

BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM
Vegyésmérnöki és Biomérnöki Kar

SMAD 2 és 3 szerepe a gyulladásos bélbetegség patomechanizmusában

TDK-dolgozat

Veres-Székely Apor

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegész- és Biomérnöki Kar, III. évfolyam



Témavezető: Dr. Vannay Ádám, PhD

Szarka András

Semmelweis Egyetem I. sz. Gyermekklinika

Budapest

2012

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS	4
Gyulladásos bélbetegségek.....	4
A gyulladásos bélbetegség epidemiológiája és kialakulásában szerepet játszó tényezők	6
A tumor necrosis factor szerepe a gyulladásos bélbetegségben	9
A tumor necrosis factor α jelátvitelében szerepet játszó molekulák	10
CÉLKITŰZÉS.....	14
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	15
Beteganyag	15
Immunfluoreszcens festés.....	17
Fehérjeizolálás és Western blot	17
In vitro sejtes kísérletek	19
Áramlási citometria	19
Statisztika.....	20
EREDMÉNYEK	21
Az aktivált JNK1/2, ERK1/2 és SMAD2/3 jelátvivők lokalizációja a vastagbél nyálkahártyában.....	21
SMAD2 és SMAD3 foszforilációja IBD-s gyermekek vastagbél nyálkahártyájában.....	22
Jelátvivők foszforilációja a HT-29-es sejtvonalon TNF- α -kezelés hatására	23
KÖVETKEZTETÉS, MEGBESZÉLÉS	25
ÖSSZEFOGLALÁS.....	27
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	28
ÁBRA- ÉS TÁBLÁZATJEGYZÉK	29
IRODALOMJEGYZÉK.....	30

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AP-1	Activator-protein-1
ERK	Extracelluláris-szignál regulálta kináz
FACS	Áramlási citometria
FBS	Magzati borjúsavó
GALT	Bél-asszociált limfoid szövet
IBD	Gyulladásoos bélbetegség (Inflammatory bowel disease)
IF	Immunfluoreszcens festés
IFX	Infliximab
JNK	c-Jun N-terminális kinázok (c-Jun N-terminal kinases)
MC	Morbus Crohn
PBS	Fiziológiás sóot tartalmazó foszfát puffer
PRR	Patogén mintázat-felismerő receptor
SMAD	C. elegans protein (SMA) és Drosophila protein (MAD) homológ
TGF- β	Transzformáló növekedési faktor béta (transforming growth factor β)
TJ	Szoros sejtkapcsolat (tight junction)
TLR	Toll-like receptorok
TNF- α	Tumor nekrozis faktor alfa (Tumor necrosis factor α)
UC	Colitis ulcerosa
WB	Western blot

BEVEZETÉS

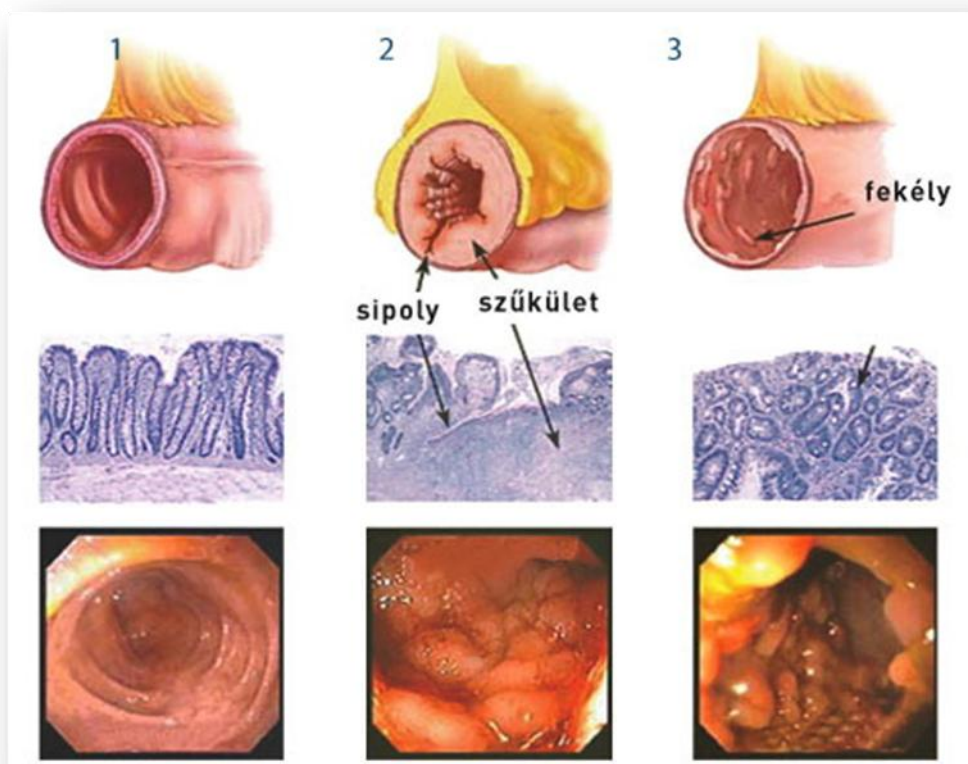
Gyulladós bélbetegségek

A gyulladós bélbetegség (IBD) a béltraktus krónikus gyulladásával járó idült kórkép. Az IBD-nek két fő formája a Crohn betegség (MC) és a colitis ulcerosa (UC) ismert [1, 2]. Az MC a tápcsatorna krónikus, többnyire remissziókkal és relapszusokkal zajló, ismeretlen eredetű gyulladása, mely a szájníylástól a végbélníylásig a béltraktus bármely szakaszát érintheti (1. ábra). Kialakulása lassú, a betegség tartós panaszokat okoz. Gyerekkori megjelenésekor gyakori a növekedési retardáció, melynek mértéke szorosán összefügg a gyomor-bélrendszeri tünetek súlyosságával. A betegség klinikuma igen változatos, sokféle tünet, számtalan kombinációjával találkozhatunk. A jellegzetes formák a gyomor-bélrendszeri tünetcsoport (hányinger, hányás, hasmenés, étkezés utáni görcsök, ásványi anyagok és vitaminok hiánytünetei), kolitiszes tünetcsoport (hasmenés, rectális vérzés, fissurák, tályogok), extraintesztinális tünetek (ízületi gyulladás és fájdalom, máj- és epeúti léziók), valamint gyermekkorban a már említett növekedési retardáció. A gyulladás gyakori szövödménye a bélezáródás, rendellenes sipolyjáratok (fistulák) és gennyel telt tályogok (abscessus) kialakulása. Sipolyok képződhetnek a bél különböző szakaszai között, de összeköthetik a belet a húgyhólyaggal vagy a bőrfelszínnel, különösen a végbélníylás környékén. Gyakori végbélből eredő vérzés, valamint a betegség tartós, kezeletlen fennállása során a vastagbélrák kialakulásának kockázata is megnő [3-5].

Az UC a vastagbél fekélyes gyulladása, melyben a gyomor-bélrendszer többi szakasza általában nem érintett (1. ábra). Gyermekkorban gyakori a vastagbél teljes hosszának gyulladása (pankolitisz), de a vékonybél érintettsége ritkán fordul elő, akkor ún. „backwash ileitisről” beszélünk. A gyulladós elváltozás csak a bél nyálkahártyára jellemző, a bélfal mélyebb rétegeibe nem terjed. Az UC vérzéssel, hasi görcsökkel jár. A betegség extraintesztinális manifesztációjaként gyulladós jelenségek alakulhatnak ki az ízületekben, szemben és a bőrön egyaránt [3, 4, 6].

Az IBD mindkét formájának gyakori és súlyos komplikációval járó szövödménye az intesztinális fibrózis, amely egy általános szöveti válasz a krónikus gyulladásra. A fibrózis során a szervezet igyekszik a sérült szövetet struktúráját megtartani, ugyanakkor az érintett

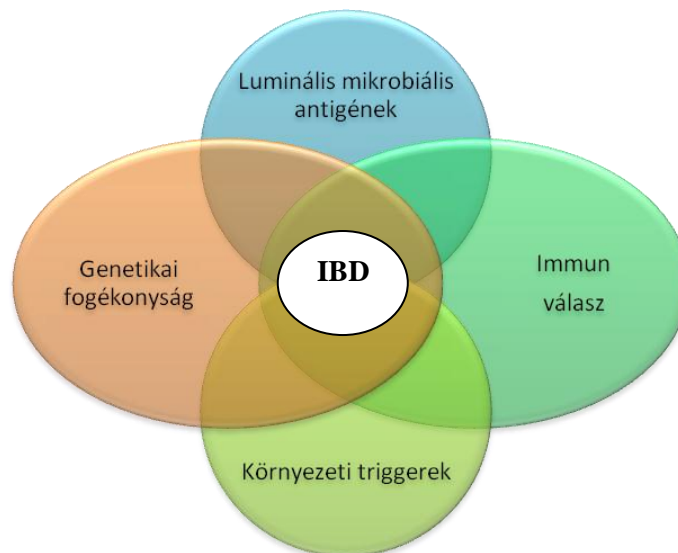
szakasz elhegesedik, ez szöveti összenövések, ún. stricturák kialakulásához vezet. Tradicionális szemlélet szerint a fibrózis egy elkerülhetetlen és visszafordíthatatlan folyamat a krónikus gyulladás fennállása során, de a legújabb irodalmi adatok alapján a fibrózis komplex folyamata dinamikusan változó, akár reverzibilis folyamattá válhat. A fibrózis celluláris és molekuláris mechanizmusainak feltérképezése közelebb vihet új IBD-s terápiás gyógymódok kifejlesztéséhez és az IBD komplex pathomechanizmusának megértéséhez [7,8].



1. ábra: Ép, Crohn beteg és colitis ulcerosás bélszakasz sematikus-, szövettani – és endoszkópos képe. 1 (bal oldali oszlop): Ép bélszakasz sematikus-, szövettani- és endoszkópos képe 2: Crohn beteg (középső oszlop) bélszakasz sematikus-, szövettani- és endoszkópos képe: mélyebb szöveti részek is érintettek, a bélfal a gyulladás következtében megvastagodik, a bélüreg szűkületét, sipolyokat, stricturákat okozhat. 3: Colitis ulcerosás (jobb oldali oszlop) bélszakasz sematikus-, szövettani- és endoszkópos képe: gyulladásos elváltozás a mucosát érinti, a nyálkahártyán fekélyek jelennek meg [9].

