243. Seibold F, Konrad A, Flogerzi B, Seibold-Schmid B, Arni S, Jülinger S, Kun JF. Genetic variants of the mannan-binding lectin are associated with immune reactivity to mannans in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2004;127:1076-84.
244. Kuhlman M, Joiner K, Ezekowitz RA. 1989. The human mannose-binding protein functions as an opsonin. *J Exp Med*. 1989;169:1733.
245. Zuo DM, Zhang LY, Lu X, Liu Y, Chen ZL. Protective role of mouse MBL-C on intestinal mucosa during *Shigella flexneri* invasion. *Int Immunol*. 2009;21:1125-34.
246. Nakamura N, Nonaka M, Ma BY, Matsumoto S, Kawasaki N, Asano S, Kawasaki T. Characterization of the interaction between serum mannan-binding protein and nucleic acid ligands. *J Leukoc Biol*. 2009;86:737-48.
247. Tahara T, Shibata T, Nakamura M, Okubo M, Yamashita H, Yoshioka D, Yonemura J, Kmiya Y, Ishizuka T, Fujita H, Nagasaka M, Yamada H, Hirata I, Arisawa T. Host genetic factors, related to inflammatory response, influence the CpG island methylation status in colonic mucosa in ulcerative colitis. *Anticancer Res*. 2011;31:933-8.

248. Vuononvirta J, Toivonen L, Gröndahl-Yli-Hannuksela K, Barkoff AM, Lindholm L, Mertsola J, Peltola V, He Q. Nasopharyngeal bacterial colonization and gene polymorphisms of mannose-binding lectin and toll-like receptors 2 and 4 in infants. *PLoS One*. 2011;6:e26198.
249. Shimizu T, Nishitani C, Mitsuzawa H, Ariki S, Takahashi M, Ohtani K, Wakamiya N, Kuroki Y. Mannose binding lectin and lung collectins interact with Toll-like receptor 4 and MD-2 by different mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1790:1705-10.
250. Wang M, Chen Y, Zhang Y, Zhang L, Lu X, Chen Z. Mannan-binding lectin directly interacts with Toll-like receptor 4 and suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine secretion from THP-1 cells. *Cell Mol Immunol*. 2011;8:265-75.
251. Thiel S, Frederiksen PD, Jensenius JC. Clinical manifestations of mannan-binding lectin deficiency. *Mol Immunol*. 2006;43:86-96.
252. Hölzl MA, Hofer J, Kovarik JJ, Roggenbuck D, Reinhold D, Goihl A, Gärtner M, Steinberger P, Zlabinger GJ. The zymogen granule protein 2 (GP2) binds to scavenger receptor expressed on endothelial cells1 (SREC-1). *Cell Immunol*. 2011;267:88-93.
253. Ohno H, Hase K. Glycoprotein 2 (GP2): grabbing the FimH bacteria into M cells for mucosal immunity. *Gut Microbes*. 2010;1:407-401.
254. Bogdanos DP, Roggenbuck D, Reinhold D, Wex T, Pavlidis P, von Arnim U, Malfertheiner P, Forbes A, Conrad K, Laass MW. Pancreatic-specific autoantibodies to glycoprotein 2 mirror disease location and behaviour in younger patients with Crohn's disease. *BMC Gastroenterol*. 2012;12:102. [Epub ahead of print]
255. Markowitz J, Kugathasan S, Dubinsky M, et al. Age of diagnosis influences serologic responses in children with Crohn's disease: a possible clue to etiology? *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15:714-9.
256. Dubinsky MC, Lin YC, Dutridge D, Picornell Y, Landers CJ, Farrior S, Wrobel I, Quiros A, Vasiliauskas EA, Grill B, Israel D, Bahar R, Christie D, Wahbeh G, Silber G, Dallazadeh S, Shah P, Thomas D, Kelts D, Hershberg RM, Elson CO, Targan SR, Taylor KD, Rotter JJ, Yang H; Western Regional Pediatric IBD Research Alliance. Serum immune responses predict rapid disease progression among children with Crohn's disease: Immune responses predict disease progression. *Am J Gastroenterol*. 2006;101:360-367.
257. Muratori P, Muratori L, Guidi M, Maccariello S, Pappas G, Ferrari R, Gionchetti P, Campieri M, Bianchi FB. Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA) and autoimmune liver diseases. *Clin Exp Immunol*. 2003;132:473-476.
258. Demirsoy H, Ozdil K, Ersoy O, Kesici B, Karaca C, Alkim C, Akbayir N, Erdem LK, Onuk MD, Beyzadeoglu HT. Anti-pancreatic antibody in Turkish patients with inflammatory bowel disease and first-degree relatives. *World J Gastroenterol*. 2010;16:5732-8.
259. Trauernicht AK, Steiner SJ. Serum antibodies and anthropometric data at diagnosis in pediatric Crohn's disease. *Dig Dis Sci*. 2012;57:1020-5.

