

Részletes szakmai beszámoló

A jelen pályázatunkban elvégzett kutatásaink szervesen kapcsolódtak a korábbi OTKA által támogatott vizsgálatainkhoz (46082), aminek a fő megállapítása az volt, hogy a kezeletlen- és kezelt coeliákiás gyermekek duodenális nyálkahártyájában a TLR2 és TLR4 expresszió fokozódott a kontrollokhöz képest. Sőt, a kezelt coeliákiás gyermekek duodenális nyálkahártyájában még fokozottabb TLR2 és TLR4 expresszió volt kimutatható. Ugyancsak igazoltuk, hogy a frissen diagnosztizált és a relapszusban lévő IBD-s gyermekek colon nyálkahártyájának gyulladásban lévő szakaszán szintén fokozódott a TLR2 és TLR4 expresszió. A colon nyálkahártya gyulladásban nem lévő szakaszán azonban, a TLR2 és TLR4 expresszió nem tért el a kontrolloktól sem a frissen diagnosztizált betegekben, sem relapszus esetén. Vizsgálataink alapján egyértelművé vált, hogy mind a coeliakia és az IBD patomechanizmusában a természetes immunválaszban megfigyelt eltéréseknek alapvető szerepe van.

Az elmúlt négy évben az OTKA támogatásával végzett vizsgálatainkban tovább folytattuk az immunmediált bélbetegségekben a természetes immunválasz további fontos tényezőinek vizsgálatát, elsősorban azt, hogy a TLR aktivációja révén milyen további, a természetes immunválaszban szerepet játszó faktorok aktivációja, vagy gátlása figyelhető meg a bélnyálkahártyából vett biopsziás mintákban, illetve, hogy azok mennyire mutatnak összefüggést a coeliakia, az IBD és az allergiás colitis aktivitásával. A természetes immunválasz elemzése mellett ezekben a betegségben elemeztük a keringő mononuclearis sejtek azon felszíni markereit is, amelyek a természetes és az adaptív immunitás aktivációját jelzik.

Vizsgálati eredményeink a bélnyálkahártyában

A hő sokk protein(HSP) 72 és a hypoxia indukált faktor 1 alpha (HIF-1 α) és a szérumban a glucokorticoide kináz(SGKI) expresszió vizsgálata coeliákiások vékonybél nyálkahártyájában

A HSP72 a toll-szerű receptoroknak (TLR) a ligandumai lehetnek, melyek a veleszületett immunrendszer védekező mechanizmusának kulcsfontosságú szereplői. A HSP72 immunregulációs hatását főleg azáltal fejtheti ki, hogy kötődhet az APC-k felszínén található TLR2 és TLR4-hez. Tizenhat kezeletlen és 10 kezelt coeliákiás gyermek vékonybél nyálkahártyájában vizsgálva a HSP 72 mRNS és protein expresszió fokozott volt mind a kezeletlen és a kezelt coeliákiásokban a kontrollokhöz képest, de a kezeltékben a HSP 72 expresszió mRNS és protein szinten egyaránt csökkenést mutatott a kezeletlenekhez képest. Lokalizációs vizsgálataink szerint a villus enterociták és a lamina propria immunsejtjei fokozott HSP72 pozitivitást mutattak. Feltételezzük, hogy a HSP72 fokozott expressziója védelmet jelent coeliákiában a gliadin okozta citotoxicitás tüneteinek enyhítésében. A HSP72, mint stresszorok hatására aktiválódó celluláris chaperon „vészjelként” szolgálhat a veleszületett immunrendszer sejtjei számára a károsodás elleni védelem beindításához.

A HIF-1 α meghatározó szerepet tölthet be az intesztinális epitélium barrier funkciójának fenntartásában. Fokozott HIF-1 α mRNS expressziót és emelkedett HIF-1 α fehérje szintet mutattunk ki a kezeletlen coeliákiás gyermekek duodenális mukózájában a kontrollokhöz

képest ($p < 0,05$). Ezzel egyidejűleg a kezeletlen gyermekekben a HIF-1 α a boholy enterocitáinak citoplazmatikus és a nukleáris régiójában egyaránt kimutatható volt, ami a molekula aktív állapotára utal. Kezeletlen coeliakiás gyermekek duodenumában a CD73 (ecto-5-prime nukleotidáz) és a multi drog rezisztencia gén 1 (MDR1) mRNS expressziója fokozódott a kontrollokhoz képest ($p < 0,01$, illetve $p < 0,05$). Ezek az eredmények egyrészt arra utalnak, hogy a fokozott HIF-1 α expresszió részt vesz a természetes immunválasz szignalizációs útján, másrészt fontos szerepet tölthet be a betegség patomechanizmusában, és barrier-protéktív funkciója révén hozzájárulhat a mukóza regenerációjához.