A gyulladós bélbetegség epidemiológiája és kialakulásában szerepet játszó tényezők

A betegség felnőttek között jóval gyakoribb, de a gyermekkorban előforduló IBD-sek teszik ki az összes IBD-ben szenvedők 10-15%-át. Az IBD felnőttkori és gyermekkori incidenciája a nyugati országokban folyamatosan növekszik. Becslések szerint az Egyesült Államokban 1-1,4 millióan szenvednek IBD-ben, míg Európában ez a szám meghaladja a 2,2, milliót. Amerikában az MC gyakorisága 1/105, az UC esetén 1-2/105. A gyermekkori gyakorisági adatokat tekintve az MC egyre több felmérésben meghaladja az UC előfordulási gyakoriságát. A nyugati országokban az MC incidenciája 3-4/105, míg az UC gyakorisága 2-3/105 [10]. A magyarországi gyermek IBD regiszter felmérése szerint az IBD incidenciája 6,55/105 ebből MC-ben 3,8/105 és UC-ben 2,2/105 az újonnan diagnosztizált esetek száma a 2007-es évben. Az IBD pontos patomechanizmusa ismeretlen, de genetikailag fogékony egyénekben a bélnyálkahártya megváltozott barrierfunkciója, a veleszületett adaptív immunrendszer kóros reakciója és különböző környezeti faktorok járulhatnak hozzá a krónikus bélgyulladás kialakulásához [11].



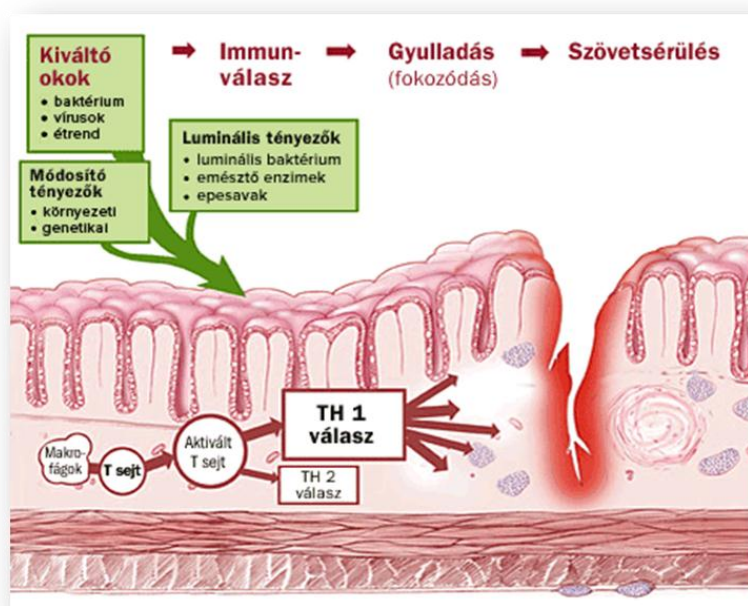
2. ábra: A gyulladós bélbetegség (IBD) patogenezisében szerepet játszó tényezők. A bélgyulladás a rezidens bélflóra változása és a mukóza közötti kölcsönhatás eredményeként jön létre. Ezt befolyásolják környezeti és gazdaszervezeti faktorok genetikailag fogékony egyénekben. A genetikai faktorok hatnak a barrierfunkcióra, a veleszületett és adaptív immunválaszokra [12].

Statisztikai adatok alapján a nemek érintettsége egyforma. Földrajzi területeket tekintve a betegség gyakoribb a fejlett országokban, nagyvárosi területeken, valamint az északi éghajlaton. A betegség az Egyesült Államokban és az észak-európai országokban a leggyakoribb, Japánban és Dél-Afrikában a legkevésbé elterjedt [12]. A genetikai háttér fontosságára utal a gyulladásoos bélbetegségek régóta ismert családi halmozódása. Az IBD-ben szenvedő egyén első fokú rokonainak veszélyezettsége az átlag népességhez képest 10-15-szörös. A betegséggel terhelt család gyermekében a betegség manifesztálódása a szülőkénél korábbi életkorban várható. MC-ben a 16. kromoszómán található MC-re hajlamosító a NOD2/CARD15 gén a legismertebb. Emellett számos egyéb hajlamosító gént is leírtak [13, 14]. A gyanított környezeti tényezők csak részben ismertek. Az IBD kialakulásának veszélyét növeli az anya terhessége alatti betegségei, vírusinfekciók, valamint a csecsemőkori első felében elszenvedett enterális infekciók. A koragyermekkori környezet, valamint a táplálkozás egyaránt felelőssé tehető az IBD kialakulásának kockázata szempontjából. A betegség a nyugat-európai országokban és az USA-ban a leggyakoribb, legritkább Japán környékén. Azonban az ázsiai ország azon részein, ahol a tradicionális étrendtől eltértek és a nyugati étkezési szokásokat preferálják, megnövekedett az IBD-s betegek száma. Az IBD gyakrabban fordul elő a szellemi munkát végzők, és a jó higiénias körülmények között élők körében. Különbséget jelenthet a táplálék sterilitása és a védőoltások is. A higiéné hipotézis szerint napjaink túlzottan „steril” világában mindez hatással van a mukozális immunrendszer túlműködésére, amely ezáltal a bélgyulladás kialakulásához vezethet. Ezt a tényt támasztja alá, hogy a kevésbé higiénikus területeken kisebb a betegség előfordulási aránya [15-17]. A dohányzás remisszió indukálására gyakorolt hatását az UC-ben jótékonyak tartják, MC-ben viszont káros [17,18].

A bélnyálkahártya nem csak egy fizikai barrier a patogének inváziója ellen, hanem egyúttal egy igen érzékeny struktúra, mely reagál a környezet változásaira. A gyomor-bélrendszer mindegy 300m²-nyi felületen érintkezik a külső környezettel. Az intesztinális homeosztázis fenntartása nagyon összetett folyamat [19]. A bél-asszociált mukozális immunrendszernek (GALT) egyszerre kell tolerálni a nem-veszélyes, táplálék antigéneket, kommenzális mikroorganizmusokat, és ezzel egy időben a helyi védekező mechanizmusoknak védelmet kell nyújtania a patogén baktériumtörzsekkel szemben [20]. Ezen egyensúly fenntartásában a mikroflóra összetételének, a veleszületett és adaptív immunrendszernek, valamint az intesztinális barriereknek is kiemelt jelentősége van. Az egyrétegű bélhámsejt réteg szerepe kiemelt a tápanyag-felszívódásban. A bélhámsejtek fontos tulajdonsága a gyors regenerációs képesség, hisz a metabolikus folyamatok és baktériumok

megemelik a sérülés kockázatát. A bél epitelsejt rétegének sérülése mukózális erózióhoz, majd fekélyesedéshez vezet, ez a patogének, kémiai anyagok bélnyálkahártyán való átjutásának fokozódását eredményezi [21]. IBD-ben a bélhám permeabilitása megnövekszik, ezáltal szabaddá válik az út az obligát patogén és opportunistá baktériumok számára, ezáltal gyulladásos folyamatok beindulását eredményezve a bél falában [22].

A veleszületett immunválaszok szabályzásában nagy szerepet játszanak a mintázatfelismerő receptorok (PRR) (3.ábra).



3. ábra: Az IBD kialakulásának lehetséges folyamata. Genetikailag fogékony egyéneknél a bélnyálkahártya megváltozott barrierfunkciója, a veleszületett adaptív immunrendszer válasza és különböző környezeti faktorok hozzájárulhatnak a krónikus bélgyulladás kialakulásához [5].

E családba tartoznak a Toll-like receptorok (TLR), melyek alapvető fontosságúak a mikrobák felismerésében, antimikrobiális gének indukciójában és az adaptív immunválaszok kontrolljában [23]. Egyes feltevések szerint az IBD kialakulhat a mukózális immunrendszer kommenzáris flórára adott túlzott immunválasza miatt. Az adaptív immunrendszer részéről a T-sejteknek van elsődleges szerepe a gyulladásos bélbetegség kialakulásában és gyulladás fenntartásában [24]. A T-sejtek aktiválódnak, citokineket szecernálnak, így hatva a

környezetük különböző sejtjeire, mint a dendritikus sejtekre, makrofágokra, neutrofil granulocytákra, epitél- és endotél sejtekre [25]. A T-helper 1-típusú T-sejt válaszok során különböző citokinek, mint interleukin (IL)-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-18, interferon- γ és tumor necrosis factor α (TNF- α) szabadul föl. Bár a TNF- α a normális host immunválaszokhoz is elengedhetetlen, túlzott expressziója súlyos gyulladásoos következményekkel járhat [26].

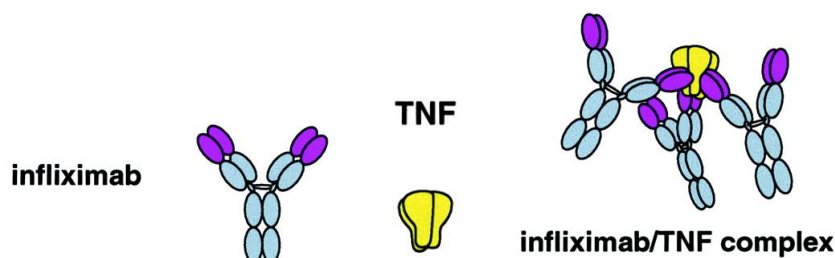
A tumor necrosis factor szerepe a gyulladásoos bélbetegségben

A TNF α az IBD patomechanizmusában a legszélesebb körben vizsgált gyulladáskeltő citokin. A TNF α egy 26 kD méretű transmembrán protein, melyet macrophagok, monocyták, neutrophil granulocyták, aktivált CD4⁺ T-sejtek és NK sejtek termelnek bakteriális lipopolysaccharid kiváltotta stimulusra. A TNF α szintézisét számos faktor, mint az interferonok, IL-2 és granulocytá-macrophag kolónia stimuláló faktor stimulálja. A TNF α heterotrimert képezve a célsejtek membránjának TNF α receptorához kötődik. Crohn beteg gyermekek bélhámsejtjeiben megnő a TNF α -t szekretáló sejtek száma [27, 28].