260. Dubinsky M. Special issues in pediatric inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14:413-420.
261. Ruemmele FM, Targan SR, Levy G. Diagnostic accuracy of serological assay in pediatric inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998;115:822-829.
262. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 2004;118: 229-241.
263. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1995;109:1344-1367.
264. Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology*. 2004;127: 224-238.
265. Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of Toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun*. 2000;68:7010-7017.
266. Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, Webb G, Spottl T, Andus T, Scholmerich J, Herfarth H, Ray K, Falk W, Rogler G. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology*. 2002;122: 1987-2000.
267. Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, Kamm MA, Stagg AJ. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2005;129:50-65.
268. Rhee SH. Basic and translational understandings of microbial recognition by toll-like receptors in the intestine. *J Neurogastroenterol Motil*. 2011;17:28-34.
269. Santaolalla R, Abreu MT. Innate immunity in the small intestine. *Curr Opin Gastroenterol*. 2012;28:124-9.
270. Wolfs TG, Buurman WA, van Schadewijk A, de Vries B, Daemen MA, Hiemstra PS, van 't Veer C. In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J Immunol*. 2002;168: 1286-1293.
271. Hamzaoui K, Abid H, Berraies A, Ammar J, Hamzaoui A. NOD2 is highly expressed in Behçet disease with pulmonary manifestations. *J Inflamm*. 2012;9(1):3.
272. Nara K, Kurokawa MS, Chiba S, Yoshikawa H, Tsukikawa S, Matsuda T, Suzuki N. Involvement of innate immunity in the pathogenesis of intestinal Behçet's disease. *Clin Exp Immunol*. 2008;152:245-51.
273. McDonnell M, Liang Y, Noronha A, Coukos J, Kasper DL, Farraye FA, Ganley-Leal LM. Systemic Toll-like receptor ligands modify B-cell responses in human inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17:298-307.

274. Frolova L, Drastich P, Rossmann P, Klimesova K, Tlaskalova-Hogenova H. Expression of Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in biopsy samples of patients with inflammatory bowel diseases: upregulated expression of TLR2 in terminal ileum of patients with ulcerative colitis. *J Histochem Cytochem*. 2008;56:267-74.
275. Sánchez-Muñoz F, Fonseca-Camarillo G, Villeda-Ramírez MA, Miranda-Pérez E, Mendivil EJ, Barreto-Zúñiga R, Uribe M, Bojalil R, Domínguez-López A, Yamamoto-Furusho JK. Transcript levels of Toll-Like Receptors 5, 8 and 9 correlate with inflammatory activity in Ulcerative Colitis. *BMC Gastroenterol*. 2011;11:138.
276. Peyrin-Biroulet L, Gonzalez F, Dubuquoy L, Rousseaux C, Dubuquoy C, Decourcelle C, Saudemont A, Tachon M, Béclin E, Odou MF, Neut C, Colombel JF, Desreumaux P. Mesenteric fat as a source of C reactive protein and as a target for bacterial translocation in Crohn's disease. *Gut*. 2012;61:78-85.
277. Gibson DL, Montero M, Ropeleski MJ, Bergstrom KS, Ma C, Ghosh S, Merkens H, Huang J, Månsson LE, Sham HP, McNagny KM, Vallance BA. Interleukin-11 reduces TLR4-induced colitis in TLR2-deficient mice and restores intestinal STAT3 signaling. *Gastroenterology*. 2010;139:1277-88.
278. de Buhr MF, Hedrich HJ, Westendorf AM, Obermeier F, Hofmann C, Zschemisch NH, Buer J, Bumann D, Goyert SM, Bleich A. Analysis of Cd14 as a genetic modifier of experimental inflammatory bowel disease (IBD) in mice. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15:1824-36.
279. van Hal PT, Wijkhuijs JM, Mulder PG, Hoogsteden HC. Proliferation of mature and immature subpopulations of bronchoalveolar monocytes/macrophages and peripheral blood monocytes. *Cell Prolif*. 1995;28:533-543,
280. Assa A, Hartman C, Weiss B, Broide E, Rosenbach Y, Zevit N, Bujanover Y, Shamir R. Long-term outcome of tumor necrosis factor alpha antagonist's treatment in pediatric Crohn's disease. *J Crohns Colitis*. 2012 Apr 4. [Epub ahead of print]
281. Fasanmade AA, Adedokun OJ, Blank M, Zhou H, Davis HM. Pharmacokinetic properties of infliximab in children and adults with Crohn's disease: a retrospective analysis of data from 2 phase III clinical trials. *Clin Ther*. 2011;33:946-64.
282. López-Posadas R, González R, Ballester I, Martínez-Moya P, Romero-Calvo I, Suárez M, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O, Sánchez de Medina F. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is activated in enterocytes by oxidative stress via changes in glycosylation. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17:543-56.
283. Chen KT, Malo MS, Beasley-Topliffe LK, Poelstra K, Millan JL, Mostafa G, Alam SN, Ramasamy S, Warren HS, Hohmann EL, Hodin RA. A role for intestinal alkaline phosphatase in the maintenance of local gut immunity. *Dig Dis Sci*. 2011;56:1020-7.
284. Ramasamy S, Nguyen DD, Eston MA, Alam SN, Moss AK, Ebrahimi F, Biswas B, Mostafa G, Chen KT, Kaliannan K, Yammine H, Narisawa S, Millán JL, Warren HS, Hohmann EL, Mizoguchi E, Reinecker HC, Bhan AK, Snapper SB, Malo MS, Hodin