A kezeletlen coeliakiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában az SGK1 mRNS expresszió valamint az SGK1 és foszforilált-SGK1 (P-SGK1) fehérje szintek magasabbak voltak a kontrollokéhoz képest. Kezelt coeliakiásokban mind az SGK1 mRNS expresszió, mind az SGK1 és PSGK1 protein szintek alacsonyabbak voltak, mint a kezeletlenekben. Az SGK1 gátolja az apoptosist, így feltételezhető, hogy fokozott expressziója coeliakiában védelmet jelenthet a felszíni epithelialis sejtek fokozott pusztulásával szemben.

A Parkinson's disease 7 (PARK 7) expresszió vizsgálata coeliakiában

A PARK7 molekula, melynek jelenlétét neurodegeneratív betegségek és daganatos betegségek kapcsán is leírták, a hipoxia-indukálta faktor (HIF)-1 α aktivátora lehet, aminek fokozott expresszióját fentebb részletezett vizsgálatainkban kimutattuk kezeletlen coeliakiás gyermekekben. Mindezek mellett a PARK7 részt vehet az immunrendszer szabályozásában és az apoptózis regulációjában is, de jelen tudásunk szerint bélbetegségek kapcsán szerepét nem tanulmányozták. Ezért célul tűztük ki a PARK7 szerepének vizsgálatát a cöliákia patomechanizmusában.

Duodenum biopszia mintákat gyűjtöttünk 11 újonnan diagnosztizált coeliakiás gyermektől, 5 kezelt (gluténmentes diétát tartó) gyermektől és 10 kontrolltól. A PARK7 mRNS expresszióját valós idejű PCR-rel mértük meg. A PARK7 fehérje mennyiségi változásait western blot technikával határoztuk meg. A PARK7 szöveti lokalizációját immunfluoreszcens festési eljárással mutattuk ki. A PARK7 mRNS expressziója fokozódott, fehérje mennyisége szignifikánsan megnőtt a coeliakiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában a kontrollokhoz és a gluténmentes diétát tartó gyermekek duodenumához képest ($p < 0,03$). A PARK7 kimutatható módon jelen volt a duodenumban, részben az enteroendokrin sejtekben is. A PARK7 emelkedett szintje a coeliakiás betegek duodenum mukózájában arra utal, hogy szerepe lehet a coeliakia patomechanizmusában. Enteroendokrin sejtekben is megfigyelhető lokalizációja sejteti, hogy szabályozó, reguláló szerepe is lehet, ezáltal is befolyásolva a coeliakia patomechanizmusát. Vizsgálati eredményeink alapján felmerül annak a lehetősége, hogy a PARK7 befolyásolhatja a (HIF)-1 α és a TLR4 által mediált folyamatokat, vagyis így szerepet játszhat az epithelialis integritás és az immun homeostasis fenntartásában.

A PPAR- γ és a TSLP szerepének vizsgálata gyermekkori coeliakiában és gyulladásos bélbetegségben

A peroxisoma proliferációt aktiváló receptor gamma (PPAR- γ) gyulladásgátló és cytoprotektív szerepét számos betegségben kimutatták. Ezen túlmenően a PPAR- γ agonista gátolta a thymus stromalis lymphopoetin (TSLP) indukált dendritikus sejtéretést, ami a PPAR- γ TSLP által stimulált folyamatokban betöltött szupresszív hatására utal. Mivel a PPAR- γ és a TSLP szerepe gastrointestinalis betegségekben még nem tisztázott, célul tűztük ki vizsgálatukat a coeliakia patomechanizmusában.

Coeliakia

Duodenum biopszia mintákat gyűjtöttünk 19 újonnan diagnosztizált coeliakiás gyermektől, 5 kezelt (gluténmentes diétát tartó) gyermektől és 10 kontrolltól. A PPAR- γ és a TSLP mRNS expresszióját valós idejű PCR-rel mértük meg. A fehérjék mennyiségi változásait western-blot technikával határoztuk meg, szöveti lokalizációját immunperoxidáz festési eljárással mutattuk ki. A coeliakiás gyermekek duodenumának mucosájában a PPAR- γ mRNS expressziója és fehérje szintje is csökkent, ezzel egyidőben a TSLP expressziója szignifikánsan nőtt a kontrollhoz képest ($p < 0,05$). A kontrollok duodenalis mucosájában az immunsejtek pozitívan festődtek PPAR- γ -ra, de a pozitív sejtek száma csökkenést mutatott a frissen diagnosztizált coeliakiás gyermekekben.