A TNF α a p38 és a c-jun N terminális kináz kaszkádok agonistája, melyek a gyulladásoos folyamatok beindításában alapvető mitogén aktivált protein kináz (MAPK) család tagjai. A TNF α aktiválja az endotéliumot azáltal, hogy fokozza az E-selectin és egyéb adhézió molekula megjelenését [29]. A TNF α bélnyálkahártyára kifejtett hatásai között szerepel az epiteliális barrier károsítása [30], az epiteliális villosus sejtek apoptosisának [31] és a bélhámsejtek kemokin [32] termelésének indukálása. A TNF α aktiválja továbbá a neutrophil sejteket és a macrophagokat, illetve stimulálja a B sejteket is [33]. A hozzájárul a granuloma képződéséhez, és elősegíti az akut fázis fehérjék termelődését [34], fokozza az osteoclastok aktivitását is, amely megnövekedett csont reszorpióhoz és csökkent csont ásványianyag tartalomhoz vezet [35]. A TNF α sejtmembránhoz kötődve az antiinflammatorikus, ugyanakkor profibrotikus transforming growth factor β citokinnal együtt képes választ indukálni a célsejtben, befolyásolva ez által az IBD-ben zajló gyulladásoos és fibrotikus folyamatokat [36].

A hagyományos terápiára rezisztens IBD-s esetekben TNF α ellenes monoklonális antitest, Infliximab (IFX) kezelés jön szóba. Az IFX egy kimérikus IgG1 monoklonális antitest, melynek 75%-a humán és 25%-a egér eredetű szekvenciákat tartalmaz [37]. Magyarországon Crohn beteg gyermekek 2007 márciusa óta kaphatnak IFX-ot, de UC-s

gyermekkek kezelésében még nem vezették be [38]. A kezelés célja a fistulák számának csökkentése, valamint a szteroid-függőség megszüntetése és szteroid elhagyása. Az IFX a szolubilis TNF- α -t blokkolja és megakadályozza a transzmembran TNF α -hoz kötődést is. Az IFX TNF α -t neutralizáló, antiapoptotikus, bélpermeabilitást stabilizáló, anti-adhéziós molekulákat eltávolító hatással rendelkezik [39-41] (4. ábra).

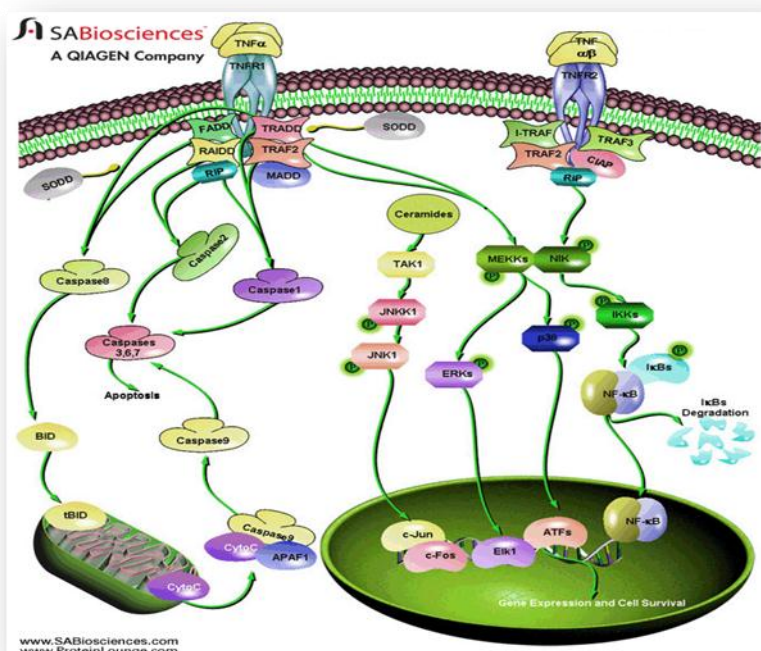


4. ábra: Az Infliximab (IFX) és TNF- α komplex kialakulása. Az IFX egér variábilis régiókkal rendelkezik (lila) az antitest mindkét könnyű láncán, a nehéz láncok a humán IgG1 és κ konstans régióhoz kapcsolódnak. Egy IFX molekula egyszerre 3 TNF- α molekulához tud kapcsolódní [42].

A tumor necrosis factor α jelátvitelében szerepet játszó molekulák

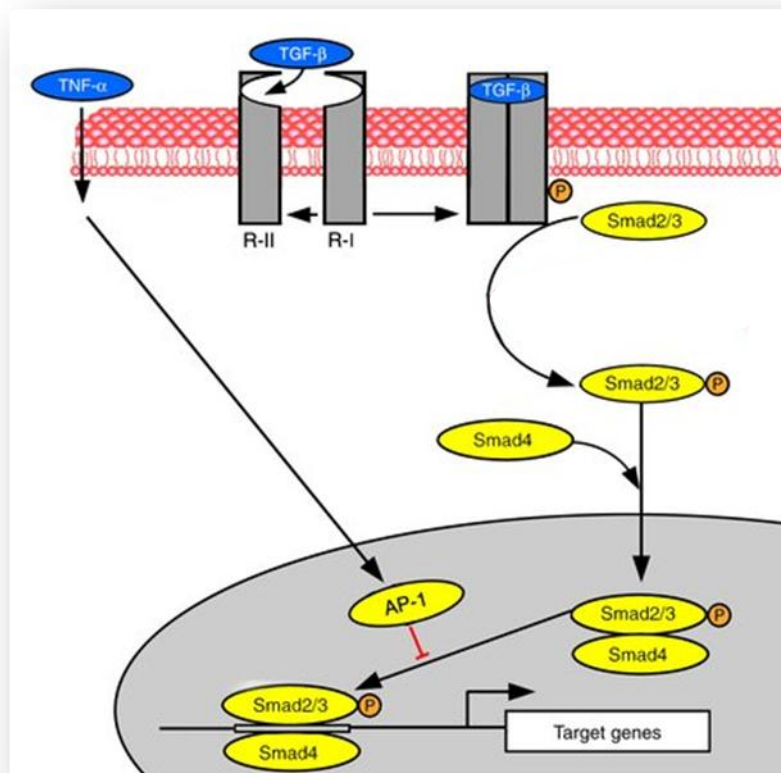
A TNF α a receptorain keresztül számos szignáltranszdukciós útvonalat aktiválhat (5. ábra). A TNF α receptorain keresztül aktiválja az extracelluláris szignál-regulált kinázokat (ERK) és a c-Jun N-terminális kinázokat (JNK), melyek a gyulladásoos válaszok „hangszerelésében” játszanak központi szerepet, más jelátviteli útvonalakkal –mint NF- κ B - együtt [43, 44]. Az IBD-ben leírták a p38 MAPK-on keresztüli jelátviteli utak fokozott aktiválódását, amely lymphocyták toborzásához és aktiválásához vezet, valamint befolyásolja a kapilárisokon keresztüli lymphocytá-adhesiót és migrációt, amely a gyulladásoos folyamatokat erősíti [45].

Közülük a JNK1/2, ERK1/2 jelátvivők szerepe ismert a különböző szervek, így a tüdő és a vese fibrotikus elváltozásai kapcsán, valamint ismerten befolyásolják a sejtek közötti kapcsoló struktúrák, így a szoros sejtkapcsolatok (tight junctionok) állapotát, funkcióját [46].



5. ábra: A TNF- α jelátviteli útvonal és hozzá kapcsolódó mediátorok gyulladásos folyamatokban. A TNF- α bekötődése a TNF- α receptorhoz aktiválja a MAPK csoportba tartozó ERK és JNK jelátviteli útvonalakat is, hozzájárulva a gyulladásos válasz kialakulásához [47].

A TNF α és a SMAD-ok kapcsolata kevésbé ismert. A SMAD-ok intracelluláris fehérjék, melyek extracelluláris jeleket továbbítanak a sejtmagba, ezzel aktiválva egyes gének transzkripcióját [48, 49]. A SMAD molekulák szerepét elsősorban a TGF β indukálta jelátviteli utak kapcsán írták le. A TGF β II-es típusú receptorának aktiválása a TGF β I-es típusú receptor foszforilációjához, majd TGF β I és II típusú receptorok komplexképzéséhez vezet. A TGF β I-es típusú receptora felismeri a SMAD 2/3 molekulát, azok foszforiláció révén aktiválódnak és a sejtmag felé vezető jelátvitel során SMAD 4-gyel komplexet képeznek. Ez a SMAD 2/3 és SMAD 4 komplex lép be DNS-kötő kofaktorokkal a sejtmagba és a TGF β target gének enhancer régiójához kötődve indukálja azok transzkripcióját [51, 52], (6. ábra).



6. ábra: A TGF-β/SMAD jelátviteli utak és a TNF-α kapcsolata. A TGF-β bekötődése a konstitutívan aktív II-es receptortípushoz (R-II) az I-es TGF-β receptortípus (R-I) foszforilációjához, ezáltal aktivációjához vezet és receptor komplexet formál a két alegység. Az aktivált R-I foszforilálja a receptor-regulált SMAD 2 és 3-at (SMAD2/3), amelyek ezután a SMAD4-gyel képeznek komplexet. A SMAD2/3-SMAD4 komplex DNS-kötő kofaktorokkal a citoplazmából a nucleusba kerülnek és a TGF-β target génekre specifikus [51].

Mindazonáltal nemrégiben kimutatták, hogy keratokonjunktivitiszben a SMAD jelátviteli utak aktiválódnak és a konjunktíva eredetű fibroblasztokban a TGFβ és TNFα is modulálja a SMAD-ok aktivációját [55]. Porckorongban vizsgálták a TNFα és TGFβ/SMAD jelátviteli útvonalak kapcsolatát és abban az activator protein-1 (AP-1) molekula szerepét, amely a TNFα jelátviteli útvonalak aktiválódása kapcsán közvetlenül, a magban gátolta a SMAD2/3 és SMAD4 komplex működését [56]. Azonban gyermekkori IBD kapcsán a TNFα és a SMAD jelátviteli utak kapcsolatát nem vizsgálták.