- RA. Intestinal alkaline phosphatase has beneficial effects in mouse models of chronic colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17:532-42.
285. Martínez-Moya P, Ortega-González M, González R, Anzola A, Ocón B, Hernández-Chirlaque C, López-Posadas R, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O, Sánchez de Medina F. Exogenous alkaline phosphatase treatment complements endogenous enzyme protection in colonic inflammation and reduces bacterial translocation in rats. *Pharmacol Res*. 2012;66:144-53.
 286. Lukas M, Drastich P, Konecny M, Gionchetti P, Urban O, Cantoni F, Bortlik M, Duricova D, Bulitta M. Exogenous alkaline phosphatase for the treatment of patients with moderate to severe ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16:1180-6.
 287. Kool M, Lambrecht BN. Dendritic cells in asthma and COPD: opportunities for drug development. *Curr Opin Immunol*. 2007;19:701-10.
 288. Yuan SZ, Hanauer SB, Kluskens LF, Kraft SC. Circulating lymphocyte subpopulations in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1983;85:1313-8.
 289. Alkim C, Balci M, Alkim H, Dağlı U, Parlak E, Tezel A, Ulker A. The importance of peripheral immune cells in inflammatory bowel disease. *Turk J Gastroenterol*. 2007;18:82-8.
 290. García de Tena J, Manzano L, Leal JC, San Antonio E, Sualdea V, Alvarez-Mon M. Distinctive pattern of cytokine production and adhesion molecule expression in peripheral blood memory CD4⁺ T cells from patients with active Crohn's disease. *J Clin Immunol*. 2006;26:233-42.
 291. García de Tena J, Manzano L, Leal JC, San Antonio E, Sualdea V, Alvarez-Mon M. Active Crohn's disease patients show a distinctive expansion of circulating memory CD4⁺CD45RO⁺CD28null T cells. *J Clin Immunol*. 2004;24:185-96.
 292. Chamouard P, Monneaux F, Richert Z, Voegeli AC, Lavaux T, Gaub MP, Baumann R, Oudet P, Muller S. Diminution of Circulating CD4⁺CD25 high T cells in naïve Crohn's disease. *Dig Dis Sci*. 2009;54:2084-93.
 293. Reikvam DH, Perminow G, Lyckander LG, Gran JM, Brandtzaeg P, Vatn M, Carlsen HS. Increase of regulatory T cells in ileal mucosa of untreated pediatric Crohn's disease patients. *Scand J Gastroenterol*. 2011;46:550-60.
 294. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med*. 2006;203:1701-11.
 295. Roman LI, Manzano L, De La Hera A, Abreu L, Rossi I, Alvarez-Mon M. Expanded CD4⁺CD45RO⁺ phenotype and defective proliferative response in T lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1996;110:1008-19.

296. Wang Y, Liu XP, Zhao ZB, Chen JH, Yu CG. Expression of CD4+ forkhead box P3 (FOXP3)+ regulatory T cells in inflammatory bowel disease. *J Dig Dis.* 2011;12:286-94.
297. Aeberli D, Seitz M, Jüni P, Villiger PM. Increase of peripheral CXCR3 positive T lymphocytes upon treatment of RA patients with TNF-alpha inhibitors. *Rheumatology (Oxford).* 2005;44:172-5.
298. Maurice MM, van der Graaff WL, Leow A, Breedveld FC, van Lier RA, Verweij CL. Treatment with monoclonal anti-tumor necrosis factor alpha antibody results in an accumulation of Th1 CD4+ T cells in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999;42:2166-73.
299. Ferkolj I, Ihan A, Markovic S, Veceric Z, Pohar M. Infliximab reduces the number of activated mucosal lymphocytes in patients with Crohn's disease. *J Gastrointest Liver Dis.* 2006;15:231-5.
300. Ricciardelli I, Lindley KJ, Londei M, Quarantino S. Anti tumour necrosis-alpha therapy increases the number of FOXP3 regulatory T cells in children affected by Crohn's disease. *Immunology.* 2008;125:178-83.
301. Jyonouchi H, Geng L, Cushing-Ruby A, Monteiro IM. Aberrant responses to TLR agonists in pediatric IBD patients; the possible association with increased production of Th1/Th17 cytokines in response to candida, a luminal antigen. *Pediatr Allergy Immunol.* 2010;21(4 Pt 2):e747-55.
302. Pasternak BA, D'Mello S, Jurickova II, Han X, Willson T, Flick L, Petiniot L, Uozumi N, Divanovic S, Traurnicht A, Bonkowski E, Kugathasan S, Karp CL, Denson LA. Lipopolysaccharide exposure is linked to activation of the acute phase response and growth failure in pediatric Crohn's disease and murine colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16:856-69.
303. Vos AC, Wildenberg ME, Arijis I, Duijvestein M, Verhaar AP, de Hertogh G, Vermeire S, Rutgeerts P, van den Brink GR, Hommes DW. Regulatory macrophages induced by infliximab are involved in healing in vivo and in vitro. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18:401-8.
304. Cucchiara S, Stronati L, Aloï M. Interactions between intestinal microbiota and innate immune system in pediatric inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol.* 2012;46 Suppl:S64-6.
305. Thijs WJ, van Baarlen J, Kleibeuker JH, Kolkman JJ. Duodenal versus jejunal biopsies in suspected celiac disease. *Endoscopy.* 2004;36:993-6.
306. Ravelli A, Bolognini S, Gambarotti M, Villanacci V. Variability of histologic lesions in relation to biopsy site in gluten-sensitive enteropathy. *Am J Gastroenterol.* 2005;100:177-85.
307. Bao F, Green PH, Bhagat G. An update on celiac disease histopathology and the road ahead. *Arch Pathol Lab Med.* 2012;136:735-45.