Glutenmentes diétán a lamina propria-ban a pozitívan festődő sejtek száma emelkedett és nem csak a lamina propria immunsejtjeiben volt kimutatható, hanem néhány epithelialis sejt nuclearis régiójában is. A kezeltlen coeliakiások enterocytáiban és a lamina propria immunsejtjeiben erős TSLP pozitivitás volt észlelhető és ugyancsak fokozott expresszió volt megfigyelhető az intraepithelialis lymphocytákban. Glutenmentes diétát tartó coeliakiásokban és a kontrollokban a TSLP sokkal kisebb mértékű volt a peroxidáz festéssel. Összhangban az immunperoxidáz festéssel a gluténmentes diétát követően a PPAR- γ mRNS expressziója és fehérje mennyisége jelentősen emelkedett, míg a TSLP esetében csökkent ($p < 0,05$). Az újonnan diagnosztizált coeliakiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában csökkent PPAR- γ , és az egyidejűleg megnövekedett TSLP mennyisége arra utal, hogy szerepet játszhatnak a coeliakia patomechanizmusában. Feltételezésünk szerint a PPAR- γ a TSLP által stimulált gyulladási folyamatok inhibitora lehet. *Eddig ezek a vizsgálatok csak absztrakt formában jelentek meg, a dolgozat azonban elkészült és most kerül benyújtásra a Virchows Archive című lapba.*

IBD

Tizenöt gyulladási bélbetegségben (10 Crohn beteg, 5 colitis ulcerosás) beteg gyulladt és ép colon nyálkahártyájában vizsgáltuk PPAR γ fehérje és mRNS expressziót. A mRNS expresszió a betegek gyulladt nyálkahártyájában alacsonyabb mértékű volt, mint a kontrollokban. A nem gyulladt nyálkahártya részekből vett biopsziás mintákban is a PPAR γ expresszió mértéke kisebb volt. Érdekes módon a PPAR γ fehérje expresszióban nem volt eltérés a kontrollok és a betegek között. Ezekből az eredményekből közlemény még nem jelent meg.

Az intesztinalis alkalikus foszfatáz (iAP) vizsgálata

IBD

Az iAP fontos szerepet játszik a bél barrierintegritásának megőrzésében. Az iAP megköti a lipopoliszacharidot (LPS), a Toll-like receptor 4 (TLR4) ligandját és semlegesíti aktivitását. Az iAP-fehérjeszinteket Western-blottal határoztuk meg 15 újonnan diagnosztizált IBD-s gyermek gyulladt és nem-gyulladt colonbiopsziás mintájában, 10 egészséges gyermek kontroll mintájával összehasonlítva. Ezen kívül az iAP-TLR4 ko-lokalizációt vizsgáltuk ezekben a betegcsoportokban. Az iAP-fehérjeszintek az UC-s gyerekek gyulladt bélszakaszában 22%-kal, a Crohn beteg gyermekekben 20%-kal csökkentek az egészséges kontrollok mintáihoz viszonyítva. A Crohn betegek gyulladt bélszakaszában 24%-os fehérjeszint-csökkenést tapasztaltunk a nem-gyulladt területhez viszonyítva. Az immunfluoreszcens festés mindhárom csoportban igazolta az iAP és a TLR4 epithelialis kompartmenten belüli ko-lokalizációját. Vizsgálataink szerint az IBD-s gyermekek gyulladt

colon mucosájában az iAP-szint csökkent. Ez a változás magasabb TLR4-expresszióval és fokozott LPS-aktivitással járhat, amely a gyulladásos folyamatot erősítheti.

Coeliakia

Coeliakiás betegekben is vizsgáltuk az iAP enzim expresszióját kezeletlen (n=10) és kezelt (n=5) coeliakiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában és az eredményeket a kontrollokéval (n = 10) hasonlítottuk össze. A frissen diagnosztizált coeliakiásokban az iAP protein szint szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontrollokban, míg glutenmentes diétán már nem tért el azokétól. Korábban igazoltuk, hogy coeliakiásokban jelentősen emelkedik a TLR 4 receptor expresszió. Így figyelembe véve, hogy az iAP fontos funkciója az LPS detoxikálása, a csökkent intestinalis alkalikus foszfatáz és a Toll-like receptor-4 fehérje expresszió emelkedése következményesen fokozott lipopoliszacharid-aktivitással járhat, amely a szövetkárosító folyamatokat erősítheti. Elképzelhetőnek tartjuk, hogy az iAP alacsony szintje coeliakiásokban szerepet játszhat a csökkent intestinalis barrier kialakulásában. Az iAP csökkent szintje és a magasabb TLR4-expresszió által a mucosa kevésbé lesz ellenálló a bakteriális LPS-sel szemben