A SMAD-ok három osztályát különböztetünk meg egymástól. A receptor-szabályozott SMAD-ok (R-SMAD) csoportjába tartozik a SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 és SMAD8/9. A SMAD4 közvetítő (co-SMAD), mely kölcsönhatásba lépve az R-SMAD-dal

vesz részt a jelátvitelben. A gátló vagy inhibitor SMAD-ok (I-SMAD) közé tartozik a SMAD6 és SMAD7, melyek blokkolják az R-SMAD-ok és co-SMAD-ok aktivációját [50].

A SMAD 2/3 fibrózisban betöltött szerepét számos szervben vizsgálták. IBD-s felnőtt betegek gyulladt és nem-gyulladt, stricturált bélnyálkahártyájából származó mintáiban is vizsgálták a SMAD 2/3 aktivációt. A SMAD2/3 aktivációja fokozódott a stricturát fedő nyálkahártyában, a nem stricturás nyálkahártyához képest [53, 54]. A vizsgált betegek azonban szteroid és immunszuppresszáns kezelés alatt is álltak. Ezért a SMAD 2/3 esetleges szerepe az IBD patomechanizmusában és az intestinális fibrózis kialakulásában lényegében tisztázatlan maradt. Gyermekkori IBD kapcsán a TNF α és sSMAD jelátviteli utak kapcsolatát nem vizsgálták.

CÉLKITŰZÉS

Mai ismeretek alapján az IBD patomechanizmusa, pontos kiváltó okai nem határozhatók meg és a betegek kezelése sem teljesen megoldott. Az IBD eredményes kezelésének érdekében lényeges a kórlefolyás pontos feltérképezése, a különböző tényezők egymást befolyásoló hatásainak tisztázása. A betegség patomechanizmusában központi szerepet játszik a TNF α . A korábban említett a TNF α által szabályzott jelátvivő molekulák - JNK1/2, ERK1/2, SMAD2/3 - befolyásolják a sejtek közti kapcsolatot, így hathat a bélsejtek közötti kapcsolatok állapotára is, befolyásolva ezáltal a bélhám permeabilitását. Ezen kívül számos szerv fibrózisában ismert ezen jelátvivők szerepe. A TNF α JNK1/2 és ERK1/2 aktivációra gyakorolt hatása egyes modelleken már ismert, a TNF α SMAD2/3-ra kifejtett hatása viszont ez idáig kevésbé tisztázott. Kutatási célunk a JNK1/2, ERK1/2 és a SMAD2/3 szignáltranszdukciós útvonalak gyulladásos bélbetegség patomechanizmusában betöltött szerepének a vizsgálata. A SMAD2/3 szerepét a gyulladásos bélbetegség patomechanizmusában előtűnk gyermekekben még nem vizsgálták. Valamint a TNF α ezen jelátvivők aktivációjára az enterocitákban kifejtett hatásának vizsgálata.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Beteganyag

A kutatás során a budapesti Semmelweis Egyetem I. Gyermekklinikájának gastroenterológiai osztályán újonnan diagnosztizált gyulladós bélbetegségben szenvedő, valamint egészséges gyermekek kolonoszkópia során vett biopsziás mintáit vizsgáltuk. A beteganyag 10 Crohn-betegségben (életkor medián (tartomány): 12,5 év (2-17); F/L: 8/2), 5 colitis ulcerosában (életkor medián (tartomány): 12 év (7-16); F/L: 1/4) szenvedő gyermekből, valamint – kontroll mintaként – 10 egészséges gyermekből (életkor medián (tartomány): 12 év (2,5-15); F/L: 6/4) állt (1. táblázat). Az IBD diagnózisának felállítása a Porto kritériumok szerint történt [48, 49]. A MC-ben a következő tünetek domináltak: perianális sipoly, véres széklet vagy véres hasmenés, hasi fájdalom, fogyás és anaemia. Az UC-s betegeknél a véres széklet, hasi fájdalom és fogyás volt a vezető tünet. A kolonoszkópia során nyert biopsziás mintavétel a makroszkóposan gyulladt és nem-gyulladt vastagbél nyálkahártyából történt. 10 egészséges gyermekből történt kontroll biopsziás mintavétel, akik székrekedés, fogyás vagy rektális vérzés miatt kerültek kivizsgálásra. A szövettani kép egyik esetben sem mutatott eltérést. A mintákból rutin hisztológiai elemzés és molekuláris biológiai vizsgálat történt. A vizsgálatok megkezdése előtt a gyermekek hozzátartozóinak írásbeli hozzájárulását kértük, a molekuláris biológiai vizsgálatok a TUKEB: 73/2003-as etikai engedéllyel történtek.

beteg	IBD formája (MC vagy UC)	nem (F:fiú, L: lány)	kor (évek)	vezető tünet
1	MC	F	15	hasfájás, hasmenés
2	MC	L	4	véres széklet
3	MC	F	5	perianális fisztula
4	MC	F	14	véres széklet
5	MC	L	13	hasmenés, anémia
6	MC	F	17	véres hasmenés
7	MC	F	16	véres hasmenés
8	MC	F	11	véres hasmenés
9	MC	F	12	fogyás, hasmenés
10	MC	F	2	hasmenés, anémia
11	UC	L	15	véres széklet, hasfájás
12	UC	L	16	véres széklet, anémia
13	UC	F	7	véres széklet, hasfájás
14	UC	L	12	véres széklet, fogyás
15	UC	L	12	véres széklet

1. Táblázat: Az újonnan diagnosztizált Crohn beteg (MC) és colitis ulcerosás (UC) betegek klinikai jellemzői. Rövidítések: F: fiú, L:lány

Immunfluoreszcens festés

Az immunfluoreszcens vizsgálat elvégzése céljából a kolon-biopsziák a mintavételezés után azonnal fagyasztásra kerültek. Ezt követően Shandon kriomátrixba (ThermoElectron Co., Waltham, USA) ágyasztuk őket, és 5 µm vastagságú metszeteket készítettünk, amiket felhasználásig -80°C-on tároltuk. A metszeteket 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk a foszforilált JNK1/2, ERK1/2 (p-JNK1/2 poliklonális nyúl antitest, p-ERK1/2 poliklonális nyúl antitest, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) és foszforilált SMAD2/3 (p-SMAD2/3 nyúl poliklonális antitest, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) jelátvivő molekulákat kimutató antitestekkel 1:100 hígításban. Többszöri mosást követően a metszeteket a kecskében termelt, anti-nyúl IgG Alexa Fluor® 488 antitesttel (Invitrogen, Molecular Probes) inkubáltuk 1:100 hígításban, 30 percen keresztül szobahőmérsékleten. A sejtmag kimutatására Hoechst 33342 festéket használtunk 1:1000 hígításban (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Tíz perc magfestés után a metszeteket PBS-ben mostuk és Vectashield médiummal (Vector Laboratories, Burlingame, USA) fedtük. A specificitás ellenőrzése és az autofluoreszcencia kiküszöbölése céljából kontrollként csak másodlagos antitesttel inkubált metszeteket is készítettünk. A szöveti festődést Zeiss LSM 510 Meta konfokális pásztázó lézer mikroszkóppal (Carl Zeiss, Jena, Németország) és beépített inverz Axiovert 200M mikroszkóppal, 20x Plan Aplanachromat (NA=0,80) és 63x Plan Aplanachromat olaj immerziós DIC objektívekkel (NA=1,4) vizsgáltuk.

Fehérjeizolálás és Western blot

A vizsgált colon biopsziás mintákat lízis pufferben (10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin, 1% Triton-X 100, 0,1 M Tris-HCl (pH=8), 1 mM etilén-glikol-tetraecetsav (EGTA), 5 mM NaF, 1 mM fenil-metil-szulfonil fluorid (PMSF), és 10 mM Na₃VO₄ (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) homogenizáltuk (FastPrep FP120 homogenizátor, Qbiogene Inc, Cedex, Franciaország), majd lecentrifugáltuk (10000g, 10 perc, 4 °C). A

felülúszók összfehérje koncentrációját spektrofotometriás módszerrel, Bradford reagenssel határoztuk meg (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

A mintákhoz treatment puffert (30% glicerol, 20% β -merkaptóetanol, 0,7 M SDS, 0,25 M Tris-HCl pH=6,8) adtunk, majd 5 percig 100 °C-on denaturáltuk azokat. Ezt követően 12 %-os nátrium-dodecil-szulfát (SDS)-poliakrilamid gél (Mini-Protean TGX, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) zsebeibe 25 μ g összfehérjének megfelelő mintamennyiségeket, illetve molekulasúly markert (Precision Plus Protein™ Dual Color, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) és pozitív kontrollt vittünk fel. Az elektroforézist hűtött rendszerben (Penguin™ Dual-Gel Water Cooled Systems, Owl, NH, USA), 120 V feszültség mellett (~40mA) végeztük 25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1% SDS tartalmú futtató pufferben. Következő lépésként a szeparált fehérjéket az SDS-poliakrilamid gélről nitrocellulóz membránra (Hybond™ ECL™, AP Biotech, Buckinghamshire, Anglia) blottoltuk, amit hűtött rendszerben (MiniTank™ Electrobloetter, Owl, NH, USA), folyamatos kevertetés mellett 90 percig 70V-on, 220mA-el végeztünk 25 mM Tris, 170 mM glicin és 20 % metanol tartalmú transzfer pufferben. A fehérjetranszfer sikerességét 1% Ponceau (Sigma Chemical Co., MO, USA) és 25% ecetsav (Reanal, Budapest, Magyarország) tartalmú festékekkel ellenőriztük.