308. Walker MM, Talley NJ. Clinical value of duodenal biopsies--beyond the diagnosis of coeliac disease. *Pathol Res Pract*. 2011;207:538-44.
309. Evans KE, Aziz I, Cross SS, Sahota GR, Hopper AD, Hadjivassiliou M, Sanders DS. A prospective study of duodenal bulb biopsy in newly diagnosed and established adult celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2011;106:1837-742.
310. Soini Y, Takasawa A, Eskelinen M, Juvonen P, Kärjä V, Hasegawa T, Murata M, Tanaka S, Kojima T, Sawada N. Expression of claudins 7 and 18 in pancreatic ductal adenocarcinoma: association with features of differentiation. *J Clin Pathol*. 2012;65:431-6.
311. Kaarteenaho R, Merikallio H, Lehtonen S, Harju T, Soini Y. Divergent expression of claudin -1, -3, -4, -5 and -7 in developing human lung. *Respir Res*. 2010;11:59.
312. Tokés AM, Kulka J, Paku S, Szik A, Páska C, Novák PK, Szilák L, Kiss A, Bögi K, Schaff Z. Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res*. 2005;7:R296-305.
313. Prasad S, Mingrino R, Kaukinen K, Hayes KL, Powell RM, MacDonald TT, Collins JE. Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells *Lab Invest*. 2005;85:1139-62.
314. Fasano A, Not T, Wang W, Uzzau S, Berti I, Tommasini A, Goldblum SE. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet*. 2000;355(9214):1518-9.
315. Drago S, El Asmar R, Di Pierro M, Grazia Clemente M, Tripathi A, Sapone A, Thakar M, Iacono G, Carroccio A, D'Agate C, Not T, Zampini L, Catassi C, Fasano A. Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand J Gastroenterol*. 2006;41:408-19.
316. Sander GR, Cummins AG, Henshall T, Powell BC. Rapid disruption of intestinal barrier function by gliadin involves altered expression of apical junctional proteins. *FEBS Lett*. 2005;579:4851-5.
317. Szebeni B, Veres G, Dezsofi A, Rusai K, Vannay A, Bokodi G et al. Increased mucosal expression of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007; 45: 187-93.
318. Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med*. 2000; 6:435–442.
319. Tao Y, Drabik KA, Waypa TS, Musch MW, Alverdy JC, Schneewind O et al. Soluble factors from *Lactobacillus GG* activate MAPKs and induce cytoprotective heat shock proteins in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;290:C1018-30.
320. Musch MW, Sugi K, Straus D, Chang EB. Heat-shock protein 72 protects against oxidant-induced injury of barrier function of human colonic epithelial Caco2/bbe cells. *Gastroenterology*. 1999;117:115-22.

321. Thomas KE, Sapone A, Fasano A, Vogel SN. Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in Celiac disease. *J Immunol.* 2006;176:2512-21.
322. Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet.* 2003;362:30-7.
323. Schuppan D, Esslinger B, Dieterich W. Innate immunity and coeliac disease. *Lancet.* 2003;362:3-4.
324. Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med.* 2000;6:435–442.
325. Prabhu R, Thomas S, Balasubramanian KA. Oral glutamine attenuates surgical manipulation-induced alterations in the intestinal brush border membrane. *J Surg Res.* 2003; 115:148-56.
326. Bramble MG, Zucoloto S, Wright NA, Record CO. Acute gluten challenge in treated adult coeliac disease: a morphometric and enzymatic study. *Gut.* 1985;26:169-74.
327. Lionetti E, Catassi C. New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment. *Int Rev Immunol.* 2011;30:219-31.
328. Hall NJ, Rubin G, Charnock A. Systematic review: adherence to a gluten-free diet in adult patients with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2009;30:315-30.
329. Grose RH, Thompson FM, Cummins AG. Deficiency of 6B11+ invariant NK T-cells in celiac disease. *Dig Dis Sci.* 2008;53:1846-51.
330. Ciccocioppo R, Ricci G, Rovati B, Pesce I, Mazzocchi S, Piancatelli D, Cagnoni A, Millimaggi D, Danova M, Corazza GR. Reduced number and function of peripheral dendritic cells in coeliac disease. *Clin Exp Immunol.* 2007;149:487-96.
331. Eiró N, González-Reyes S, González L, González LO, Altadill A, Andicoechea A, Fresno-Forcelledo MF, Rodrigo-Sáez L, Vizoso FJ. Duodenal expression of toll-like receptors and interleukins are increased in both children and adult celiac patients. *Dig Dis Sci.* 2012;57:2278-85.
332. Di Sabatino A, Bertrandi E, Casadei Maldini M, Pennese F, Proietti F, Corazza GR. Phenotyping of peripheral blood lymphocytes in adult coeliac disease. *Immunology.* 1998;95:572-6.
333. Mastrandrea F, Semeraro FP, Coradduzza G, Manelli M, Scarcia G, Pezzuto F, Serio G. CD34+ hemopoietic precursor and stem cells traffic in peripheral blood of celiac patients is significantly increased but not directly related to epithelial damage severity. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2008;40:90-103.