Vizsgálati eredmények a perifériás vérben

Vizsgálataink másik csoportjában célul tűztük ki, hogy meghatározzuk immunmediált bélbetegségekben szenvedő gyermekek keringő lymphocytáinak immunfenotípusát, és elemeztük, hogy miként változik ezeknek a sejteknek a száma klinikai remisszió esetén. A veleszületett és szerzett immunitás sejtselemeinek prevalenciáját áramlási citométerrel határoztuk meg. A Th1 és Th2, a naiv és memoria sejtek, a természetes killer (NK), az NK-T, a myeloid és plasmacytoid dendritikus sejtek száma, valamint a monocyták és a TLR2 és TLR4 expressziót mutató sejtek számát határoztuk meg.

Coeliakia

Tíz beteg gyermektől perifériás vérmintát vettünk a diagnózis pillanatában, valamint a klinikai és laborparaméterek javulásakor a gluténmentes kezelés után. Tizenöt egészséges, funkcionális hasfájással jelentkező gyermeket vizsgáltunk kontrollként. Az újonnan diagnosztizált coeliakiás gyerekekben a periférián alacsonyabb CD4, Th1, természetes ölősejt (NK), NK-T, és invariáns NK-T sejt prevalenciát, valamint magasabb aktivált CD4, mieloid dendritikus sejt (mieloid DC), TLR 2 és TLR4 expressziót találtunk a DC és monocita sejteken az egészségesekhez képest. A coeliakia klinikai javulásával az eltérések többsége normalizálódott, míg az NK és NKT sejtek prevalenciája alacsonyabb, a DC és TLR-2 pozitív DC és monocitáké magasabb maradt a normál értékekhez képest. A gyermekkori coeliakiás betegek immunfenotípusa mind a veleszületett, mind a szerzett immunitás fokozott aktivációját mutatja. A szerzett immunitás zavara a kezeletlen betegekben a gluténmentes diéta hatására normalizálódik, de a veleszületett immunitás eltérései továbbra is fennállhatnak. Az eredmények alátámasztják, hogy a veleszületett immunitásnak fontos szerepe van a coeliakia patomechanizmusában.

Crohn betegség

Crohn betegek perifériás vérében is elemeztük a lymphocyta szubpopulációk megoszlását. Aktív betegségben a Th1 sejtek aránya csökkent, viszont az aktivált lymphocyták és a memóriasejtek aránya növekedést mutatott. A TLR2 és TLR4 pozitív dendritikus sejtek száma növekedést mutatott a még kezelésben nem részesült Crohn betegek perifériás vérében.

Remisszióban a lymphocyta szubpopulációk aránya nem mutatott eltérést a kontrollokhöz képest. Infliximab kezelés mellett a FoxP3+Treg sejtek száma emelkedést mutatott.

Az immunfenotípus remisszióban történő normalizálódása arra utal, hogy az immunfenotípus és a betegség aktivitása között kapcsolat van. A vizsgálati eredmények egyúttal azt is igazolják, hogy a gyermekkori Crohn betegségben a veleszületett és adaptív immunitás változásai egyaránt kimutathatóak.

Allergiás colitis

Tíz allergiás colitisben (AC) szenvedő csecsemőben a keringő aktivált CD4+CD25+ sejtek és a FoxP3+ regulátoros T-sejtek száma alacsonyabb volt mint a 10 egészséges kontrolban. AC-ben a naiv (CD45RA+) és a memória sejtek (CD45RO+) aránya magasabb volt a kontrollokhöz képest. Ezek az eltérések azonban már nem voltak kimutathatóak az aminosav keverék tartalmú tápszerrel kezeltékben a tünetek megszűnésekor.

Klinikai vizsgálatok allergiás colitisben

Összesen 31 anyatejjel táplált AC-ben szenvedő csecsemőt vizsgáltunk (átlagos életkor 17,4 hét). Vashiány, a perifériás eosinophil sejtek számának növekedése és a thrombocytosis előfordulása szignifikánsan gyakoribb volt a betegekben a kontrollokhöz képest. A colonoscopia során a betegek 83 %-ában lymphonodularis hyperplasia és aftás ulceratio volt kimutatható a colonban. Aminosav keveréket tartalmazó formula adása mellett a rectalis vérzés gyorsabban szűnt meg, mint az anyatejes táplálás folytatása mellett (átlag 1,4 hét vs 5,3 hét)