A blotmembránok aspecifikus kötőhelyeinek gátlására a blotokat szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül, óvatos rázatás mellett blokkoló oldatban (5% zsírmentes tejpor, 10% PBS puffer) inkubáltuk. Blokkolást követően a membránokat az elsődleges, specifikus ellenanyagokkal inkubáltuk szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül. Ennek során a Smad 2/3 foszforilált formáját kimutató antitestből (p-SMAD2/3 nyúl poliklonális antitest, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 1:200 hígítást készítettünk mosó oldattal (1% zsírmentes tejpor, 0,1% Tween™ 20 detergens, 10% PBS puffer). A mosási lépéseket követően mosóoldatban 1:2000-re hígított tormaperoxidáz-konjugált másodlagos antitesttel (kecske anti-nyúl HRP-konjugált antitest, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 30 percen át, szobahőmérsékleten inkubáltuk a membránokat. Az immunoreaktív helyek kemilumineszcens szignálját ECL reagens (Amersham ECL™ Prime Western blot detektáló reagens, GE Healthcare) segítségével detektáltuk VersaDoc 5000MP képalkotó rendszer (Bio-

Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) segítségével. Eredményeinket a Quantity One szoftverrel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) denzitometráltuk és értékeltük.

In vitro sejtes kísérletek

A HT-29 humán colon epitélisejtvonalat (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA; European Collection of Cell Cultures) L-glutaminnal, 10% hőinaktivált FBS-sel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 U/ml penicillinnel illetve 100 µg/ml streptomycinnel (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) kiegészített módosított összetételű McCoy's 5A médiumban (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) tenyésztettük.

A kezelés előtt a sejteket $1,2 \times 10^6$ sejt/lyuk mennyiségben 24 lyukú plate-ekre (Sarstedt Inc., Newton, NC, USA) tettük ki, majd 24 órával később a rajtuk levő 10% FBS tartalmú médiumot 0% FBS-t tartalmazó médiumra cseréltük le. Huszonnégy óras FBS megvonást követően a konfluens sejteket 20 pg/µl rekombináns TNF-α-val (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), a kontroll sejteket a TNFα oldószerevel kezeltük (PBS).

Áramlási citometria

A fent leírt módon kezelt HT-29 sejteket sejtkaparóval szedtük fel a 24 lyukú plate-ekről, majd a lecentrifugált sejt pelletet PBS-sel mostuk (2000g, 5 perc, 24 °C). Az intracelluláris jelölés céljából a sejteket ezután 10 percig szobahőmérsékleten fixáltuk és permeabilizáltuk (FACS Permeabilizing Solution 2, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), majd az ilyen módon az antitestek számára átjárhatóvá tett sejteket újból lecentrifugáltuk (2000 g, 5 perc, 24 °C). Ezt követően mintáinkat az immunfluoreszcens festésnél már említett specifikus elsődleges antitestekkel (p-JNK1/2, p-ERK1/2 p-SMAD2/3 poliklonális nyúl antitestek) inkubáltuk (2 µl) 30 percen keresztül, szobahőmérsékleten. A felesleges illetve nem kötődött antitesteket permeabilizáló pufferrel történő mosással távolítottuk el (2000 g, 5 perc, 24 °C). Másodlagos antitestként FITC konjugált poliklonális anti-nyúl IgG ellenanyagot használtunk (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 1 µl mennyiségben, 30 percig,

szobahőmérsékleten. A negatív kontrollokat csak másodlagos antitesttel inkubáltuk. A mérést BD FACSAria™ áramlási citométerrel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) végeztük. Az élő sejteket méret (forward scatter) és granuláltság szerinti (side scatter) szórás alapján határoltuk be. Minden kezelési csoportból 30.000 sejtet számoltunk le. A mintákat ezután BD CellQuest™ Pro (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) szoftver segítségével értékeltük ki.

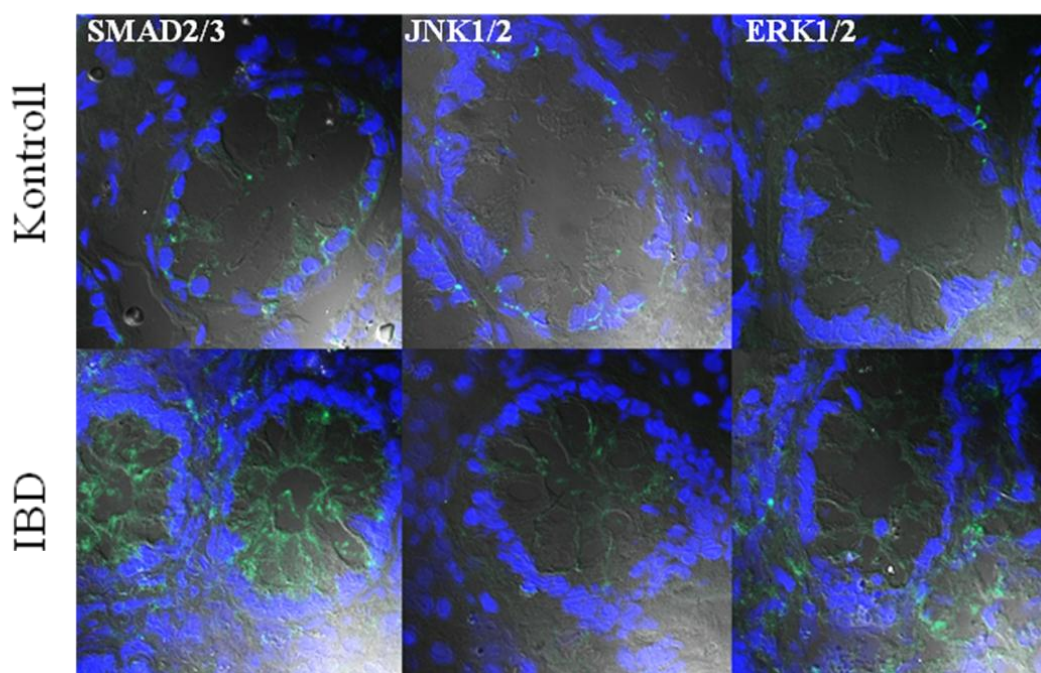
Statisztika

Az adatok statisztikai analíziséhez az ún. nem-paraméteres módszerek közé tartozó Mann-Whitney U tesztet használtuk (Statistica 7.0 software, StatSoft, Tulsa, OK, USA). Az ábrákon látható értékeket átlag \pm szórás (SD) formában adtuk meg. Szignifikáns eltérésnek azt tekintettük, ahol a $p \leq 0,05$.

EREDMÉNYEK

Az aktivált JNK1/2, ERK1/2 és SMAD2/3 jelátvivők lokalizációja a vastagbél nyálkahártyában

Az immunhisztológiai analízis során az újonnan diagnosztizált IBD-s gyermekek gyulladt valamint kontroll gyerekek egészséges vastagbél nyálkahártyájából származó biopsziás mintáit hasonlítottuk össze. A pJNK1/2 és pERK1/2 esetén a vastagbél nyálkahártya enterocitáiban nem detektáltunk egyértelmű immunopozitivitást. Azonban az IBD-s betegek gyulladt vastagbél nyálkahártya enterocitáinak az aktivált SMAD2/3 a pSMAD2/3 festődése egyértelműen intenzívebb volt, mint a kontroll egészséges gyermekek vastagbél nyálkahártyájának pSMAD2/3 immunopozitivitása (7. ábra).

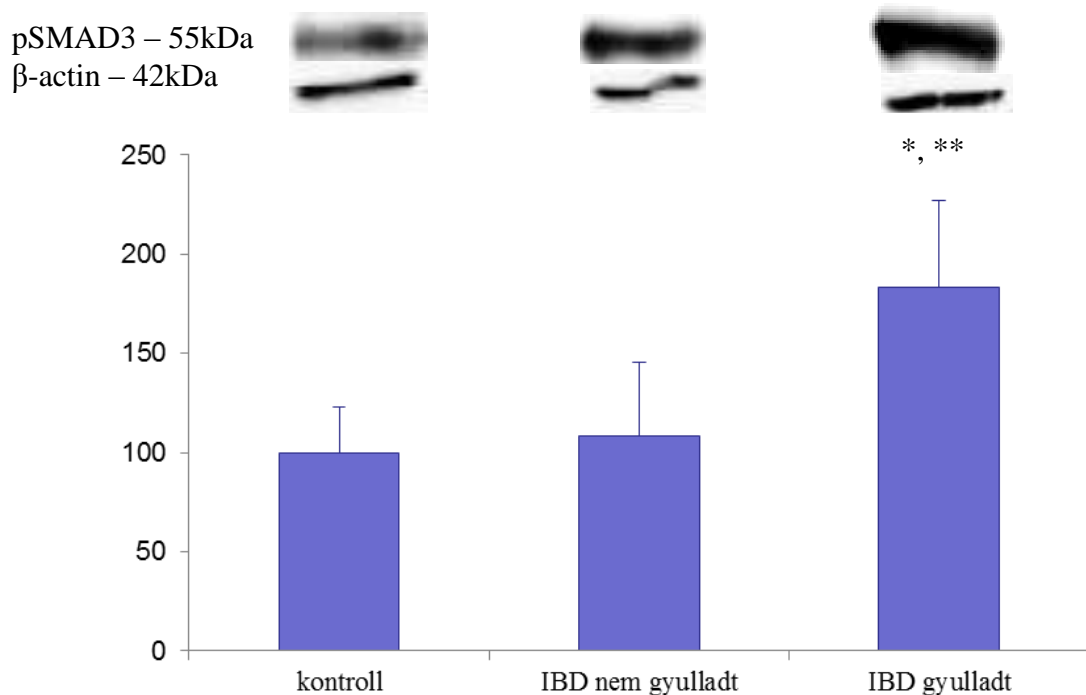


7. ábra: Foszforilált jelátvivők (JNK1,2; ERK1,2; SMAD2/3) lokalizációja kontroll és gyulladós bélbetegségben (IBD-s) szenvedő gyermekek colonbiopsziás mintáiban. A JNK1/2 (felső sor) és az ERK1/2 (középső sor) esetén nem látszik jelentős a két vizsgált csoport között. A SMAD2/3 (alsó sor) foszforilációja sokkal intenzívebb volt az IBD-s mintában a kontrollhoz viszonyítva.