334. Nilsen EM, Lundin KE, Krajci P, Scott H, Sollid LM, Brandtzaeg P. Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon gamma. *Gut*. 1995;37:766-76.
335. O'Keefe J, Mills K, Jackson J, Feighery C. T cell proliferation, MHC class II restriction and cytokine products of gliadin-stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *Clin Exp Immunol*. 1999;117:269-76.
336. Granzotto M, dal Bo S, Quaglia S, Tommasini A, Piscianz E, Valencic E, Ferrara F, Martellosi S, Ventura A, Not T. Regulatory T-cell function is impaired in celiac disease. *Dig Dis Sci*. 2009;54:1513-9.
337. Frisullo G, Nociti V, Iorio R, Patanella AK, Marti A, Assunta B, Plantone D, Cammarota G, Tonali PA, Batocchi AP. Increased CD4+CD25+Foxp3+ T cells in peripheral blood of celiac disease patients: correlation with dietary treatment *Hum Immunol*. 2009;70:430-5.
338. van der Weerd K, Dik WA, Schrijver B, Schweitzer DH, Langerak AW, Drexhage HA, Kiewiet RM, van Aken MO, van Huisstede A, van Dongen JJ, van der Lelij AJ, Staal FJ, van Hagen PM. Morbidly obese human subjects have increased peripheral blood CD4+ T cells with skewing toward a Treg- and Th2-dominated phenotype. *Diabetes*. 2012;61:401-8.
339. Arato A, Savilahti E, Tainio VM, Verkasalo M, Klemola T. HLA-DR expression, natural killer cells and IgE containing cells in the jejunal mucosa of coeliac children. *Gut*. 1987;28:988-94.
340. Wahab PJ, Meijer JW, Mulder CJ. Histologic follow-up of people with celiac disease on a gluten-free diet: slow and incomplete recovery. *Am J Clin Pathol*. 2002;118:459-63.
341. Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstien B. The aging of the immune system. *Transpl Int*. 2009;22:1041-50.
342. Schuster V, Hügle B, Tefs K. Plasminogen deficiency. *J Thromb Haemost*. 2007;5:2315-22.
343. Ploplis VA, Carmeliet P, Vazirzadeh S, Van Vlaenderen I, Moons L, Plow EF, Collen D. Effects of disruption of the plasminogen gene on thrombosis, growth, and health in mice. *Circulation*. 1995;92, 2585-93.
344. Esposito C, Paparo F, Caputo I, Rossi M, Maglio M, Sblattero D, Not T, Porta R, Auricchio S, Marzari R, Troncone R. et al. Anti-tissue transglutaminase antibodies from celiac patients inhibit transglutaminase activity both in vitro and in situ. *Gut*. 2002;51:177-81.
345. Dohil R, Newbury RO, Sellers ZM, Deutsch R, Schneider JA. The evaluation and treatment of gastrointestinal disease in children with cystinosis receiving cysteamine. *J Pediatr*. 2003;143:224-30.

346. Korponay-Szabó IR, Halttunen T, Szalai Z, Laurila K, Király R, Kovács JB, Fésüs L, Mäki M. In vivo targeting of intestinal and extraintestinal transglutaminase 2 by coeliac autoantibodies. *Gut*. 2004;53:641-8.
347. Koskinen O, Collin P, Korponay-Szabo I, Salmi T, Iltanen S, Haimila K, Partanen J, Mäki M, Kaukinen K. Gluten-dependent small bowel mucosal transglutaminase 2-specific IgA deposits in overt and mild enteropathy celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2008;47:436-42.
348. Akimov SS, Krylov D, Fleishman LF, Belkin AM. Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion coreceptor for fibronectin. *J Cell Biol*. 2000;148:825-38.
349. Myrsky E, Syrjänen M, Korponay-Szabo IR, Mäki M, Kaukinen K, Lindfors K. Altered small-bowel mucosal vascular network in untreated coeliac disease. *Scand J Gastroenterol*. 2009;44:162-7.
350. Myrsky E, Kaukinen K, Syrjänen M, Korponay-Szabó IR, Mäki M, Lindfors K. Coeliac disease-specific autoantibodies targeted against transglutaminase 2 disturb angiogenesis. *Clin Exp Immunol*. 2008;152:111-9.
351. Lucarelli S, Di Nardo G, Lastrucci G, D'Alfonso Y, Marcheggiano A, Federici T, Frediani S, Frediani T, Cucchiara S. Allergic proctocolitis refractory to maternal hypoallergenic diet in exclusively breast-fed infants: a clinical observation. *BMC Gastroenterol*. 2011 Jul 16;11:82.
352. Ormälä T, Rintala R, Savilahti E. T cells of the colonic mucosa in patients with infantile colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2001;33:133-8.
353. Karlsson MR, Rugtveit J, Brandtzaeg P. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *Exp Med*. 2004;199:1679-88.
354. Romagnani S. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology*. 2004;112:352-63.
355. Smits HH, Engering A, van der Kleij D, de Jong EC, Schipper K, van Capel TM, Zaat BA, Yazdanbakhsh M, Wierenga EA, van Kooyk Y, Kapsenberg ML. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115:1260-7.
356. de Roock S, van Elk M, van Dijk ME, Timmerman HM, Rijkers GT, Prakken BJ, Hoekstra MO, de Klee IM. Lactic acid bacteria differ in their ability to induce functional regulatory T cells in humans. *Clin Exp Allergy*. 2010;40:103-10.
357. Olszak T, An D, Zeissig S, Vera MP, Richter J, Franke A, Glickman JN, Siebert R, Baron RM, Kasper DL, Blumberg RS. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science*. 2012;336(6080):489-93.
358. Otsubo K, Kanegane H, Kamachi Y, Kobayashi I, Tsuge I, Imaizumi M, Sasahara Y, Hayakawa A, Nozu K, Iijima K, Ito S, Horikawa R, Nagai Y, Takatsu K, Mori H, Ochs

dc_581_12

HD, Miyawaki T. Identification of FOXP3-negative regulatory T-like CD4(+)CD25(+)CD127(low)) cells in patients with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome. Clin Immunol. 2011;141:111-20.

FÜGGELÉK

1. melléklet. A gyermekkori Crohn-betegség aktivitási index (PCDAI) (Turner, Gastroenterology, 2007, ref. 51).

ANAMNÉZIS (1 hétre visszamenőleg)	PONTSZÁM
1. Hasi fájdalom	
Nincs	0
Enyhe-rövid ideig tart, nem zavarja az aktivitást	5
Középes vagy súlyos, naponta van, hosszabb ideig tart, hatással van az aktivitásra, éjszaka jelentkezik	10
2. Széklet	
0-1 folyékony, nincs benne vér	0
1-2 lazább széklet kevés vérrrel, vagy 2-5 folyékony	5
Nagyobb mennyiségű vér, vagy ≥ 6 folyékony, vagy éjszakai hasmenés	10
3. A beteg aktivitása, általános állapota	
Jól van, nincs korlátozott aktivitás	0
Esetenként nehéz fenntartani az aktivitást, átlagosnál rosszabb ált állapot	5
Csökkent aktivitás, nagyon rossz általános állapot	10
LABORATÓRIUMI VIZSGÁLATOK	
4. Hematokrit	
<u><10 év:</u> >33 <u>11-14 év fiú:</u> ≥ 35	0
28-32 30-34	2,5
<28 <30	5
<u>11-19 év leány:</u> ≥ 34 <u>15-19 év fiú:</u> ≥ 37	0
29-33 32-36	2,5
<29 <32	5
5. We (mm/h)	
<20	0
20-50	2,5
>50	10
6. Albumin (g/dl)	
$\geq 3,5$	0
3,1-3,4	5
$\leq 3,0$	10
VIZSGÁLAT	
7. Súly	
Súlygyarapodás vagy akaratlagos súlytartás vagy vesztes	0
Akaratlan súlyállás vagy 1-9%-os súlyvesztés	5
$\geq 10\%$ -os súlyvesztés	10
8. Magasság	
<u>Diagnózis felállításakor</u> vagy <u>Követéskor</u>	
≤ 1 SD csökkent növekedés sebessége ≥ 1 SD	0
1-2 SD csökkent növekedés sebessége 1-2SD	5

dc_581_12

≥ 2 SD csökkent	növekedés sebessége $\leq 2SD$	10
9. Has		
Nincs nyomásérzékenység, nincs tapintható konglomerátum		0
Nyomásérzékenység vagy konglomerátum nyomásérzékenység nélkül		5
Nyomásérzékenység, (izom)védekezés, egyértelmű konglomerátum		10
10. Perirektális betegség		
Nincs, aszimptomatikus bőrfüggelék		0
1-2 fájdalommentes fisztula, kevés váladék, nincs nyomásérzékenység		5
Aktív fisztula, váladékozás, nyomásérzékenység vagy abszcesszus		10
11. Extraintesztinális manifesztáció (láz $\geq 38,5^{\circ}\text{C}$ 3 napig az elmúlt hetekben, definitív artritisz, uveitisz, eritéma nodózum, pioderma gangrenózum)		
Nincs		0
Egy tünet		5
$\geq$ Két tünet		10
ÖSSZ PONTSZÁM (0-100)		

2. melléklet. A gyermekkori kolitisz ulceróza aktivitási index (PUCAI), (Turner, Gastroenterology, 2007, ref. 53).