SMAD2 és SMAD3 foszforilációja IBD-s gyermekek vastagbél nyálkahártyájában

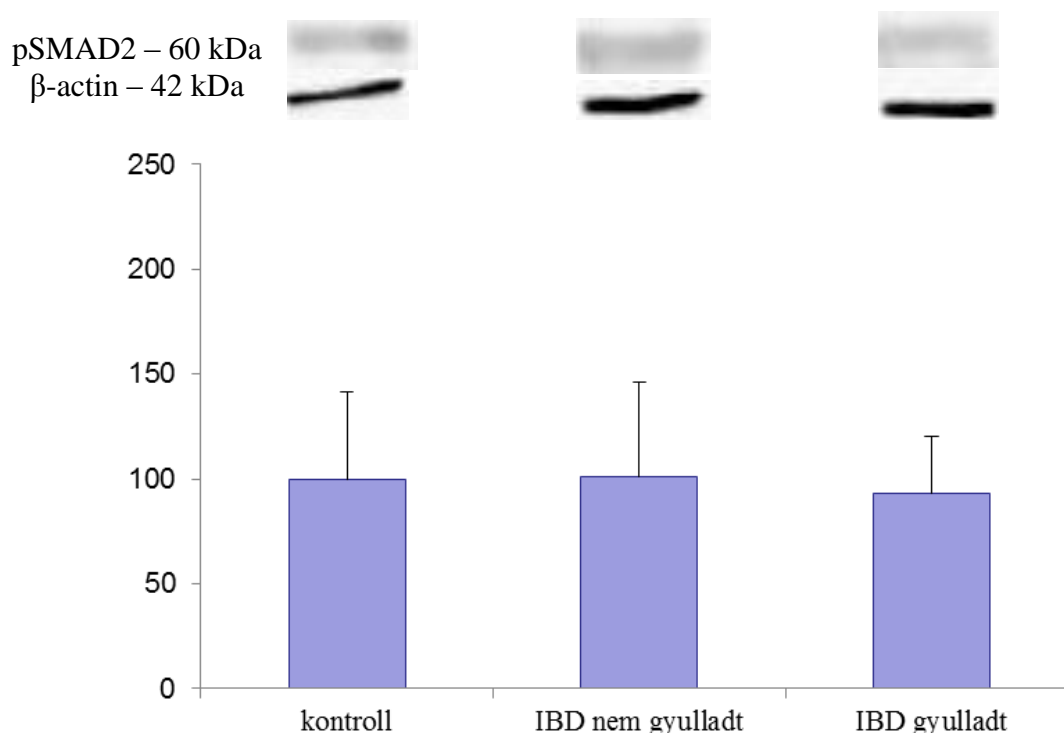
Mivel az immunhisztológiai vizsgálatok alapján pSMAD2/3 immunopozitivitásában egyértelműnek látszó különbség volt a beteg, illetve egészséges vastagbél nyálkahártyák között, ennek mértékét további Western blot mérésekkel erősítettük meg. Az analízis során az újonnan diagnosztizált IBD-s gyermekek gyulladt és nem gyulladt vastagbél szakaszából származó, valamint kontroll gyerekek biopsziás mintáit hasonlítottuk össze. Mivel a pSMAD2 és pSMAD3 molekulák mérete különböző, a Western blot analízis egyúttal lehetőséget teremtett a pSMAD2 és pSMAD3 molekulák egymástól elkülönült detektálására is.

A méréseink során a pSMAD3 molekula foszforilációját az IBD-s betegek gyulladt nyálkahártyájában szignifikánsan magasabbnak találtuk, mint az IBD-s betegek ép nyálkahártyájában (* $p < 0,01$) vagy a kontroll (** $p < 0,01$) mintákban (8. ábra).



8. ábra: pSMAD3 szintje kontroll, gyulladásoos bélbetegségben szenvedő (IBD-s) gyermekek ép és gyulladt colon nyálkahártyájában. A kóros bélszakaszon szignifikáns emelkedés mindkét csoporthoz viszonyítva (* $p < 0,01$ IBD kóros vs. IBD ép; ** $p < 0,01$ IBD kóros vs. kontroll).

A pSMAD2 szint mérésekor nem észleltünk szignifikáns különbséget a különböző csoportok között (9. ábra).



9. ábra: pSMAD2 szintje kontroll és gyulladásoos bélbetegségben szenvedő (IBD-s) gyermekek gyulladt és nem gyulladt colon nyálkahártyájában. A vizsgált csoportok között szignifikáns eltérés nem volt kimutatható (p=NS).

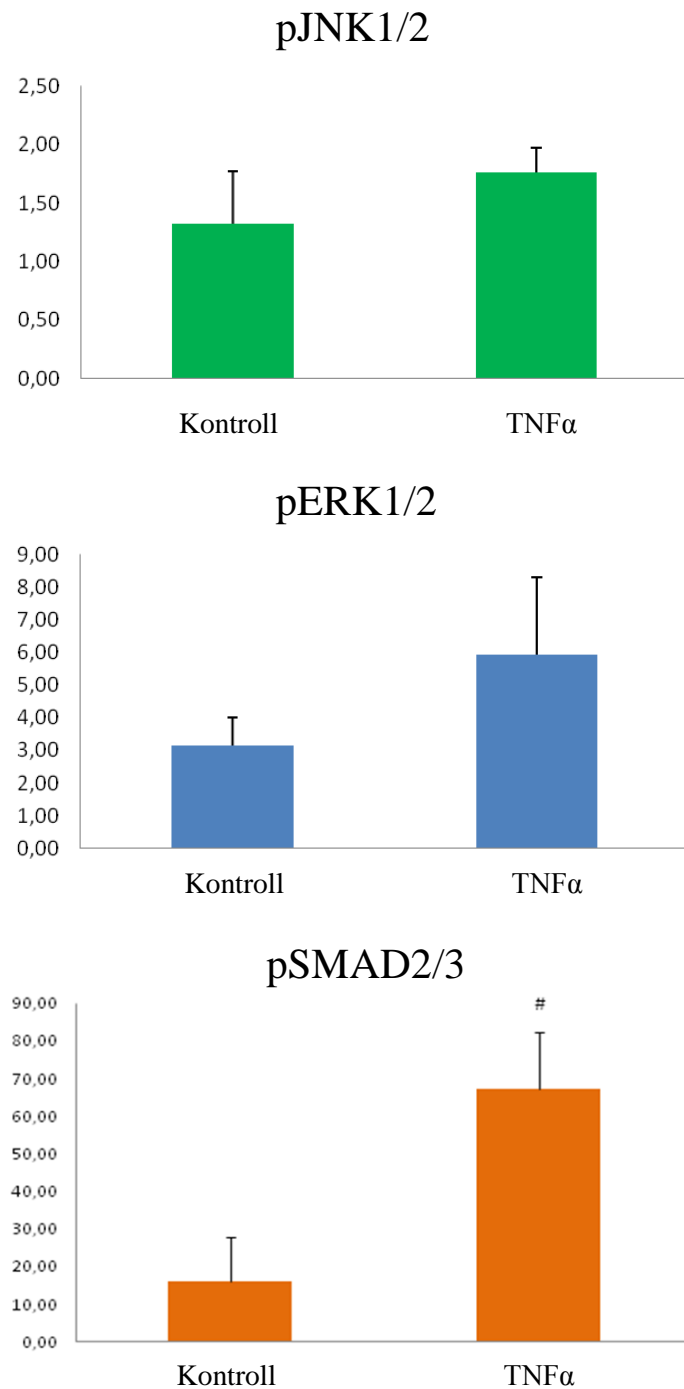
Jelátvivők foszforilációja a HT-29-es sejtvonalon TNF- α -kezelés hatására

A SMAD2/3 foszforilációja a vastagbél epitél sejtjeire volt jellemző. Így kísérleteinket in vitro, HT-29 vastagbél epitél sejtvonalon folytattuk. Azt vizsgáltuk, hogy az IBD patomechanizmusában központi szerepet játszó TNF- α -val való kezelés hogyan hat a JNK1/2, ERK1/2 és SMAD2/3 szignáltranszdukciós molekulák foszforilációjára. A foszforilált jelátvivő molekulák mennyiségét áramlási citométerrel detektáltuk.

A JNK1/2 és ERK1/2 foszforilációja nem változott a HT-29 sejtek TNF α kezelését követően.

TNF α kezelést követően a SMAD2/3 foszforilációja fokozott volt a kezeletlen, kontroll sejtekhez képest (#p<0,001), (10. ábra).

Mindez alátámasztja a biopsziamintákon végzett vizsgálatok eredményét, miszerint az általunk megfigyelt jelátvivők közül a SMAD2/3 foszforilációja emelkedett meg a gyulladt vastagbél nyálkahártya epitélsejtjeiben.



10. ábra: A TNF- α -kezelés hatása HT-29 sejtvonalon a vizsgált jelátvivők aktivitására. A kezelés fokozta a SMAD2/3 foszforilációját. JNK1/2 és ERK1/2 esetén nem volt szignifikáns különbség (# $p < 0,001$ TNF α vs. kontroll)

KÖVETKEZTETÉS, MEGBESZÉLÉS

A gyulladásoos bélbetegség előfordulása az elmúlt évtizedek alatt világszerte egyre gyakoribbá vált. A Crohn-betegség és a colitis ulcerosa pontos eredete, patomechanizmusa máig sem ismert. A betegek oki terápiaájához, gyógyításához, rehabilitációhoz szükséges lenne mindezek pontos ismeretére. A mai elképzélések szerint a gyulladásoos bélbetegség kialakulásában több tényező is szerepet játszhat, melyek összefüggésben állnak egymással: genetikai hajlam, környezeti tényezők és az immunrendszer abnormális válasza.

Az IBD során megváltozik a bélhám permeabilitása, tartós betegség következménye lehet a gyulladt bélszakaszok elhegesedése, a bélfal megvastagodása, esetleges bélelzáródás, így szükségessé válhat az érintett szakasz mütéti úton történő eltávolítása. A betegség patomechanizmusában központi szerepet játszik a TNF α . Erre épül a betegség Infleximabbal történő kezelése, ami egy anti-TNF α terápia [57].

A TNF α ismertén károsan hat a bélnyálkahártya epitéliális barrierjének integritására [50], az epitéliális sejtek apoptózisára, valamint a neutrofil granulocitákra és makrofágokra kifejtett hatása révén részt vesz a szöveti gyulladás kialakulásában és fenntartásában. A JNK1/2, ERK1/2 és SMAD2/3 számos szerv, mint a tüdő és vese fibrózisában is központi szerepet játszanak [58]. Jól ismert ezen jelátvivőknek a sejtek közötti kapcsoló struktúráira (pl. tight junction) gyakorolt hatása is. Ugyanakkor nem, vagy csak kevésbé ismert ezen szignáltranszdukciós molekuláknak az IBD patomechanizmusában betöltött szerepe. Korábbi irodalmi adatok alapján jól ismert a TNF α JNK1/2 és ERK1/2 szignáltranszdukciós útvonalakra kifejtett, aktiváló hatása. Ugyanakkor a TNF α SMAD-ok aktivációjára kifejtett hatása szinte ismeretlen. Így jelen kísérleteink célja az említett jelátvivő molekulák szerepének vizsgálata az IBD patomechanizmusában, valamint hogy az IBD-ben központi szerepet játszó TNF α hogyan hat ezen jelátviteli utakra.

Újonnan diagnosztizált IBD-ben szenvedő gyermekek biopsziás mintáin végeztünk vizsgálatokat. Immunfluoreszcens festési eljárással a beteg mintákon a kontrollhoz képest intenzív SMAD2/3 foszforilációt mutattunk ki, mely jórész a bélmukóza epitél sejtjeire lokalizálódott. Mivel a legjelentősebb eltérést az általunk vizsgált szignáltranszdukciós molekulák (JNK1/2, ERK1/2, SMAD2/3) aktivációjában a SMAD2/3 esetén észleltünk, a továbbiakban figyelmünk ezen jelátvivőre irányult. Western blot segítségével kimutattuk,

hogyan az IBD-ben szenvedő gyermekek gyulladt vastagbél nyálkahártyájában a foszforilált SMAD3 fehérje szintje valóban megemelkedik a beteg gyerekek ép, illetve a kontroll mintákhoz képest. Ugyanakkor a SMAD2 foszforilációját változatlanok találtuk.

Mivel a SMAD3 fokozott aktivációja a bélmukóza epitel sejtjeire lokalizálódott, így folytatásként vastagbél eredetű (HT-29) sejtvonalon vizsgáltuk az említett jelátvivő molekulák TNF α kezelés hatására bekövetkező foszforilációját. A kezelés szignifikáns SMAD2/3 foszforiláció emelkedést eredményezett. A JNK1/2 és az ERK1/2 szignáltranszdukciós útvonalak azonban nem aktiválódtak. Mindez alátámasztja a bélbiopsziás mintákon végzett vizsgálataink eredményeit: a gyulladós bélbetegségben szenvedő gyermekek bélnyálkahártya epitel sejtjeiben az aktivált SMAD3 szintje megemelkedik.

Egy 2009-es tanulmány szerint Latella G. és munkatársai, akik a TGF- β /SMAD3 jelátviteli útvonalat vizsgálták. Kutatásaik során MC-hez társuló fibrózist indukáltak SMAD3-KO és vad típusú egerekben TNBS segítségével. A szövettani vizsgálatok azt mutatták, hogy a vad típus esetén jóval nagyobb a vastagbél fibrózisának mértéke. Az eredmények alapján arra következtettek, hogy a SMAD3 szerepet játszik a vastagbél fibrózisában, valamint hogy a bélfibrózis kezelésének új célpontja lehet a SMAD3, különösen az IBD-ben [59].

Mindezen eredmények alapján levonhatjuk azt a következtetést, hogy a SMAD3 fokozott aktivációja szerepet játszhat a gyulladós bélbetegség patomechanizmusában. Az IBD patomechanizmusában központi szerepet játszó TNF α hatással lehet a SMAD3 aktivációjára. Mivel mind maga a TNF α , mind a SMAD3 fontos szerepet tölt be más szervek fibrotikus folyamataiban, illetve a sejt-sejt kapcsoló struktúrák változásaiban, feltételezhető, hogy ezen molekulák szerepe a gyulladós bélbetegségben is hasonló. Azonban a SMAD3 pontos szerepének tisztázása még további kísérleteket igényel.

ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a SMAD3 foszforilációja fokozódik a gyulladásoos bélbetegségben szenvedő gyulladt vastagbél nyálkahártyájában a kontroll és a beteg gyermekek nem gyulladt nyálkahártyájához képest. A SMAD2/3 fokozott foszforilációja az immunfluoreszcens festés alapján elsősorban a bélmukóza epitél sejtjeire lokalizálódik. In vitro kísérleteink igazolták, hogy a gyulladásoos bélbetegségben központi szerepet játszó TNF α fokozza a SMAD2/3 aktivációját.

Ezért arra következtethetünk, hogy a gyerekek gyulladásoos bélbetegségének patomechanizmusában szerepet játszhat a SMAD3 szignáltranszdukciós molekula aktivációja. Irodalmi adatok szerint a SMAD2/3 központi szerepet játszik a szöveti fibrózis, valamint a sejtek közti kapcsoló struktúrák szabályozásában. Ezért további kísérletekkel tervezzük tisztázni a TNF α , illetve a SMAD3 aktivációjának a gyulladásoos bélbetegség kapcsán kialakuló fibrózisa és az epitélsejtek közötti kapcsolóstruktúrákra, így a belek permeabilitására való hatását.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ez úton szeretném megragadni az alkalmat, és köszönetet mondani Dr. Vannay Ádámnak és Dr. Molnár Krisztának, akik folyamatos támogatásukkal, szakmai tudásuk megosztásával, észrevételeikkel hozzájárultak dolgozatom megírásához és lehetőséget nyújtott kutatómunkám elvégzéséhez; Szarka Andrásnak, hogy elvállalta a belső konzulens szerepét, és véleményével, tanácsaival segítette munkámat.

Köszönöm Dr. Balicza-Himer Leonóranak a gyakorlati munkában és a dolgozat elkészítésében nyújtott értékes segítségét. Valamint hálás vagyok a labor összes dolgozójának türelmes és segítőkész munkájukért.

ÁBRA- ÉS TÁBLÁZATJEGYZÉK

1. ábra: Ép, Crohn beteg és colitis ulcerosás bélszakasz sematikus-, szövettani – és endoszkópos képe.
2. ábra: A gyulladásoos bélbetegség (IBD) patogenezisében szerepet játszó tényezők.
3. ábra: Az IBD kialakulásának lehetséges folyamata
4. ábra: Az Infliximab (IFX) és TNF- α komplex kialakulása.
5. ábra: A TNF- α jelátviteli út vonal és hozzá kapcsolódó mediátorok gyulladásoos folyamatokban.
6. ábra: A TGF- β /SMAD jelátviteli utak és a TNF- α kapcsolata.
7. ábra: Foszforilált jelátvivők (JNK1,2; ERK1,2; SMAD2/3) lokalizációja kontroll és gyulladásoos bélbetegségben (IBD-s) szenvedő gyermekek colonbiopsziás mintáiban.
8. ábra: pSMAD3 szintje kontroll és gyulladásoos bélbetegségben szenvedő (IBD-s) gyermekek gyulladt és nem gyulladt colon nyálkahártyájában.
9. ábra: pSMAD2 szintje kontroll és gyulladásoos bélbetegségben szenvedő (IBD-s) gyermekek gyulladt és nem gyulladt colon nyálkahártyájában.
10. ábra: A TNF- α -kezelés hatása HT-29 sejtvonalon a vizsgált jelátvivők aktivitására
1. táblázat: Az újonnan diagnosztizált Crohn-beteg (MC) és colitis ulcerosás (UC) betegek klinikai jellemzői

IRODALOMJEGYZÉK

1. Danese S, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol.* 2006, 12:4807-12.
2. Ardizzone S, Bianchi Porro G. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. *J Intern Med.* 2002, 252:475-96.
3. Gearry RB, Richardson AK, Frampton CM és mtsai. Population-based cases control study of inflammatory bowel disease risk factors. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010, 25:325-33.
4. MacDonald TT, Immunopathogenesis of Crohn's disease., *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2005, 29:S118-24.
5. Baron S, Turck D, Colombel JF és mtsai. Environmental risk factors in paediatric inflammatory bowel disease: a population based case control study. *Gut.* 2005, 54:357-63.
6. Martin Hausmann, How Bacteria-Induced Apoptosis of Intestinal Epithelial Cells Contributes to Mucosal Inflammation, *International Journal of Inflamm.* 2010, 2010:574568.
7. Rieder F, Fiocchi C. Intestinal fibrosis in IBD--a dynamic, multifactorial process. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2009; 6:228-35.
8. Pucilowska JB, Williams KL, Lund PK. Fibrogenesis. IV. Fibrosis and inflammatory bowel disease: cellular mediators and animal models. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000; 279:G653-9.
9. <http://www.ujdieta.hu/indexd0c9.html?content=751>
10. Ruemmele FM. Pediatric inflammatory bowel diseases: coming of age. *Curr Opin Gastroenterol.* 2010; 26:332-6.
11. Kovacs M, Muller KE, Arato A, Lakatos PL, Kovacs JB, Varkonyi A, Solyom E, Polgar M, Nemes E, Guthy I, Tokodi I, Toth G, Horvath A, Tarnok A, Tomsits E, Csozanszky N, Balogh M, Vass N, Bodi P, Dezsofi A, Gardos L, Micskey E, Papp M, Szucs D, Cseh A, Molnar K, Szabo D, Veres G; Hungarian IBD Registry Group (HUPIR). Diagnostic yield of upper endoscopy in paediatric patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. Subanalysis of the HUPIR registry. *J Crohns Colitis.* 2012; 6:86-94.
12. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2007; 448:427-34.

13. Hugot JP, Zaccaria I, Cavanaugh J, Yang H, Vermeire S, Lappalainen M, Schreiber S, Annese V, Jewell DP, Fowler EV, Brant SR, Silverberg MS, Cho J, Rioux JD, Satsangi J, Parkes M; for the IBD International Genetics Consortium. Prevalence of CARD15/NOD2 mutations in Caucasian healthy people. *Am J Gastroenterol.* 2007; 102:1259-67.
14. Molnar T, Hofner P, Nagy F, Lakatos PL, Fischer S, Lakatos L, Kovacs A, Altorjay I, Papp M, Palatka K, Demeter P, Tulassay Z, Nyari T, Miheller P, Papp J, Mandi Y, Lonovics J; Hungarian IBD Study Group. NOD1 gene E266K polymorphism is associated with disease susceptibility but not with disease phenotype or NOD2/CARD15 in Hungarian patients with Crohn's disease. *Dig Liver Dis.* 2007; 39:1064-70.
15. Weinstock JV, Elliott DE. Helminths and the IBD hygiene hypothesis. *Inflamm Bowel Dis.* 2009; 15:128-33.
16. Hafner S, Timmer A, Herfarth H, Rogler G, Schölmerich J, Schäffler A, Ehrenstein B, Jilg W, Ott C, Strauch UG, Obermeier F. The role of domestic hygiene in inflammatory bowel diseases: hepatitis A and worm infestations. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2008; 20:561-6.
17. Moreels TG, Pelckmans PA. Gastrointestinal parasites: potential therapy for refractory inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2005; 11:178-84.
18. van der Heide F, Dijkstra A, Weersma RK, Albersnagel FA, van der Logt EM, Faber KN, Sluiter WJ, Kleibeuker JH, Dijkstra G. Effects of active and passive smoking on disease course of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2009; 15:1199-207.
19. Takebayashi K, Koboziev I, Ostanin DV, Gray L, Karlsson F, Robinson-Jackson SA, Kosloski-Davidson M, Dooley AB, Zhang S, Grisham MB. Role of the gut-associated and secondary lymphoid tissue in the induction of chronic colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2011; 17:268-78.
20. Tlaskalová-Hogenová H, Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases., *Immunol Lett.* 2004, 93:97-108.
21. Laukoetter MG, Nava P, Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease., *World J Gastroenterol.* 2008, 14:401-7.
22. Salim SY, Söderholm JD, Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases., *Inflamm Bowel Dis.* 2011, 17:362-81.
23. Areal H, Abrantes J, Signatures of positive selection in Toll-like receptor (TLR) genes in mammals., *BMC Evol Biol.* 2011, 11:368.

24. Abraham C, Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease., *Gastroenterology*. 2011, 140:1729-37.
25. Gersemann M, Stange EF, Wehkamp J. From intestinal stem cells to inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2011; 17:3198-203.
26. Ordás I, Feagan BG, Sandborn WJ. Early use of immunosuppressives or TNF antagonists for the treatment of Crohn's disease: time for a change. *Gut*. 2011; 60:1754-63.
27. Nielsen OH, Seidelin JB, Munck LK, Rogler G. Use of biological molecules in the treatment of inflammatory bowel disease. *J Intern Med*. 2011; 270:15-28.
28. Yang Y, Wang H, Dou Y, Wang Y, Han G, Wang R, Wang L, Guo R, Xiao H, Li X, Shen B, Shi Y, Chen G, Li Y. Colitogenic role of tumour necrosis factor (TNF) receptors in trinitrobenzene sulphonic acid colitis: TNF-R1 ablation does not affect systemic inflammatory response. *Clin Exp Immunol*. 2011; 165:372-82.
29. Nakamura K, Honda K, Mizutani T, Akiho H, Harada N. Novel strategies for the treatment of inflammatory bowel disease: Selective inhibition of cytokines and adhesion molecules. *World J Gastroenterol*. 2006; 12:4628-35.
30. Hindryckx P, De Vos M, Jacques P, Ferdinande L, Peeters H, Olievier K, Bogaert S, Brinkman B, Vandenabeele P, Elewaut D, Laukens D. Hydroxylase inhibition abrogates TNF-alpha-induced intestinal epithelial damage by hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of FADD. *J Immunol*. 2010; 185:6306-16.
31. Mudter J, Neurath MF. Apoptosis of T cells and the control of inflammatory bowel disease: therapeutic implications. *Gut*. 2007; 56:293-303.
32. van Deventer SJ. Review article: Chemokine production by intestinal epithelial cells: a therapeutic target in inflammatory bowel disease? *Aliment Pharmacol Ther*. 1997;11 Suppl 3:116-20.
33. Frasca D, Romero M, Diaz A, Alter-Wolf S, Ratliff M, Landin AM, Riley RL, Blomberg BB. A molecular mechanism for TNF- α -mediated downregulation of B cell responses. *J Immunol*. 2012; 188:279-86.
34. Englaro W, Bahadoran P, Bertolotto C, Busca R, Derijard B, Livolsi A, Peyron JF, Ortonne JP, Ballotti R. Tumor necrosis factor α -mediated inhibition of melanogenesis is dependent on nuclear factor κ B activation. *Oncogene*. 1999, 18:1553-9.
35. 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.

36. Hering NA, Schulzke JD. Therapeutic options to modulate barrier defects in inflammatory bowel disease. *Dig Dis*. 2009; 27:450-4.
37. Veres G, Baldassano RN, Mamula P. Infliximab therapy in children and adolescents with inflammatory bowel disease. *Drugs*. 2007; 67:1703-23.
38. 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.
39. Veres G, Baldassano RN, Mamula P. Infliximab therapy for pediatric Crohn's disease. *Expert Opin Biol Ther*. 2007; 7:1869-80.
40. Rosenstiel P, Agnholt J, Kelsen J, Medici V, Waetzig GH, Seegert D, Schreiber S. Differential modulation of p38 mitogen activated protein kinase and STAT3 signalling pathways by infliximab and etanercept in intestinal T cells from patients with Crohn's disease. *Gut*. 2005; 54:314-5.
41. Van den Brande JM, Braat H, van den Brink GR, Versteeg HH, Bauer CA, Hoedemaeker I, van Montfrans C, Hommes DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2003; 124:1774-85.
42. Scallon B, Cai A, Solowski N, Rosenberg A, Song XY, Shealy D, Wagner C. Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002; 301:418-26.
43. Waetzig GH, Seegert D, Rosenstiel P, Nikolaus S, Schreiber S. p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease. *J Immunol*. 2002; 168:5342-51.
44. Feng YJ, Li YY. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *J Dig Dis*. 2011; 12:327-32.
45. Thomas S, Baumgart DC. Targeting leukocyte migration and adhesion in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflammopharmacology*. 2012; 20:1-18.
46. Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science*. 2002; 296:1646-7.
47. Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*. 2002, 296:1634-5.

48. Reiner DJ, Ailion M, Thomas JH, Meyer BJ. *C. elegans* anaplastic lymphoma kinase ortholog SCD-2 controls dauer formation by modulating TGF- β signaling. *Curr Biol.* 2008; 18:1101-9.
49. Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. TGF- β signaling in fibrosis. *Growth Factors.* 2011; 29:196-202.
50. Fiocchi C. TGF- β /Smad signaling defects in inflammatory bowel disease: mechanisms and possible novel therapies for chronic inflammation. *J Clin Invest.* 2001; 108:523-6.
51. Di Sabatino A, Jackson CL, Pickard KM, Buckley M, Rovedatti L, Leakey NA, Picariello L, Cazzola P, Monteleone G, Tonelli F, Corazza GR, MacDonald TT, Pender SL. Transforming growth factor beta signalling and matrix metalloproteinases in the mucosa overlying Crohn's disease strictures. *Gut.* 2009; 58:777-89.
52. Samarakoon R, Higgins PJ. Integration of non-SMAD and SMAD signaling in TGF- β 1-induced plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression in vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost.* 2008; 100:976-83.
53. Leonardi A, Di Stefano A, Motterle L, Zavan B, Abatangelo G, Brun P. Transforming growth factor- β /Smad - signalling pathway and conjunctival remodelling in vernal keratoconjunctivitis. *Clin Exp Allergy.* 2011; 41:52-60.
54. Tran CM, Markova D, Smith HE, Susarla B, Ponnappan RK, Anderson DG, Symes A, Shapiro IM, Risbud MV. Regulation of CCN2/connective tissue growth factor expression in the nucleus pulposus of the intervertebral disc: role of Smad and activator protein 1 signaling. *Arthritis Rheum.* 2010; 62:1983-92.
55. IBD Working Group of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. Inflammatory bowel disease in children and adolescents: recommendations for diagnosis--the Porto criteria. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005; 41:1-7.
56. de Bie CI, Buderus S, Sandhu BK, de Ridder L, Paerregaard A, Veres G, Dias JA, Escher JC; and the EUROKIDS Porto IBD Working Group of ESPGHAN; Members of the EUROKIDS Porto IBD Working Group of ESPGHAN: J.C. Escher, L. de Ridder (Erasmus MC-Sophia Children's Hospital, Rotterdam, The Netherlands); J. Amil Dias, E. Trindade (Hospital S. João, Porto, Portugal); K. Bochenek, I. Lazowska (Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland); S. Buderus (St-Marien-Hospital, Bonn, Germany); Y. Bujanover (Edmond & Lily Safra Children's Hospital, Sheba Medical Centre, Tel Hashomer, Israel); S.K.F. Chong (Queen Mary's Hospital for Children, Surrey). Diagnostic Workup of Paediatric Patients With Inflammatory Bowel Disease in Europe:

- Results of a 5-Year Audit of the EUROKIDS Registry. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012; 54:374-80.
57. Gilbert S, Zhang R, Denson L, Moriggl R, Steinbrecher K, Shroyer N, Lin J, Han X. Enterocyte STAT5 promotes mucosal wound healing via suppression of myosin light chain kinase-mediated loss of barrier function and inflammation. *EMBO Mol Med.* 2012; 4:109-24.
58. Kurotani R, Okumura S, Matsubara T, Yokoyama U, Buckley JR, Tomita T, Kezuka K, Nagano T, Esposito D, Taylor TE, Gillette WK, Ishikawa Y, Abe H, Ward JM, Kimura S. Secretoglobin 3A2 suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis by transforming growth factor beta signaling down-regulation. *J Biol Chem.* 2011; 286:19682-92.
59. Latella G, Sferra R, Vetuschi A, Zanninelli G, D'Angelo A, Catitti V, Caprilli R, Gaudio E. Prevention of colonic fibrosis by *Boswellia* and *Scutellaria* extracts in rats with colitis induced by 2,4,5-trinitrobenzene sulphonic acid. *Eur J Clin Invest.* 2008; 38:410-20.