	PONTSZÁM
1. Hasi fájdalom	
Nincs	0
Fájdalom közepes	5
Fájdalom súlyos	10
2 . Rektális vérzés	
Nincs	0
Kis mennyiségű, a székletek kevesebb, mint 50%-ban	10
Kis mennyiségű, a legtöbb székletben van	20
Nagy mennyiségű (székletek több mint 50%-a tartalmazza)	30
3. Széklet konzisztenciája	
Formált	0
Részlegesen formált	5
Híg, véres-vizes hasmenés	10
4. Székletek száma 24 óra alatt	
0-2	0
3-5	5
6-8	10
>8	15
5. Éjszakai székürítés (éjszakai felébredést okozva)	
Nincs	0
Van	10
6. Aktivitási szint	
Aktivitást nem korlátozza	0
Esetenként korlátozza az aktivitást	5
Súlyosan csökkenti az aktivitást	10
ÖSSZ PONTSZÁM (0-85)	

3. melléklet. Az IBD regiszter (HUPIR: Hungarian Pediatric IBD Registry) adatlapja.

HUPIR ADATLAP

Beteg adatai

Regisztráció ideje:

Sorszám:

IBD diagnózisa:

Regisztráló orvos:

Melyik országban született?

Panaszok indulása:

Neme:

Születési hónap és év:

Kizárólagos szoptatás: hónapos korig. ☐ Ismeretlen:

Egyéb társbetegség: ☐ nem ismert, ☐ igen, írja le:

Familiaritás (I. fokú rokonság): ☐ Igen ☐ Nem ☐ Ismeretlen

Magasság és testsúly (diagnosis idején): Magasság: cm

Súly (1 tizedesjegyig): kg

Fő panasz(ok) (több válasz is lehet)

☐ Gasztrointesztinalis tünet (szájtól az anusig)

☐ Növekedési elmaradás vagy kései pubertás

☐ Extraintesztinális tünet Diagnózis:

☐ Egyéb, írja le:

Diagnosztika (ikszelje be): igen nem

Felső endoszkópia ☐ ☐ , ha nem volt, miért NEM:

☐ endoszkópos vizsgáló nem tartotta szükségesnek

☐ nem volt rá idő

☐ elégtelen szedáció

☐ túl invazív beavatkozás

☐ felső endoscopyt már máshol elvégezték

☐ egyéb ok, írja le:

Kolonoszkópia ☐ ☐

Ileoszkópia ☐ ☐ , ha nem volt, miért NEM:

☐ endoszkópos vizsgáló nem tartotta szükségesnek

☐ súlyos betegség (perforáció veszélye)

☐ Ileocökális sztenózis

☐ disztális sztenózis

☐ nem volt rá idő

- ☐ elégtelen szedáció
- ☐ széklettel szennyezett bél
- ☐ technikai probléma
- ☐ kolonoszkópia már máshol megtörtént
- ☐ egyéb ok, írja le:

igen nem

Kontrasztos passzázs ☐ ☐ , ha nem volt, miért NEM:

- ☐ endoszkópos vizsgáló nem tartotta szükségesnek
- ☐ sztenózisra utaló tünet nem volt
- ☐ túl invazív beavatkozásnak tűnt
- ☐ szülő vagy a gyerek nem egyezett bel
- ☐ MRI enteroklízis volt helyette/mellette
- ☐ kontrasztos CT volt helyette/mellette
- ☐ kapszulás endoszkópia volt mellette
- ☐ klinikai tradíció, hogy nem végeznek ilyen
- ☐ már máshol megtörtént
- ☐ egyéb ok, írja le:

Hasi ultrahang	☐	☐
CT	☐	☐
MRI	☐	☐
Kapszulás endoszkópia	☐	☐
Sebészeti műtét	☐	☐ írja le:
Egyéb	☐	☐ írja le

Segített-e a felső endoszkópia a diagnózis felállításában? ☐ nem ☐ igen

Ha igen, mivel segített? (pl. fekély, granulóma, erózió, utcakőrajzolat)

LABOROK:

CRP: mg/l

Vas: umol/l

Trombocita:

Hematokrit: %

DIAGNÓZIS

☐	Crohn betegség	PCDAI:
☐	Ulceratív kolitisz	PUCAI:
☐	Indeterminált kolitisz	

Kezdeti terápia (gyógyszer; dózis; adagolás módja – iv., per osz, per rekti):

Betegség kiterjedése és helye

(abn = abnormalis/kóros; nor = normális; nv = nem vizualizálható(nem látható, nem volt); nb = nincs biopszia)

		II. Endoscopia	III. Histologia	IV. Radiologia
Szájüreg	☐ abn ☐ nor		☐ abn ☐ granulóma ☐ nor ☐ nv	☐ abn ☐ nor ☐ nv
Nyelőcső		☐ abn ☐ nor ☐ nv	☐ abn ☐ granulóma ☐ nor ☐ nv	☐ abn ☐ nor ☐ nv
Gyomor		☐ abn ☐ nor ☐ nv	☐ abn ☐ granulóma ☐ nor ☐ nv	☐ abn ☐ nor ☐ nv
Duodénium		☐ abn ☐ nor ☐ nv	☐ abn ☐ granulóma ☐ nor ☐ nv	☐ abn ☐ nor ☐ nv
Jejunum				☐ abn ☐ nor ☐ nv
Ileum				☐ abn ☐ nor ☐ nv
Terminális ileum		☐ abn ☐ nor ☐ nv	☐ abn ☐ granulóma ☐ nor ☐ nv	☐ abn ☐ nor ☐ nv
Cökum		☐ abn ☐ nor ☐ nv	☐ abn ☐ granulóma ☐ nor ☐ nv	☐ abn ☐ nor ☐ nv
Kolon aszcendens		☐ abn ☐ nor ☐ nv	☐ abn ☐ granulóma ☐ nor ☐ nv	☐ abn ☐ nor ☐ nv
Kolon transzver.		☐ abn ☐ nor ☐ nv	☐ abn ☐ granulóma ☐ nor ☐ nv	☐ abn ☐ nor ☐ nv
Kolon deszc.		☐ abn ☐ nor ☐ nv	☐ abn ☐ granulóma ☐ nor ☐ nv	☐ abn ☐ nor ☐ nv
Sigma		☐ abn ☐ nor ☐ nv	☐ abn ☐ granulóma ☐ nor ☐ nv	☐ abn ☐ nor ☐ nv
Rektum		☐ abn ☐ nor ☐ nv	☐ abn ☐ granulóma ☐ nor ☐ nv	☐ abn ☐ nor ☐ nv
Anusz			☐ abn ☐ granulóma ☐ nor ☐ nv	☐ abn ☐ nor ☐ nv
Perianális lézió	☐ igen ☐ nem	☐ „skin tag” ☐ fisztula ☐ fisszúra ☐ abszcessus ☐ hemorroid		
Perianális fisztula	☐ igen ☐ nem			
Internális fisztula	☐ igen ☐ nem			
Abszcessus (bárho)	☐ igen ☐ nem	helye:		
Sztenózis vagy striktúra:	☐ igen ☐ nem	helye:		

EGYÉB MEGJEGYZÉS:

4. melléklet. Az IBD regiszter (HUPIR: Hungarian Pediatric IBD Registry) nyomunkövetéses adatlapja.

IBD ADATLAP UTÁNKÖVETÉS

Beteg adatai

Sorszám: IBD diagnózisa: 2007 január
 év hó

Regisztráló orvos: Kontroll időpontja 2007 január
 év hó

Neme: ☐ Fiú ☐ Lány Születési dátum: 1992 január
 év hó

Diagnózis az IBD megállapításakor: Crohn-betegség

Utánkövetés

1. Továbbra is IBD-nek tartja-e a betegséget?

☐ Igen ☐ Nem, új diagnózis:

2. Ha továbbra is IBD-nek tartja a betegséget, változott-e ezen belül a besorolás az elmúlt év során (például indeterminált colitisről vagy colitis ulcerosáról kiderült, hogy Crohn-betegség)?

☐ Nem ☐ Igen:

EREDETI DIAGNÓZIS

Crohn-betegség

MÓDOSULT DIAGNÓZIS

Crohn-betegség

3. Jelentkezett-e az elmúlt év során:

Extraintestinalis manifestatio ☐ Nem ☐ igen, diagnózis:

Perianalis lézió ☐ Nem ☐ igen, skin tag

Intraabdominalis szövődmény ☐ Nem ☐ igen, stenosis

4. Volt-e az elmúlt egy évben műtete a betegnek IBD miatt?

☐ Igen ☐ Nem

Ha igen, milyen műtét volt: bélrezekció, egyéb:

5. Milyen gyógyszeres kezelést kap a beteg az adott kontroll idején milyen terápiában részesül (több gyógyszer is bejelölhető)

5-ASA (per os) ☐ Igen ☐ Nem

szteroid (szisztémás) ☐ Igen ☐ Nem

dc_581_12

szteroid (per recti)	☐ Igen ☐ Nem
Budenofalk	☐ Igen ☐ Nem
azathioprin	☐ Igen ☐ Nem
5-ASA (per recti)	☐ Igen ☐ Nem
Budesonid (per recti)	☐ Igen ☐ Nem
methotrexat	☐ Igen ☐ Nem
infiximab	☐ Igen ☐ Nem
kizárólagos enterális táplálás	☐ Igen ☐ Nem
egyéb (írja le):	

6. Tapasztalt-e az elmúlt évben szteroid dependenciát, refrakteritást?

(Sztteroid-rezisztencia: két héten át adekvát dózisban (1-2 mg/ttkg) szteroid adása nem eredményez megfelelő javulást/remissziót. Sztteroid dependencia: szteroid adásának abbahagyása után 30 napon belül visszaesés, vagy az adag csökkentésére relapszus következik be.)

Sztteroid dependencia ☐ Nem ☐ Igen

Sztteroid refrakteritás ☐ Nem ☐ Igen

7. Volt-e relapszusa? ☐ Nem ☐ Igen, hány alkalommal?

(Relapszus – 10 feletti aktivitási index)

8. A betegség aktivitása a kontroll idején:

PCDAI

PUCAI

9. Testmagasság és testsúly a kontroll idején:

Testmagasság: cm Testsúly: kg

MEGJEGYZÉS: