

Az interleukin-24 (IL-24) szerepének vizsgálata gyulladásos bélbetegségben

Doktori értekezés

Dr. Ónody Anna

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



- Témavezető: Dr. Vannay Ádám, Ph.D., tudományos főmunkatárs
- Hivatalos bírálók: Dr. Harangi Ferenc, Ph.D., Med. habil, főorvos
Dr. Lőrincz Kende, Ph.D., egyetemi adjunktus, főorvos
- Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Fekete György, DSc, az MTA doktora, egyetemi tanár
- Szigorlati bizottság tagjai: Prof. Dr. Szabó László, DSc, az MTA doktora, oktatási igazgató
Dr. Zsembery Ákos, Ph.D., tanszékvezető egyetemi docens
Dr. Major János, Ph.D., adjunktus

Budapest

2022.

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	8
1.1. Gyulladásos bélbetegség fő megjelenési formái.....	8
1.2. A gyulladásos bélbetegség epidemiológiája	9
1.3. A gyulladásos bélbetegség patogenezise	10
1.3.1. Genetikai tényezők szerepe a gyulladásos bélbetegség kialakulásában.....	11
1.3.2. Környezeti tényezők szerepe a gyulladásos bélbetegség kialakulásában.....	13
1.3.3. Az immunrendszer szerepe a gyulladásos bélbetegség kialakulásában	14
1.3.4. Szöveti átrendeződés mechanizmusa a gyulladásos bélbetegségben	16
1.3.5. Interleukinok szerepe a gyulladásos bélbetegségben	18
1.3.6. TNF- α szerepe a gyulladásos bélbetegségben.....	20
1.3.7. TGF- β szerepe a gyulladásos bélbetegségben.....	20
1.3.8. PDGF-B szerepe a gyulladásos bélbetegségben.....	21
1.3.9. A mátrix metalloproteinázok (MMP) szerepe a gyulladásos bélbetegségben	21
1.4. A gyulladásos bélbetegség klinikai tünetei.....	23
1.4.1. A Crohn-betegség klinikai képe	23
1.4.2. A colitis ulcerosa klinikai képe	24
1.5. A gyulladásos bélbetegség diagnózisa.....	25
1.6. A gyulladásos bélbetegség terápiája	25
1.7. A gyulladásos bélbetegség szövődményei.....	26
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	28
3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK.....	29
3.1. IBD-s beteganyag és kontroll csoportja.....	29
3.1.2. Vastagbél biopszia minták.....	29
3.1.3. Szérum minták.....	30

3.2. Állatmodell és kezelési protokollok	31
3.2.1. Intracolónális IL-24 injektálás.....	31
3.2.2. DSS indukálta colitises egérmodell.....	31
3.3. Sejtvonalak.....	32
3.3.1. HT-29 colon és HK-2 proximális tubulus epitél sejt kultúra és kezelések.....	32
3.3.2. A CCD-18Co colon fibroblaszt sejt kultúra és kezelésük	33
3.3.2. Perifériás vérben keringő mononukleáris sejtek (PBMC).....	33
3.3.4. Lamina propria mononukleáris sejtek (LPMC).....	34
3.4. Annexin V/ propidium jodid (PI) festés	35
3.5. Fibroblaszt migrációs vizsgálat.....	35
3.6. MTT sejtproliferációs vizsgálat	35
3.7. SiriusRed kollagén detekciós eljárás	36
3.8. Laktát-dehidrogenáz (LDH) cytotoxicitás vizsgálat.....	36
3.9. Immunfluoreszcens festés.....	36
3.10. RNS izolálás, cDNS szintézis és PCR.....	37
3.11. Enzimhez-kötött ellenanyag-vizsgálat (ELISA).....	39
3.12. Áramlási citometria (FACS).....	40
3.13. Fehérje izolálás és Western blot	40
3.14. Statisztikai analízis	41
4. EREDMÉNYEK.....	43
4.2. Az IL-24 és receptorának vizsgálata DSS indukált colitisben.....	45
4.3. Gyulladásos faktorok hatása a mononukleáris sejtek (PBMC és LPMC) IL-24 ..46 szintézisére.....	46
4.4. Az IL-24 hatásának vizsgálata a HT-29 colon és a HK-2 vese epitél sejteken ...47	47
4.5. Az IL-24 hatás vizsgálata a CCD-18Co colon fibroblaszt sejteken	50
4.6. Az IL-24 hatása a szöveti átrendeződésben szerepet játszó különböző faktorokra vad típusú egerek colon nyálkahártyájában	54

4.7. Vad típusú és Il20rb KO egerek testsúlyának és betegség aktivitási indexének változása DSS kezelés mellett	56
4.8. A szöveti átépülésben szerepet játszó faktorok vizsgálata a DSS kezelt WT, illetve Il20rb KO egerek vastagbél nyálkahártyájában	57
5. MEGBESZÉLÉS	59
6. KÖVETKEZTETÉSEK.....	64
7. ÖSSZEFOGLALÁS	65
8. SUMMARY.....	67
9. IRODALOMJEGYZÉK	69
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	87
10.1. Az értekezés témájában megjelent eredeti, nemzetközi publikációk.....	87
10.2. Egyéb, nem az értekezés témájában megjelent, eredeti, nemzetközi publikációk	87
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	88

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADA	Adalimumab
ANCA	Anti-neutrophil cytoplazmatikus antitest
APC	Antigén prezentáló sejt
AR	Autoszomális recesszív
ASCA	Anti-saccharomyces cerevisiae antitest
ATG16L1	Autofágia-kapcsolt fehérje 16-L1
bp	Bázispár
CARD	Kaspáz toborzó domén
CD	Crohn-betegség
CDH1	e-kadherin
CRC	Colorectalis carcinoma
CRP	C-reaktív protein
CSF	Koloniastimuláló faktor
DAI	Betegség aktivitási index
DC	Dendritikus sejtek
DMEM	Dulbecco's módosított sejtmédium
DSS	Dextrán nátrium szulfát
ECM	Extracelluláris mátrix
EEN	Kizárólagos enterális táplálás
EGF	Epidermális növekedési faktor
EGTA	Glikol-bisz(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraecetsav
ELISA	Enzimhez-kötött ellenanyag-vizsgálat
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ESPGHAN	Európai Gyermek-gasztroenterológiai, Hepatológiai és Táplálkozástudományi Társaság
FACS	Áramlási cytometria
FBS	Fötális borjú szérum
GAG	Glükózaminoglikánok
GALT	Bél-asszociált limfoid szövet
GAPDH	Glicerín-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GWAS	Teljes genom asszociációs vizsgálat

H ₂ O ₂	Hidrogén-peroxid
H ₂ SO ₄	Kénsav
HK-2	Humán vese proximális tubulus epitél sejt
HT-29	Humán colon epitél sejt
HUPIR	Magyar Gyermek Gyulladásos Bélbetegség Regiszter
IBD	Gyulladásos bélbetegség
IBD-U	Nem klasszifikálható gyulladásos bélbetegség
IEC	Intesztinális epitél sejt
IFN	Interferon
IFX	infliximab
IGF	Insulin-szerű növekedési faktor család
IL	Interleukin
IL-20RA/B	Interleukin 20 receptor α/β
IRGM	Immunity-related GTP-áz család M-fehérje
JAK-STAT	Janus kinase/signal transducers and activators of transcription
JNK	c-Jun N-terminalis kináz
KO	Génkiütött
LAMB1	Laminin alegység- β 1
LDH	Laktát-dehidrogenáz
LPMC	Lamina propria mononukleáris sejt
LPS	Lipopoliszacharid
MAPK	Mitogen aktivált protein kináz
MHC	Fő hisztokompatibilitási komplex
MUC	Nyák- és glikoprotein termelést szabályozó mucin
MMP	Mátrix metalloproteináz
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
NOD	Nukleotid-kötő oligomerizációs domén
NSAID	Nem-szteroid gyulladáscsökkentő
PBMC	Perifériás vérben keringő mononukleáris sejt
PBS	Foszfátpufferelt sóoldat
PCDAI	Gyermekkori Crohn-betegség aktivitási index
PDGF	Vérlemezke eredetű növekedési faktor
PG	Proteoglikánok

PI	Propidium jodid
PI3K	Foszfatidilinozitol-3-kináz
PMSF	Fenil-metil-szulfonil-fluorid
PUCAI	Gyermekkori colitis ulcerosa aktivitási index
RT-PCR	Valós idejű reverz transzkripció-polimeráz láncreakció
SDS	Nátrium dodecil-szulfát
SMAD	Sma and Mad Related Family
SNP	Egy pontos nukleotid polimorfizmus
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Ta	Anellációs hőmérséklet
TCR	T-sejt receptor
TGF- β	Transzformációs növekedési faktor- β
Th	Helper T-sejtek
TIMP	Mátrix metalloproteináz szöveti inhibitor
Tjs	sejtkapcsoló struktúrák
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	Tumor nekrosis faktor-alfa
Treg	Regulátoros T-sejtek
TUKEB	Tudományos és Kutatásetikai Bizottság
UC	Colitis Ulcerosa
UUO	Unilaterális ureter obstrukció
WT	Vad típusú
α -SMA	α -simazom-aktin

1. BEVEZETÉS

1.1. Gyulladásos bélbetegség fő megjelenési formái

A gyulladásos bélbetegség (inflammatory bowel disease - IBD) két fő megjelenési formája a Crohn-betegség (Crohn's disease - CD), illetve a colitis ulcerosa (ulcerative colitis - UC). Mindkettő multifaktoriális kórkép, melyekben genetikai hajlam, illetve környezeti tényezők hatására a bélrendszer krónikus gyulladása alakul ki. A pontos patomechanizmusa azonban máig sem tisztázott. A két fő típuson (CD és UC) kívül megkülönböztetjük az indeterminált, atípusos, egyértelműen nem besorolható vastagbélgyulladást (IBD-U). Az ESPHGAN (Európai Gyermekek-gasztroenterológiai, Hepatológiai és Táplálkozástudományi Társaság) Portói munkacsoport 2015-ös adatai alapján a beteg gyermekek 5,6 %-a került az IBD-U csoportba [1]. Külön entitásként tartjuk számon a hatéves kor előtt manifesztálódó, gyakran monogénes, autoszomális recesszív (AR) módon öröklődő úgynevezett igen korai kezdetű IBD-t (very early onset IBD).

Míg az IBD a 20. század elején ritka betegségnek számított, a 20. század közepétől gyors ütemben nőtt az előfordulása, az elmúlt években pedig a változások még erőteljesebbek lettek.

Egy mintegy 195 országot felölelő tanulmány szerint 2017-ben nagyságrendileg 6,8 millió ember volt érintett IBD-ben, a betegség életkorra standardizált prevalenciája 84,3 (79,2-89,9) eset volt 100 000 lakosra vetítve [2]. Az IBD leggyakrabban a fiatal felnőttkorban indul, de az elmúlt évek vizsgálatai alapján az esetek 15-30%-ban már gyermekkorban elkezdődik [3, 4]. Manapság a rheumathoid arthritis után a második leggyakoribb krónikus gyulladással járó kórkép, a nyugati országok népességének mintegy 0,5 %-a szenved IBD-ben [4, 5].

A fő tünetek gyermek és felnőttkorban lényegileg azonosak. Gyermekek esetén a betegség általában gyorsabban progrediál, valamint kiterjedtebb és súlyosabb bélérintettséggel jár [6]. Az életkorból adódó hosszabb betegségfolyás és a sokszor súlyosabb tünetek miatt a gyermekkori IBD nagyobb közegészségügyi problémát jelent. A fentiek alapján a gyermekkori IBD vizsgálata, a kialakulást elősegítő további tényezők feltárása, a patomechanizmus pontosabb megértése, illetve a hatékony, oki terápia biztosítása kiemelt jelentőségű.

1.2. A gyulladásos bélbetegség epidemiológiája

Az epidemiológia egy adott betegség incidenciáját, prevalenciáját és a betegségre ható demográfiai tényezőket vizsgálja. A demográfiai tényezőkhez tartozik az életkori, a férfi és női arány, illetve a rasszok közötti megoszlás.

Az elmúlt fél évszázadban világszerte kifejezett változások figyelhetők meg, míg korábban az IBD döntően az iparilag fejlettebb országokban fordult elő, manapság ez a megállapítás már nem állja meg a helyét, elindult egyfajta kiegyenlítődés. A korábbi magas incidenciájú területeken a növekedés stagnált, vagy lassult, míg az addig alacsonyabb incidenciájú területeken kifejezetten emelkedett az IBD incidenciája. Megfigyelhető, hogy az UC incidencia növekedés általában 15-20 évvel előzi meg a CD-ét. A prevalencia a nyugati országokban még mindig magasabb, de a kelet és nyugat közötti különbség kezd eltűnni [7]. Leggyakrabban fiatal felnőttkorban kezdődik a betegség, de változást látunk az induló életkorban is, egyre több a gyermekkori, illetve az idősebb korban kezdődő eset. A nemek tekintetében a CD-ben a női, az UC-ban férfi dominancia figyelhető meg.

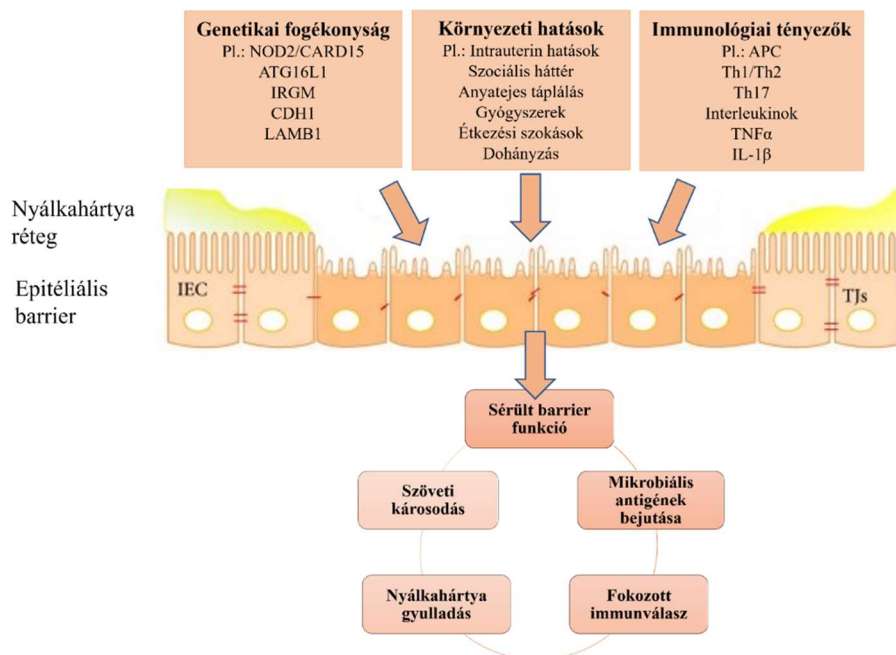
Az etnikai különbségek tekintetében feltételezik, hogy azokért inkább az életmódbeli, semmint a genetikai különbségek a felelősek [6, 8]. Az elmúlt húsz évben az Amerikai Egyesült Államokban a CD incidenciája 3/100 000 -ről 14/100 000-re nőtt, míg az UC gyakorisága 2/100 000-ről 14-15/100 000-re változott. Európában a CD incidenciája 0,5-10,6/100 000, míg az UC incidenciája 0,9-24,3/100 000 között mozog. Európán belül az incidencia magasabbnak mutatkozott az északi országokban (6,3/100 000 CD-ben és 11,4/100 000 UC-ben) és az Egyesült Királyságban, míg alacsonyabb volt a kelet- és dél-európai országokban (3,6/100 000 CD-ben és 8,0/100 000 UC-ben) [6, 9].

Magyarországon az elmúlt évtizedekben három jelentős epidemiológiai felmérés történt. Az egyik retrospektív vizsgálat Borsod-Abaúj-Zemplén megyében, 30 éven át (1963-1992), mintegy 800 000 fős populációban történt. A vizsgált időszakban UC-ben 3,1-ről 3,6, CD-ben pedig 0,43-ről 1,0/100 000 főre emelkedett a betegség incidenciája a felnőtt lakosság körében [10]. A másik tanulmány Veszprém megyében mintegy 380 000 fő bevonásával készült. Az 1977-től 2001-ig végzett prospektív vizsgálat során gyorsan emelkedett mindkét betegség előfordulása. A CD és az UC incidenciája 0,41 főről 4,68, illetve 1,66-ről 11,01/100 000 főre emelkedett [11]. A Magyar Gasztroenterológiai Társaság megbízásából Magyarországon 2007. január elsejétől érhető el az első, hiánypótló, az egész országot felölelő IBD regiszter, a Magyar Gyermek Gyulladásos

Bélbetegség Regiszter (HUPIR), melyben 27 magyarországi gasztroenterológiai központ vesz részt. A vizsgálatba minden frissen diagnosztizált, 18 év alatti IBD-s gyermek adatai rögzítésre kerülnek. A regiszter 3 éves adatai (2007. január 1. - 2009. december 31.) 420 beteget öleltek fel, melyben az IBD incidenciája 7,48/100000 volt, ami nemzetközi összehasonlításban a középmezőnyben foglalt helyet. A vizsgált gyermekek közel kétharmada szenved CD-ben, a CD incidenciája (4,72/100000) nagyjából kétszerese a CU-nak (2,32/100000), amelyek korrerálnak a nemzetközi értékekkel [12]. 2014-ben Magyarországon a gyermekkori IBD incidenciája 8,7/100000-re nőtt a regiszter adatai alapján [13].

1.3. A gyulladáisos bélbetegség patogeneze

A gyulladáisos bélbetegség kóreredete - mint általában a krónikus, élethosszig tartó betegségeké – nem ismert pontosan, azonban az ismeretanyag folyamatosan bővül, egyre több hajlamosító tényezőről tudunk. Multifaktoriális kórképnek tekintjük, tehát a betegség kialakulásában genetikai, immunológiai és környezeti tényezők egyaránt szerepet játszanak (1. ábra). Feltehetően akkor jön létre az IBD-re jellemző, kóros, kontrollálatlan immunrendszeri aktiváció, ha az egyén genetikai fogékonysága mellett megjelennek a különböző hajlamosító környezeti hatások is. Ekkor az immunrendszer aktivációja a bélrendszer krónikus gyulladásához vezet, és kialakulnak a betegségre jellemző klinikai tünetek [6].



1. ábra: Az IBD patomechanizmusának sematikus összefoglalása. Az IBD kialakulását elősegítő fontosabb genetikai, környezeti és immunológiai faktorok összegzése.

Rövidítések: NOD - Nukleotid-kötő oligomerizációs domén, CARD - caspase recruitment domain, ATG16L1- autofágia-kapcsolt fehérje 16-L1, IRGM - Immunity-related GTP-áz család M-fehérje, CDH1 – e-cadherin, LAMB1 – Laminin alegység-β1, APC – antigén prezentáló sejt, Th - Thelper, TNF-α - tumor nekrozis faktor-α, IL-1β – interleukin-1β, IEC- intesztinális epitél sejt, Tjs - sejtkapcsoló struktúrák (saját ábra Abdel Hadi L és munkatársai alapján [14])

1.3.1. Genetikai tényezők szerepe a gyulladásos bélbetegség kialakulásában

Az IBD gyakran halmozódik a családokon belül, ami a genetikai predispozíció jelentőségére utal. Az IBD-ben az öröklődés poligénes jellegű, leszámítva a ritka monogénes eseteket [15]. Amennyiben a családban egy elsőfokú rokon beteg, úgy az IBD kialakulásának kockázata 5-10-szeres az átlag népességéhez képest [16]. A genetikai kutatások során az egy-, illetve kétpetéjű ikervizsgálatok kiemelt jelentőségűek. Egypetéjű ikrekben a CD együttes megjelenésének esélye 30-40%, az UC-é 6-14%. A konkordancia kétpetéjű ikrekben csökken, CD-ben 7%, UC-ben 3% az együttes előfordulás esélye [17]. A genetikai tényezők szerepe az előzőek alapján jelentősebb a

CD kialakulásában, mint UC-ben. Az ikerkutatások eredményei azonban arra is egyértelműen rávilágítanak, hogy a genetikai háttér jelentős szerepe mellett a környezeti faktoroknak is komoly hatása van a betegség megjelenésére [18].

A CD genetikájában a 16-os kromoszómán található NOD2/CARD15 gén (Nukleotid-kötő oligomerizációs domén-2/ kaspáz toborzó domén 15) szerepe kiemelkedő [19]. A NOD2 receptor a bakteriális lipopolysacharidok és proteoglikánok érzékelésében játszik szerepet, tehát a mikrobiális környezet érzékelője. A NOD2 három leggyakoribb polimorfizmusának (3020insC-SNP13, R701W-SNP8 és G908R-SNP12) megjelenése is összefüggésbe hozható a CD ileumban való megjelenésével, a fibrostenosisra való hajlammal és betegség korai kezdetével, míg a fistulosus és a colont érintő formáknál ritkább volt ezen polimorfizmusok előfordulása [6, 20]. A gén mutációi és bizonyos polimorfizmusai heterozigóta formában 1,5-4,3-szoros, homozigóta és compound heterozigóta formában viszont 17,6-44-szeresére növelik a CD kialakulásának esélyét [21]. Lakatos P.L. és munkatársai vizsgálatai alapján a betegség rizikója heterozigóta allélmutáció esetén 1,7-szeres, homozigóta formánál 25,2-szeres volt [22]. A teljes genomasszociációs vizsgálatok (Teljes genom asszociációs vizsgálat - GWAS) révén eddig több mint 240 génlókuszt azonosítottak, amelyek összefüggésbe hozhatók az IBD gyakoribb kialakulásával. A felfedezett mutációk többsége bakteriális, illetve táplálkozási antigének felismerésében részt vevő struktúrákkal kapcsolatosak. Az azonosított génlókusztok nagy része azonban egyéb immunmediált kórképek patomechanizmusában is kóroki szerepet játszik [23].

A NOD2 mellett a kaukázusi populációban a CD másik jól ismert genetikai rizikófaktora az ATG16L1 és az IRGM1 géneket érintő polimorfizmusok, illetve SNP-k (Egypontos nukleotid polimorfizmus), melyek hibás autofágias folyamatokhoz vezetnek [24]. Az autofágia mechanizmusa fontos szereppel bír az epiteliális homeosztázis fenntartásában és a szervezet a mikrobiális infekciók elleni védelmében [25].

A genetikai tényezők a bélfal permeabilitását is jelentősen befolyásolják, így például a CDH1 gén hibája – amely az e-kadherint kódolja és a sejtek egymáshoz való kapcsolódásáért felelős – is fokozza a CD rizikóját. Emellett számos további, barrier funkciót befolyásoló gén polimorfizmusa/mutációja ismert, mint például a nyák- és

glikoprotein termelést szabályozó mucin a (MUC)19 és a MUC3, vagy a sejtadhézióért felelős laminin alegység-béta (LAMB1) [26].

Az intenzíven folyó, napról napra több információt nyújtó genetikai kutatás alapvető pillér az IBD patogenezisének pontosabb megértésében, de az eredmények a környezeti és immunológiai tényezőkkel együttesen értelmezve vezethetnek a célzott kezelési lehetőségek bővítéséhez.

1.3.2. Környezeti tényezők szerepe a gyulladásoos bélbetegség kialakulásában

Számos kutatás vizsgálja az IBD és a környezeti tényezők kapcsolatát. Az IBD fejlődő országokban is folyamatosan emelkedő incidenciája a nyugati, városias életmód káros hatására hívja fel a figyelmet, hiszen a genetikai hatások nem okozhatnak ilyen gyors ütemű változást, mint amit az elmúlt időszakban tapasztalunk világszerte. A migráció elmosza az etnikai és rasszbeli különbségeket [27], ami szintén a környezeti hatások szerepére hívja fel a figyelmet. A városban élők között magasabb az IBD [28] gyakorisága, de a mögöttes ártalom nem tisztázott. Egyes vizsgálatok szerint az IBD fokozott gyakorisága összefügg a magasabb végzettséggel és jövedelemmel, a jobb szociális helyzettel és bizonyos foglalkozásokkal, mint például az irodai munka. Protektívnek tartják a több testvért, a nagy családot, az állatokkal való kora gyermekkori érintkezést [29-33].

Az intrauterin életben az anyai hatások, az anyai életkor, a világrajövetel módja, a születési súly, az Apgar érték is mind befolyásolja az IBD rizikóját. Az anyatejes táplálás fontos része a környezeti hatásoknak, a szoptatás időtartama is befolyásolja a protektív hatás erősségét. Az orális antikonceptívumok és az alacsony szérumban D-vitamin-szint fokozott rizikót jelentenek CD-re [34], ugyanakkor a D-vitamin szupplementáció csökkenti a relapszusok gyakoriságát IBD-ben [35]. A kora gyermekkorban átvészelt gastroenteritisnek illetve az antibiotikum kezelésnek is szerepe lehet az IBD etiológiájában, vélhetően a mikrobiomra gyakorolt hatásán keresztül [36]. A non-szteroid gyulladáscsökkentők (NSAID) tartós használata is fokozott rizikót képvisel [37, 38].

A magas zsír- és szénhidrát-tartalmú ételek, a fokozott cukorbevitel, a kevés rost fogyasztása, a csomagolt és gyorséttermi élelmiszerek, az emulgeálószerként használt carboxymethylcellulóz (E 466) és egyéb adalékanyagok, az antibiotikumok széleskörű és sokszor felesleges használata mind fokozzák az IBD kialakulásának rizikóját [34, 39]. Egyes kutatások szerint az UC kialakulásának valószínűségét csökkenti a 20 éves kor előtt végzett appendectomia [40, 41], ami ugyanakkor CD-ben rizikófaktornak számít [42]. A dohányzó populációban alacsonyabb az UC előfordulása, illetve gyakrabban fordul elő a betegség azoknál, akik nem dohányoznak, vagy ugyan korábban dohányoztak, de abbahagyták már. Továbbá a dohányzás elhagyása a beteg állapotának romlását eredményezte. Ezzel szemben CD-ben javul a betegek állapota, amennyiben abbahagyja a dohányzást. Tehát a dohányzás a betegség két csoportjában ellentétes hatású [43]. Egy prospektív kohort vizsgálat szerint a komoly fizikai aktivitás 44%-kal csökkenti a CD rizikóját [44]. Mint a multifaktoriális betegségek többségében, így az IBD kialakulásában is szerepet tulajdonítanak a stressznek, amely a bélpermeabilitás fokozásával ront az IBD-s betegek állapotán. A szupportív pszichoterápiára vonatkozó adatok azonban ellentmondásosak [45, 46].

Fentiek alapján elmondható, hogy a sokrétű kutatásoknak köszönhetően egyre több IBD-re ható környezeti faktort ismerünk meg, melyek feltehetően egymás hatását erősítik az adott szervezetben.

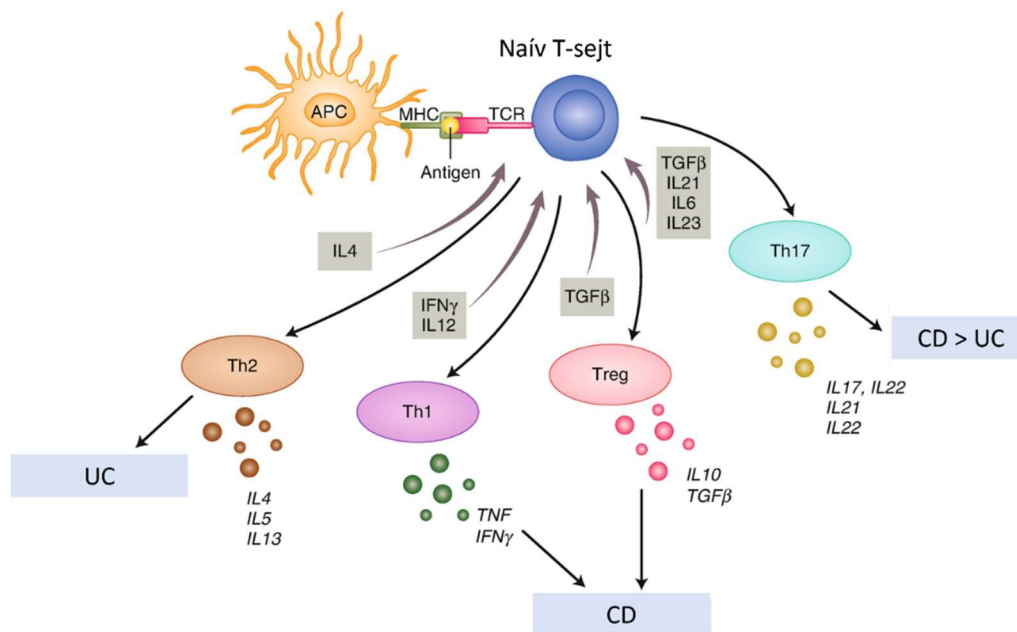
1.3.3. Az immunrendszer szerepe a gyulladásos bélbetegség kialakulásában

A bél (bél-asszociált limfoid szövet; GALT) a szervezet legnagyobb immunszerve. Az adaptív immunválasz mellett, a veleszületett immunrendszer is fontos szerepet tölt be az IBD patomechanizmusában. Élettani körülmények között a bélfalon nem jutnak át a baktériumok és termékeik. Azonban a különböző környezeti és genetikai faktorok hatására sérül a bélnyálkahártya barrier funkciója, így az a mikrobiális antigének számára áthatolhatóvá válik, és a lamina propria immunsejteinek aktivációját okozva gyulladást váltanak ki.

A veleszületett immunrendszer része az intesztinális barrier megtartott funkciója, az antibakteriális fehérjék (komplementek, defenzinek), a gyomor savas pH-ja, a sejtes elemek, mint a neutrofilek, a makrofágok, a dendritikus sejtek (DC), a természetes ölü sejtek és a különböző citokinek, mint például az IL-1 β vagy a TNF- α .

A DC/antigén prezentáló sejtek (APC) hemopoetikus csontvelő eredetű leukocyták, amelyek a különböző antigéneket a naív T-sejteknek mutatják be. Az APC az egyik legfőbb kapocs a veleszületett és az adaptív immunrendszer között. Az IL-23 termelésen keresztül stimulálják az adaptív immunválasz részét képező Thelper (Th)-17 sejteket, melyek CD-ben és UC-ben egyaránt aktiválódnak [47]. Felborul a Thelper és a regulátoros T- (Treg) sejtek aránya, ami miatt a pro- és anti-inflammatorikus citokinek egyensúlya is megbomlik [48]. CD-ben a Th-1 dominancia jellemző, az APC-k főként macrofágok, a citokinek közül az IL-2, -12, -23, TNF- α és interferon (IFN)- γ dominál. UC-t atípusos Th-2 dominancia jellemzi, a fő APC-k a B-sejtek, és jellemzően az IL-4, -5, -10, -13 termelődése fokozódik. Az elmúlt években a Th-9 és az IL-9 szerepét is leírták a betegség kialakulásában [23].

Legalább 30 különböző növekedési faktor szerepét írták le a bélnyálkahártya integritás fenntartásában, mint például az epidermális növekedési faktor (EGF) család, a transzformációs növekedési faktor- β (TGF- β) család, az insulin-szerű növekedési faktor család (IGF), illetve a koloniasztimuláló faktor (CSF) család. Ezek a szabályozó fehérjék részt vesznek a sejtproliferáció, sejt differenciálódás szabályozásában, az angiogenezis és a gyulladás modulálásában. Ezen folyamatok részletesebb megismerése újabb terápiás lehetőségeket jelenthet a jövőben [49]. A 2. ábrán az IBD-ben ismert fontosabb immunológiai tényezők sematikus összefoglalása látható.



2. ábra: Az IBD-ben ismert fontosabb immunológiai tényezők sematikus összefoglalása.

Rövidítések: APC- antigén prezentáló sejt, MHC – fő hisztokompatibilitási komplex, TCR – T-sejt receptor, TGF- β – transzformációs növekedési faktor- β , IL – interleukin, Th - T helper sejt, Treg – regulátoros T-sejt, TNF - tumor nekrozis faktor, IFN- γ – interferon- γ , CD – Crohn-betegség, UC – colitis ulcerosa (Steele SR. és munkatársai alapján [50]).

1.3.4. Szöveti átrendeződés mechanizmusa a gyulladásos bélbetegségben

A szöveti átrendeződés egy adott szövet strukturális átépülését jelenti, melynek két csoportját különböztetjük meg. Az egyik csoportba tartozó átépülési folyamatok az embriogenezis során fordulnak elő, ezek során megváltozik az adott szövet funkciója, de az nem egy külső noxa hatására történik, fiziológiás eseménynek tekintjük. A másik csoport a kóros szöveti átépülés, amelyet betegség vagy sérülés során látunk, tehát külső ingerek provokálják. Ilyen inger a gyulladás, a fertőzés, az autoimmun reakció, különböző toxinok, sugárzás vagy mechanikai ártalmak, amelyek szövetkárosodással járnak. Általánosságban elmondható, hogy a károsodás kapcsán gyulladásos mediátorok szabadulnak fel, az erek dilatálnak, fokozódik az átérésztőképességük, és a fibroblasztok aktiválódnak [51, 52].

Az epitéliális barrieren keresztül fiziológias körülmények között nem jutnak át sem a baktériumok, sem termékeik. IBD-ben károsodnak és fellazulnak az epitél sejtek közötti szoros réskapcsolatok, így fokozódik a permeabilitás [53, 54], amely különböző antigének fokozott felvételéhez, krónikus gyulladáshoz és szöveti átrendeződéshez vezet.

A fibroblaszt sejtek az egészséges bélszövetben is folyamatosan jelen vannak, szerepük fiziológias körülmények között is a folyamatos mechanikai, biológiai és kémiai stressznek kitett bélnyálkahártya regenerációjának elősegítése a bazális membrán integritásának fentartása révén [55]. A fibroblasztoknak a krónikus gyulladás okozta szöveti átrendeződésben is kiemelt szerepük van. Eredetükre a bélrendszerre vonatkozóan több elmélet is létezik [56, 57], de a legvalószínűbb a nyugvó állapotú, subepitéliális fibroblasztokból való eredet, melyek aktiválódását különböző profibrotikus (TGF- β , PDGF) faktorok indukálják [58-61]. Az aktivált fibroblasztok fokozott proliferációs és migrációs készségének köszönhetően, a sérülés helyén felszaporodva, nagy mennyiségű extracelluláris mátrix (ECM) komponens termelve igyekeznek helyreállítani a megbomlott szöveti struktúrát.

Az ECM összetevői 4 csoportra oszthatók: 1. kollagén fehérjék (kollagén-1, bazális membrán kollagének, mint a kollagén-4, -8, -10, 4-es típusú mikrofibrilláris kollagének) 2. nem kollagén fehérjék (elasztin, fibronektin, laminin, thrombospondin, tenascin) 3. proteoglikánok (PG) és glükózaminoglikánok (GAG) 4. különböző növekedési faktorok és enzimek. Utóbbi csoportba tartoznak a MMP-k, illetve TIMP-ek (Mátrix metalloproteináz szöveti inhibitor), melyek az ECM átépülés kulcsenzimei [62]. Az ECM minden szervben egy dinamikusan változó struktúra, melyet folyamatos, kontrollált átépülés jellemez. Alkotóelemei a fiziológias szöveti felépítés megtartása céljából állandó mennyiségi és minőségi változáson mennek át. Krónikus gyulladás során ez a fiziológias egyensúly megbomlik.

Az aktivált fibroblasztok α -simazom-aktin (α -SMA) sejtvázkötő komponensüknek köszönhetően erőteljes kontrakcióra képesek. Abban az esetben, ha a fibroblasztok aktivációját kiváltó faktorok tartósan jelen vannak az adott szövetben (pl. krónikus gyulladás esetén), felborul a kötőszövet felépülése és bontása közti kényes egyensúly [63], hegszövet alakul ki, amely a szerv funkciójának csökkenéséhez, vagy annak elvesztéséhez vezet [59]. A heggesedés olyan súlyos szövődeményeket rejt magában, mint a bélfal megvastagodása, a lumen szűkülete, a bélelzáródás, a perforáció és a fisztula képződés, ami az esetek nagy részében műtéti indikációt jelent. A Crohn-betegségben

szenvedők több mint 70%-a élete során legalább egyszer sebészeti beavatkozáson esik át [2]. Fibrózis során UC-ban a mucosa és submucosa vastagszik meg, míg a CD-ben az egész vékony- vagy vastagbél fal érintett, beleértve a muscularis propriat és a serosa rétegét is [54].

1.3.5. Interleukinok szerepe a gyulladásos bélbetegségben

Az interleukinokat először a fehérvérsejtekben történő expressziójuk kapcsán írtak le, szerkezetük alapján négy nagy csoportra oszthatók: IL-1-szerű citokinek, I. osztályú helikális citokinek, II. osztályú helikális citokinek, IL-17-szerű citokinek. Ezen túlmenően van olyan interleukin is, amely a fenti csoportok egyikébe sem illik, mert egyedül a szerkezete, vagy mert még nem ismerjük a pontos felépítését [64].

Az IBD patomechanizmusában számos interleukin játszik fontos szerepet, melyek körül intenzív kutatások zajlanak. Az IBD-ben a megváltozott bélflóra, illetve a különböző antigének mintázatfelismerő receptorokat, például toll-like receptorokat (TLR) aktiválnak, amelyek a DC-k fokozott IL-1 β , IL-6 és TNF- α termeléséhez vezetnek, hozzájárulva a T-sejtek differenciációjához [65, 66].

Ismeretes, hogy a Crohn-betegséget a Th-1 túlsúly jellemzi, míg colitis ulcerosában a Th-2 sejtvonal dominál. A helper T-sejtek (Th-1, Th-2) egymás működésére is hatással vannak az általuk termelt citokineken keresztül. A Th-1 sejtvonal a sejtes immunválaszt irányítja, és főként IL-2, IL-12, IL-23 és IFN- γ citokineket termel, ezek közül az IL-23 központi szereplő, mert egy erős pro-inflammatorikus hatású citokin, amely autokrin módon fokozza az IL-1, IL-6 és TNF- α termelését a DC-ken és makrofágokon [67]. A Th-2 sejtek elsősorban a humorális immunválasz kialakításában játszanak fontos szerepet és elsősorban IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 és IL-13 citokineket termelnek.

A DC-k által termelt citokinek a Th-17 sejt irányú differenciációt is elősegítik. Az emelkedett IL-17 és IFN- γ termelés tovább károsítja a mucosa epitél rétegét. Az IL-17 az NF- κ B jelátviteli útvonalon keresztül számos citokin (TNF- α , IL-1 β , IL-6), kemokin, növekedési faktor (TGF- β), mátrix metalloproteináz (MMP-3, MMP-13) és antimikrobiális peptid (defenzinek, mucinok) expresszióját fokozza [68]. Az IL-17 emellett neutrofil sejteket toboroz, illetve B-sejteket aktivál [69]. Dextrán nátrium szulfát (DSS)-indukált colitises egérmodellben az IL-17 knock out (KO) állatok epitél sérülése

enyhébb, mint a vad típusú (WT) egereké, ami az IL-17 bélnyálkahártya károsító hatását támasztja alá [70].

Vizsgálataim középpontjában az IL-24 áll, mely az IL-20 citokin alcsalád, illetve a természetes immunválasz szabályozásában, az epitél sejtek integritásának fenntartásában jelentős szereppel bíró IL-10 citokincsalád tagja [71]. Az IL-20 alcsaládba az IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 és az IL-26 tartozik. Az alcsaládba tartozó citokinek célsejtjei és biológiai funkciói hasonlóak [72], főként a myeloid és limfoid eredetű immunsejtekből származnak, receptoraik döntően az epitélsejteken expresszálódnak. Az IL-19 receptora az IL-20RA/IL-20RB heterodimer, míg az IL-20 és IL-24 kötődhet az IL-20RA/IL-20RB, valamint IL-22RA1/IL-20RB heterodimer receptorhoz is. Az IL-22 receptora IL-22RA1/IL-10RB az IL-26 pedig IL-20RA/IL-10RB receptorkomplex. Az IL-20 alcsalád citokinjei hatásukat főként a JAK (Janus kinase)/STAT (signal transducers and activators of transcription) szignalizációs útvonalon keresztül, a génexpressziót direkt módon szabályozva fejtik ki [73, 74].

Az IL-24 fokozott jelenlétét mutatták ki gyulladással, szöveti átrendeződéssel járó betegségek kapcsán, mint a gyulladással járó bélbetegség [75], a pikkelysömör [76, 77], vagy a reumatoid artritisz [78, 79]. Az IL-24 IBD-ben betöltött szerepéről azonban kevés ismeret áll rendelkezésünkre. Korábban Andoh A., illetve Fonseca-Camarillo G. és munkatársai az IL-24 fokozott jelenlétét mutatták ki az IBD-ben szenvedő betegek bélbiopsziás mintáiban [75, 80]. Andoh A. és munkatársai vizsgálatai szerint az IL-24 hatására fokozódik a vastagbél epitél sejteinek mucin-1,-3 és -4 termelése, amely az IL-24 gyulladást csökkentő hatására utal. Az IL-24 adenovirális overexpressziója számos tumoros sejtvonalon apoptózist indukál [81, 82], overexpresszálása csökkenti a keloidszövetből nyert fibroblasztok proliferációját [83], expressziója a bőrben a sebgyógyulás során megemelkedik [84], így feltételezhető, hogy az IL-24 részt vesz a sebgyógyulás során végbemenő szöveti átrendeződésben. Kutatócsoportunk az IL-24-et a vesefibrózis állatkísérleti modelljében az egyik legnagyobb mértékben expresszáló molekulaként azonosította [85].

Az IL-24 szöveti átrendeződésben betöltött szerepe erősen feltételezhető, azonban ennek pontos mechanizmusát máig sem ismerjük.

1.3.6. TNF- α szerepe a gyulladásoos bélbetegségben

A TNF- α - az IL-1 β mellett - az egyik legfontosabb és legismertebb proinflammatorikus citokin az IBD patomechanizmusában. Fő forrásai a lamina propria mononukleáris sejtjei, így a makrofágok, a fibroblasztok, a T-sejtek és az adipocyták [86].

A nuclearis factor (NF- κ B) transzkripcióos faktor aktiválásán keresztül számos gyulladásoos folyamatot indít el. Fokozza az E-selectin és egyéb adhézioos molekulák kifejeződését, továbbá indukálja a citokinek és kemokinek termelődését, fokozza az angiogenezist. Károsítja az epiteliális barriert, indukálja az epiteliális sejtek apoptózisát és a bélhámsejtek kemokin termelését. Hozzájárul a granuloma képződéséhez, és elősegíti az akut fázis fehérjék termelődését [87], a macrofágok és effektor T-sejtek aktivációját, valamint a fibroblasztok fokozott mátrix metalloproteináz (MMP) termelését. [88]

Súlyos betegség esetén az egyik leghatékonyabb terápiaos eszközünk az infliximab, illetve az adalimumab, amelyek TNF- α neutralizáló antitestek [89].

1.3.7. TGF- β szerepe a gyulladásoos bélbetegségben

A transzformáló növekedési faktor- β két, egyenként 12,5 kDa nagyságú alegységéből álló 25 kDa méretű homodimer [90]. Szerepe számos folyamatban bizonyított, befolyásolja a sejtek migrációját, proliferációját, differenciációját [91]. A fehérvérsejtek, így például a makrofágok és a Treg-sejtek is termelik. A TGF- β receptor I-es és II-es típusú receptor alegységekből áll. A TGF- β kötődése után a 2-es típusú receptor kináz foszforilálja és aktiválja az 1-es típusú receptor kinázt, mely által beindulnak a jelátviteli kaszkádok, így például a SMAD2/3, amely a SMAD4 molekula segítségével a sejtmagba transzlokálódik, ahol transzkripcióos faktorként megváltoztatja a génepressziót [92]. A TGF- β hatására emellett számos más szignáltranszdukcióos út vonal, többek között az ERK (extracellular signal-regulated kinase), p38, MAPK (mitogen aktivált protein kináz), illetve JNK (c-Jun N-terminalis kináz) jelátviteli rendszerek is aktiválódnak. Ezen folyamatok eredményeként megváltozik a sejtek génepresszióos profilja, sejtciklusbeli állapota, fokozódik az extracelluláris mátrix (ECM) fehérjék termelése és depozíciója [93]. A TGF- β SMAD-dependens és -independens úton egyaránt indukálja profibrotikus gének expresszióját (MMP-1, -10, kollagén-1) és elősegíti a fibroblasztok aktivációját [94]. A TGF- β az NF- κ B jelátviteli út vonal gátlásával csökkenti a mastocyták TNF- α termelését [95]. A TGF- β azonban

kétarcú molekula, mert profibrotikus hatása mellett, anti-inflammatorikus hatással is rendelkezik [96].

A CD és az UC esetén eltérő Th-sejt profilnak köszönhetően különbség adódik a TGF- β expresszióban is. UC-ban a lamina propria mononukleáris- és T-sejtjeinek száma, valamint TGF- β termelése magasabb a CD és kontroll csoportokhoz képest [97].

1.3.8. PDGF-B szerepe a gyulladásoos bélbetegségben

Kumagai és munkatársai a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF)-A, a PDGF-B és receptorjaik emelkedett szintjét találták a IBD-ben szenvedők gyulladt, illetve a fibrotikus bélterületekről származó mintáiban [98].

A PDGF családnak 4 izoformája ismert (A, B, C, D), melyek diszulfid hídral homodimereket alkotnak, az A és B izoforma heterodimerré is összekapcsolódhat. A PDGF dimerek fokozott termelését hipoxia, trombin, különböző citokinek és egyéb növekedési faktorok serkentik. Fő forrásai a makrofágok, de termelődik a neutrofil sejtekben, a fibroblasztokban és az endotél sejtekben is.

A PDGF receptorának α és β típusait különböztetjük meg, melyek szintén homo- és heterodimereket is képezhetnek. A ligand bekötődésekor a receptor alegységek dimerizálódnak, megváltozik a konformációjuk és intracelluláris doménjük több helyen autofoszforylálódik, amely hatására számos szignalizációs útvonal, többek között a MAPK, PI3K (Foszfoinozitid-3-kináz), JAK-STAT is aktiválódik [99].

A PDGF dimerek profibrotikus hatásúak, fokozzák a sejtek proliferációját, mitogén hatásúak a mesenchimális eredetű fibroblaszt, pericita, ér simaizom sejtekre. Több kutatócsoport leírta, hogy a PDGF receptor blokkolása számos szerv hegesezésének mértékét csökkenti [100, 101]. A PDGF aktiválja az intesztinális fibroblasztokat, amely által fokozódik a kollagén termelés, de szerepe van az embrionális fejlődésben, az angiogenezisben, a sebgyógyulásban és a fertőzőes folyamatok patomechanizmusában is [102].

1.3.9. A mátrix metalloproteinázok (MMP) szerepe a gyulladásoos bélbetegségben

Több mint 25-féle MMP-t ismerünk, melyek strukturálisan hasonló, genetikailag azonban különböző endopeptidázok. Szinte valamennyi extracelluláris

mátrix komponens bontására képesek, beleértve a kollagéneket (kollagenázok), a denaturált vagy részlegesen degradált kollagéneket (zselatinázok), vagy a laminineket. Emellett szerepük van az immunválasz, a sejt migráció szabályozásában, a leukociták aktivációjában, az antimikrobiális válaszreakcióban és az angiogenezisben [52, 103, 104]. A TIMP-ek olyan kisméretű fehérjék, melyek az MMP molekulákkal 1:1 arányban képesek kötődni, majd azok működését gátolni [105-107]. Ez a gátlás azonban nem specifikus, vagyis az egyes TIMP-ek számos különböző MMP-t képesek gátolni. Jelen vannak a gyulladás kialakulásánál, majd az ezt követő immunsejt infiltrációnál, citokin termelődésnél, továbbá a fibroblasztok aktivációjánál és végül a kialakult fibrotikus szövetben is.

IBD-ben a kollagenázok (MMP-1,-8,-13), a zselatinázok (MMP-2,-9), a stromelizinek (MMP-3,-10), a matrilizin (MMP-7) és a makrofág elasztáz (MMP-12) szerepe ismert, melyek funkcióit az 1. táblázat foglalja össze [62].

1. táblázat. Az IBD patomechanizmusában szerepet játszó MMP-k és azok főbb funkciói

MMP	Csoport	Általános név	IBD-ben betöltött szerep
MMP-1	kollagenázok	kollagenáz-1	bél fibrózis elleni védelem
MMP-8		kollagenáz-2	neutrofil infiltráció elősegítése
MMP-13		kollagenáz-3	TNF- α , endosztatin aktiváció
MMP-2	zselatinázok	zselatináz A	bél fibrózis elleni védelem antiangiogen faktorok termelése epitél barrier védelem
MMP-9		zselatináz B	neutrofil infiltráció elősegítése kemokin expresszió antiangiogen faktorok termelése bél fibrózis elleni védelem
MMP-3	stromelizinek	stromelizin-1	endosztatin aktiváció
MMP-10		stromelizin-2	sebgyógyulás
MMP-7	matrilizinek	matrilizin-1	A-defenzin aktiváció kemokin expresszió endosztatin produkció
MMP-12	egyéb MMP-k	makrofág metalloelasztáz	epitélium degradáció

1.4. A gyulladásos bélbetegség klinikai tünetei

Az IBD két fő megjelenési formája a CD és az UC. Mindkét betegségre ismerünk jellemző klinikai tüneteket és specifikus szövettani eltéréseket, az esetek részében mégsem sikerül (IBD-U), vagy csak a későbbiekben sikerül felállítani a diagnózist [108, 109]. Az IBD kórlefolyása hullámzó, aktív és nyugalmi fázisokkal tarkított betegség. A klinikai kép nagyban függ a betegség kezdetének időpontjától, az érintett bélszakasztól, a folyamat súlyosságától, továbbá az esetleges extraintesztinális manifesztációktól. A gyermekkori IBD tünetei - például a hasi fájdalom, a hasmenés, vagy a fogyás - többségükben megegyeznek a felnőttkorban tapasztaltakkal, vannak azonban speciális gyermekkori következmények, mint a növekedésbeli elmaradás, csontosodási zavar vagy a késői pubertás [110].

1.4.1. A Crohn-betegség klinikai képe

A CD a tápcsatorna bármely részét érintő, szegmentális lokalizációjú krónikus gyulladás. Leggyakrabban az ileum és a proximális vastagbél vesz részt a folyamatban, a gyulladás transzmurális, tehát a bélfal mélyebb rétegeit is érinti. Gyermekkorban az ileocolonicus régió 35-50%-ban, a terminális ileum 25-30%-ban érintett, míg izolált vastagbélgyulladás 20-30%-ban figyelhető meg. A terminális ileumtól proximálisan lévő bélszakaszok érintettsége az esetek több, mint 50%-ában fordul elő, ami segítheti a diagnózis felállítását [110-112].

Legfőbb klinikai tünet a hasi fájdalom, az esetek nagyobb hányadában nem véres hasmenés, fogyás, illetve társulhat hozzá flatulencia, esetleg subfebrilitás vagy láz. A hasi fájdalom lehet diffúz vagy köldök körüli, de főként a jobb alhasban jelentkezik. A differenciáldiagnózis - mint minden betegség esetén - kifejezetten fontos, hiszen a láz és a hasi nyomásérzékenység akár appendicitis gyanúját is keltheti.

Gyermekkorban gyakrabban látunk atípusos, vagy extraintesztinális tüneteket, azonban a betegek 80 %-ában jelen van a hasi fájdalom. A növekedési retardáció elkerülése fontos feladat a terápia során, ezért kiemelt jelentőségű a tartós remisszió elérése, ellenkező esetben irreverzibilissé válhat a növekedésbeli elmaradottság. A malnutríció és malabszorpció fontos következménye a kórképnek. A különböző gasztrointesztinális panaszok miatt egyrészt csökken a táplálékbevitel, a felszívódási

zavarok pedig a károsodott nyálkahártya felszín miatt alakulnak ki. A hasmenés miatt elektrolitzavarok, különböző hiányállapotok alakulnak ki [113-115].

Az extraintesztinális manifesztációk a betegek életminőségét nagymértékben befolyásolják. A leggyakoribb bőrtünet az erythema nodosum és a pyoderma gangrenosum, ezenkívül előfordul episcleritis, perifériás arthritis, sclerotizáló cholangitis, illetve uveitis [12, 116, 117].

Az aktivitási index az IBD aktivitásának, súlyosságának, illetve az alkalmazott terápia hatékonyságának megítélésére szolgáló mutató [118]. CD-ben a Gyermekkori Crohn-betegség aktivitási index (PCDAI) egy 0-100-ig terjedő skála, amely klinikai tüneteken (fogyás, hematochaezia, diarrhoea), laboratóriumi értékeken (albumin, haematokrit) valamint a szövödmények (perirectalis elváltozás, extraintesztinális tünet) meglétén alapul. 10 alatti PCDAI esetében remisszióról, 30 fölött súlyos aktivitásról beszélhetünk.

1.4.2. A colitis ulcerosa klinikai képe

Az UC a vastagbél nyálkahártya kifeléyesedésével járó, idült, gyulladós megbetegedés. A vezető klinikai tünet a görcsös hasi fájdalom és a véres-nyákos hasmenés. A markánsabb tünetek miatt a diagnózis felállítása általában gyorsabb, mint CD kapcsán. Ennek megfelelően a betegség gyorsabb felismerése miatt a súlyvesztés is kevésbé jellemző [119]. A betegség felnőtteknél főként a bal oldali leszálló vastagbelet vagy a rectumot érinti [120], gyerekeknél gyakoribb az egész vastagbelet érintő pancolitis. Nehezítheti a diagnózist a terminalis ileum érintettsége („backwash ileitis”) [119, 121]. A HUPIR adatai szerint a magyarországi pancolitises esetek gyakorisága 57% [122]. Az extraintesztinális manifesztációk közül a sclerotizáló cholangitis a leggyakoribb.

UC-ben a Gyermekkori colitis ulcerosa aktivitási index (PUCAI)-t alkalmazzák, mely kizárólag klinikai tüneteken (éjszakai véres hasmenés, véres székletek száma, mennyisége) alapul, jól korrelál a betegség tényleges aktivitásával [123]. A PUCAI esetében is 10 alatt remisszióról, 30 fölött súlyos aktivitásról beszélhetünk, 65 fölött akut fulmináns vastagbélgyulladást különítünk el.

1.5. A gyulladásos bélbetegség diagnózisa

A diagnosztikában fontos szerepet játszik az auto-, és heteroanamnézis felvétele, a fizikális vizsgálat, a vérvételi eredmények, illetve a képalkotó vizsgálatok. A diagnózis felállítása a Portói kritériumok és az ESPGHAN irányelvei alapján történik [124, 125]. Laboratóriumi vizsgálatok során CD-ben jellemző a leukocytosis, a C-reaktív protein (CRP) emelkedés, a gyorsult süllyedés, anaemia, azonban ezek az eltérések nem betegség-specifikusak. A trombocytosis a kórkép aktivitásának nyomon követésében is fontos tényező. Emelkedett a széklet calprotectin tartalma. Immunológiai vizsgálattal CD-ben az anti-saccharomyces cerevisiae elleni antitest (ASCA), UC-ben pedig az anti-neutrophil citoplazmatikus antitest (ANCA) pozitivitás gyakoribb. A két fenti szerológiai marker együttes értékelése segítséget nyújthat a diagnózis felállítása során. Az ANCA –/ASCA + 92-97 %-os specificitással jellemző CD-re, míg az ANCA +/ASCA – esetek 81–98 %-os valószínűséggel jelzik az UC fennállását IBD gyanúja esetén [126]. Gyermekesetén a képalkotó vizsgálatok közül hasi ultrahangot, valamint hasi-kismedencei MR-t végzünk. A betegek kivizsgálásában nélkülözhetetlen a felső- (oesophago-gastro-duodenoscopia) és alsó (colonoscopia) endoszkópos vizsgálat és az eltávolított biopsziás minták szövettani elemzése. Bár nem rutin diagnosztikus eszköz, de lehetőség van kapszula endoszkópia elvégzésére, mely főként vékonybél érintettség diagnosztikájában lehet hasznos.

A differenciáldiagnosztika IBD esetén is kiemelten fontos. CD kivizsgálása során számos kórkép merülhet fel, mint például irritábilis bélszindróma, appendicitis, Yersinia okozta infekció, bél tuberculosus, de akár hypothyreosis, vasculitisek, juvenilis arthritisek, és malignus kórképek is, mint a leukaemia vagy a non-Hodgkin lymphoma. UC esetén főként az infektív (Salmonella, Shigella, Campylobacter spp., invazív E. coli), valamint a jellemzően antibiotikum kezelést követően kialakuló Clostridium difficile által okozott pseudomembranosus colitises eredetet kell kizárni.

1.6. A gyulladásos bélbetegség terápiaja

Gyermekesetén a terápia célja a tünetek enyhítésén túl a növekedés és a nemi érés alapfeltételét biztosító tartós remisszió és a mucosalis gyógyulás elérése. Klinikai remisszióról 10 alatti PCDAI, illetve PUCAI esetében beszélhetünk.

Az első választandó kezelés a jó eredményeket, gyakran remissziót hozó kizárólagos enterális táplálás EEN (kizárólagos enterális táplálás), melynek során a beteg 6-8 hétig csak folyékony tápszert fogyaszthat. A szisztémás kortikoszteroid terápia csak azokban a középsúlyos-súlyos luminális CD esetekben ajánlott, ahol az EEN nem kivitelezhető. A szteroid kezelés napi 1mg/ttkg dózisban adható 2-4 hétig, 2 hónapos leépítéssel. Perianális érintettség (fistula, tályog) esetében a széles spektrumú antibiotikumok közül, szükség esetén kombinációban, ciprofloxacín és metronidazol adható [127]. A fenntartó kezelés alapját rossz betegségprognózis esetén a thiopurin vagy methotrexat kezelés jelenti, míg enyhe betegségfolyás esetén az aminoszalicilátok is elégségesek lehetnek a remisszió fenntartására. Biológiai terápia három hónapos eredménytelen konzervatív terápiát követően; 30 fölötti PCDAI vagy fistula esetén adható, amely hazánkban 2007 óta érhető el. Az infliximab (IFX) egy chimera, monoclonális IgG1 antitest, mely 25 %-ban egér, 75 %-ban humán komponensből épül fel [128]. 2014 óta már az adalimumab (ADA) is elérhető, amely 100%-ban humán IgG1 monoklonális antitest.

A fenti terápiás lehetőségek ellenére 8 év után sajnos a beteg gyermekek egyharmada, életük során pedig a CD-s betegek több mint 70%-a szorul sebészeti beavatkozásra [129]. Fontos szempont a minimál invazív, bélmege tartó operatív beavatkozások végzése, emellett a stricturoplastica, illetve a laparoscopos eljárások száma is növekszik [130, 131].

Az UC terápiájában döntően a fent leírt, CD-ben alkalmazott terápiás lehetőségek állnak rendelkezésre. Enyhe és középsúlyos esetekben a szájon át vagy rectálisan alkalmazott 5-amino-szalicilát terápia elegendő lehet. Súlyosabb esetben szteroid, azatioprin vagy cyclosporin adható [132]. A fenti terápiára nem reagáló esetekben a biológiai terápia mérlegelendő. Tíz éves betegségfennállás esetén gyermekkorban a colectomia kétszer gyakoribb (40%), mint felnőttkorban (20%).

1.7. A gyulladással járó bélbetegség szövődményei

CD esetén a transzmurális gyulladás okozta bélszűkületek subileust, ileust okozhatnak. A betegség során tályogok, végbélsípolyok kialakulására is lehet számítani, utóbbi akár az első tünet is lehet. A perianális fistulák, a bőrfüggelékek és a recidiváló tályogok általában műtéti indikációt jelentenek. [119, 125, 133]. Fennáll továbbá a

malignus transzformáció lehetősége is. A különböző szövődmények miatt a betegek több mint 70%-a esik át élete során műtéti beavatkozásra [134].

UC esetén toxikus megacolon alakulhat ki, melyben peritonitis, perforáció és szepszis veszélye is fennáll. UC-ban bizonyított a colorectalis carcinoma (CRC) kialakulásának fokozott rizikója, azonban kialakulása elsősorban a megelőzésnek köszönhetően csökkenő tendenciát mutat. Magyarországi felmérés szerint a CRC kockázata 32 éves betegség fennállás esetén 12,6%. [11, 120].

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az IL-24 pontos biológiai szerepe az IBD-ben és azon belül a szöveti átrendeződésben még mindig nagyrészt ismeretlen, ezért munkánk során célul tűztük ki ennek vizsgálatát in vivo és vitro körülmények között egyaránt.

A következő kérdésekre kerestük a választ:

- Hogyan változik az IL-24 citokin expressziója a terápia naív, gyulladásos bélbetegségben szenvedő gyermekek vastagbél nyálkahártyájában, illetve a DSS indukált vastagbélgyulladás során a kontroll csoportokhoz képest?
- Az IL-24 receptora, az IL-20RB mely sejteken expresszálódik a humán és az egér vastagbél nyálkahártyában?
- Milyen hatással vannak az IBD patomechanizmusában ismert gyulladásos faktorok az IL-24 expressziójára az immunsejteken?
- Milyen hatással van az IL-24 a bél epitél sejtek profibrotikus molekula expressziójára?
- Milyen hatással van az IL-24 molekula a bél fibroblaszt sejtek migrációjára és az extracelluláris komponensek expressziójára?
- Milyen hatással van a direkt IL-24 kezelés az egér vastagbél nyálkahártya profibrotikus molekula és extracelluláris mátrix komponensek expressziójára?
- Az *Il20rb* hiánya hogyan befolyásolja a DSS indukált vastagbélgyulladás során a tüneteket és a lerakódó extracelluláris mátrix mennyiségét?

3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

3.1. IBD-s beteganyag és kontroll csoportja

A human colon biopsziák és szérum minták a Semmelweis Egyetem I. sz. Gyermekgyógyászati Klinika beteganyagából származnak. A vizsgálatot a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (TUKEB 175/2007) hagyta jóvá, és a Helsinki Nyilatkozattal összhangban végeztük.

Az IBD-s betegeket a Portói kritériumok [112, 135] alapján diagnosztizáltuk, a betegség aktivitást a PCDAI és PUCAI meghatározásával jellemeztük [136-139]. Fontos kiemelni, hogy a vizsgálatba bevont gyermekek frissen diagnosztizált, kezeletlen betegek voltak. A kontroll gyermekeknél krónikus hasi fájdalom, hasmenés vagy polyposis gyanúja miatt a gasztroenterológiai kivizsgálásuk keretében végeztünk endoszkópos vizsgálatot, mely minden alkalommal negatívnak bizonyult, biopsziáik ép makroszkópos és hisztológiai képet mutattak. A vizsgálatba bevontaktól (beteg és kontroll) a biopsziás, illetve a szérum mintákat az endoszkópos vizsgálat kapcsán gyűjtöttük.

A beavatkozás előtt minden vizsgálatba bevett gyermek szülei írásos beleegyezést adtak.

3.1.2. Vastagbél biopszia minták

A Western blot analízis során felhasznált mintákat a colon transversum területéről nyertük. A 10 kontroll minta mellett a Crohn-beteg gyermekek esetén a makroszkóposan ép (CD ép, n=7) és kóros (CD gyulladt, n=7) nyálkahártyából, colitis ulcerosa esetén a gyulladt nyálkahártyából (UC, n=7) vettünk biopsziát. A beteg gyermekek klinikai jellemzését a 2. táblázatban összegeztük. A mintavételt követően a biopsziákat rögtön lefagyasztottuk, a további feldolgozásig -80°C-on tároltuk.

2. táblázat. A kontroll és gyulladásos bélbeteg (IBD) gyermekek klinikai karakterizálása.

Rövidítések: CD- Crohn-betegség, UC- colitis ulcerosa, CRP- C-reactive protein, PCDAI/PUCAI - Gyermekkorai Crohn-betegség /Colitis Ulcerosa Aktivitási Index.

	Kontroll	CD (ép régió)	CD (gyulladt régió)	UC
Esetszám	10	7	7	7
Nem (fiúk/lányok)	3 / 7	4 / 3	4 / 3	3 / 4
Életkor (évek)	12,76±4,15	13,11±1,65	13,74±2,29	14,52±1,40
CRP (mg/l)	0,87±1,37	30,15±28,94	26,48±31,03	7,43±10,30
PCDAI/PUCAI	0	28,78±10,51	27,50±16,96	31,00±20,12

3.1.3. Szérum minták

ELISA vizsgálatunk során 15 kontroll gyermektől és 12 Crohn-beteg gyermektől történt vérvétel. A vérmintákat lecentrifugáltuk, majd a szérum mintákat azonnal lefagyasztottuk, a további feldolgozásig -80°C-on tároltuk. A beteg gyermekek klinikai jellemzését ld. a 3. táblázatban.

3. táblázat. A kontroll és Crohn beteg gyermekek klinikai karakterizálása.

Rövidítések: CD- Crohn-betegség, CRP- C-reactive protein, PCDAI-Paediatric Crohn's Disease Activity Index.

	Kontroll	CD
Esetszám	15	12
Nem (fiúk/lányok)	8 / 7	6 / 6
Életkor (évek)	5,8±4,42	12,31±5,657
CRP (mg/l)	3,615±11,54	45,08±40,63
PCDAI	0	27,75±13,82

3.2. Állatmodell és kezelési protokollok

A kísérletekben használt egereket standard körülmények között tartottuk, kontrollált hőmérsékletű ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) szobákban, 12 óránként váltakozó világos és sötét periódusok mellett. Az állatok számára szabadon elérhető standard rágcsálótápot és vizet biztosítottunk. Állatkísérleteinket a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága engedélyezte (PEI/OO1/83-4/2013). Valamennyi módszert a vonatkozó előírásoknak és az ARRIVE irányelveknek megfelelően végeztük

3.2.1. Intracolónális IL-24 injektálás

A kísérlet során 7-8 hetes, hím C57Bl/6J egereket (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) használtunk. Általános isoflurán (3% V/V) inhaláció indukált anesztézia alatt (Eickemeyer Veterinary Equipment Ltd., Twickenham, UK) median laparotomiát követően az egerek vastagbélét óvatosan kiemeltük a hasüregből. Az intracolónális IL-24 injektálás során a Boni és munkatársai [140] által leírt eljárást követtük, mely során rekombináns IL-24-et (0,1 $\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ /egér dózisban; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) injektáltunk a vastagbél falába az antimesenterialis oldalon az anustól 30 mm-re. A kontroll állatok esetén csak vivőanyag injektálás (Foszfátpufferelt sóoldat, PBS, $50\mu\text{l}$ /egér) történt. Mindkét kezelési csoportba 6-6 egeret vontunk be. A kísérletet 24 órával az injektálás után termináltuk, majd a kezelt bélszakaszokat eltávolítottuk, rögtön lefagyasztottuk, majd további analízisig -80°C -on tároltuk.

3.2.2. DSS indukálta colitises egérmodell

A kísérleteket 7-8 hetes, hím, vad típusú (WT) C57Bl/6J (Charles River Laboratórium, Sulzfeld, Németország) és a Dr. Franz Oswaldtól (University Medical Center, Ulm, Germany) kapott C57Bl/6J genetikai háttérű, *Il20rb* génkiütött (KO) egereken végeztük. DSS (dextrán nátrium szulfát) indukálta colitis során mind a WT (n=6), mind az *Il20rb* KO egerek (n=6) 2,5% (w/v) DSS-tartalmú (MP Biomedicals, LLC, Santa Ana, CA, USA) vizet ihattak a kísérlet 7. napjáig, majd további 12 napig tiszta ivóvizet kaptak. A kontroll csoportok (WT, n=6; *Il20rb* KO, n=6) csak tiszta ivóvizet kaptak 19 napig. A bélmintákat a 19. napon általános isoflurán inhaláció indukált anesztézia alatt gyűjtöttük (Eickemeyer Veterinary Equipment Ltd., Twickenham, UK).

A mintákat azonnal lefagyasztottuk és a további feldolgozásig -80°C -on tároltuk, illetve formalinban fixáltuk (4%, pH=7,4).

A DSS kezelés során kialakuló betegség aktivitási index (DAI) meghatározását Kim JJ és munkatársai által leírtak alapján határoztuk meg [141]. A kísérlet során minden nap, azonos időpontban digitális mérleg segítségével meghatároztuk az állatok testsúlyát, a széklet konzisztenciáját és a székletük vér tartalmát. Az állatok általános állapotát viselkedésbeli megnyilvánulásai alapján minden nap megvizsgáltuk. Előbbit 0-3 skálán pontoztuk, utóbbit, 0-2 skálán határoztuk meg. (4. táblázat). A DAI aktuális értékét az említett három kategória pontszámainak összegeként kaptuk meg.

4. táblázat. Az állatok betegség aktivitási indexének (DAI) számítása a széklet konzisztencia, a széklet vér és az általános állapot skálapontjai alapján.

Pontok	Széklet konzisztencia	Széklet vér	Általános állapot
0	Normál	Normál, nincs vér	Normál
1	Lazább	Kevés vér	Rossz
2	Enyhén formált	Perianalis vérzés	Haldoklik
3	Teljesen folyékony	Folyó vérzés	-

3.3. Sejtvonalak

3.3.1. HT-29 colon és HK-2 proximális tubulus epitél sejt kultúra és kezelések

A HT-29 colon epitél sejtvonalat (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA; European Collection of Cell Cultures) módosított McCoy's 5A médiumban (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), a humán proximális tubulus epitél (HK-2) sejteket (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) DMEM (Dulbecco's módosított sejt médium, Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) tápoldatban tenyésztettük 37°C -on, 5% CO_2 koncentráció mellett. A médiumot L-glutaminnal, 10% hő-inaktivált főtális borjú szérummal (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 U/ml penicillinnel és 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycinnel (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) egészítettük ki.

A kísérletek során a sejteket 6 well-platere tettük ki, 5×10^5 sejt/well denzitással, 0% FBS mellett, majd 24 óra múlva (n=6/csoport) 100 ng/ml humán rekombináns IL-24-gyel

(R&D Systems) kezeltük. A kontroll sejteket vehikulummal (PBS) kezeltük. A kezelés időtartama 24 óra volt, ezt követően a sejtekből annexin/PI festést végeztünk és RNS-t izoláltunk.

3.3.2. A CCD-18Co colon fibroblaszt sejt kultúra és kezelése

A CCD-18Co human colon fibroblaszt sejt vonalat (ATCC, Manassas, VA, USA) Eagle's Minimum Essential médiumban (EMEM) (ATCC) 37°C-on, 5% CO₂ koncentráció mellett tenyésztettük. A médiumot L-glutaminnal, 10% hő-inaktivált FBS-sel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml streptomycinnel (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) szupplementáltuk.

A sejteket 6 well-platere tettük ki, 5x10⁵ sejt/well denzitással, 0% FBS mellett, majd 24 óra múlva 100 ng/ml humán rekombináns IL-24-gyel (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), 1 nM TGF-β1-gyel (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), illetve 10 ng/ml PDGF-B-val (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) kezeltük az egyes csoportokat (n=6/csoport) 24 órán át. A kontroll sejteket vehikulummal kezeltük (IL-24 és PDGF-B esetén PBS-sel, TGF-β1 esetén 4mM HCl-dal). A fent leírt módon kezelt sejtekből annexin/PI festést végeztünk és RNS-t izoláltunk az RT-PCR mérésekhez.

Az MTT és a SiriusRed tesztekhez a CCD-18Co sejteket 96 well-platere tettük ki 10⁴ sejt/well denzitással, majd ez esetben is a fent leírt módon kezeltük a sejtcsoportokat (n=5/csoport) rekombináns IL-24-gyel, TGF-β1-gyel, PDGF-B-val, illetve a kontroll csoportokat a megfelelő vivőanyaggal.

3.3.2. Perifériás vérben keringő mononukleáris sejtek (PBMC)

A perifériás vérből a mononukleáris sejteket egy, a klinikán kivizsgálásra jelentkezett, egészséges 5 éves fiúgyermektől nyertük. A gyermek gasztroenterológiai kivizsgálása kellemetlen lehelet és kifejezett, nyelven lévő felrakódás miatt történt. A sejteket sűrűséggrádiens-centrifugálással izoláltuk (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich), majd RPMI 1640 médiumban (ATCC) tenyésztettük 37°C-on, 5% CO₂ koncentráció mellett. A médiumot L-glutaminnal, 10% hő-inaktivált FBS-sel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml streptomycinnel (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) egészítettük ki.

A sejteket 24 well-plate-re tettük ki, 5×10^5 sejt/well denzitással, 0% FBS mellett, majd 24 óra múlva 100 ng/ml rekombináns IL-1 β -val (Invitrogen), 100 ng/ml LPS-sel (lipopoliszacharidok Escherichia coliból, Sigma-Aldrich), 10 ng/ml rekombináns TNF- α -val (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), rekombináns 0,5 nM TGF- β 1-gyel (Invitrogen), 100 ng/ml rekombináns IL-17-tel (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), illetve 25 μ M H₂O₂-dal (hidrogén peroxid) kezeltük az egyes csoportokat (n=6/csoport). A kezelések időtartama 24 óra volt 37°C-on 5% CO₂ koncentráció mellett. A kontroll sejteket vehikulummal kezeltük (IL-1 β esetén desztillált vízzel, LPS, TNF- α , IL-17 és H₂O₂ esetén PBS-sel, TGF- β 1 esetén 4mM HCl-dal). A fent leírt módon kezelt sejtekből mRNS expressziót mértünk.

3.3.4. Lamina propria mononukleáris sejtek (LPMC)

A lamina propria mononukleáris sejteket kontroll, vad típusú egerekből nyertük McManus és munkatársai [142] által leírt módszer alapján, amely során a teljes vastagbelet eltávolítottuk, PBS-sel mostuk, majd azt apró darabokra vágtuk fel. A szövetdarabokat kollagenázt tartalmazó oldattal (1 mg/ml, Sigma Aldrich) emésztettük, mechanikus módszerrel, 40 μ m-es Falcon sejtűzőn (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével homogén sejtszuszpenziót hoztunk létre. Ezt követően a lamina propria mononukleáris sejteket sűrűséggrádiens-centrifugálással izoláltuk (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich). Izolációt követően a sejteket RPMI 1640 médiumban (ATCC) tenyésztettük 37°C-on, 5% CO₂ koncentráció mellett. A médiumot L-glutaminnal, 10% hő-inaktivált FBS-sel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 U/ml penicillinnel és 100 μ g/ml streptomycinnel (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) szupplementáltuk. A sejteket 96 well-plate-re tettük ki 5×10^5 sejt/well denzitással 0% FBS mellett, majd 24 óra múlva 100 ng/ml rekombináns IL-1 β -val (Invitrogen), 100 ng/ml LPS-sel (lipopoliszacharidok Escherichia coliból, Sigma-Aldrich), 10 ng/ml rekombináns TNF- α -val (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), rekombináns 0,5 nM TGF- β 1-gyel (Invitrogen), 100 ng/ml rekombináns IL-17-tel (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), illetve 25 μ M H₂O₂-dal kezeltük az egyes csoportokat (n=6/csoport) 24 órán át. A kontroll sejteket vehikulummal kezeltük (IL-1 β esetén desztillált vízzel, LPS, TNF- α , IL-17 és H₂O₂ esetén PBS-sel, TGF- β 1 esetén 4mM HCl-dal). A fent leírt módon kezelt sejtekből RNS-t izoláltunk a további RT-PCR mérésekhez.

3.4. Annexin V/ propidium jodid (PI) festés

Az apoptózis mértékét FITC Annexin V apoptózis detektáló Kit I segítségével (BD Pharmingen) vizsgáltuk a gyártó protokollja szerint. A sejteket PBS-es mosást követően 1X Binding Buffer-ben szuszpendáltuk, majd FITC Annexin V és propidium-jodid (PI) festékeket hozzáadva sötétben szobahőmérsékleten 1 órán keresztül inkubáltuk. Ezt követően a megfestett mintákat 1X Binding Buffer-rel hígítottuk. A mérést BD FACSaria™ áramlási citométerrel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) végeztük. A vizsgálható sejteket méret (forward scatter) és granuláltság (side scatter) szerinti szórás alapján határoltuk be. Minden kezelési csoportból 10.000 sejtet számoltunk le. Az élő (Annexin V és PI negatív), korai apoptotikus (Annexin V pozitív), illetve késői apoptotikus és halott sejteket (Annexin V és PI pozitív) festődésük alapján azonosítottuk. Az eredményeket ezután BD CellQuest™ Pro (BD Biosciences) szoftver segítségével értékeltük ki.

3.5. Fibroblaszt migrációs vizsgálat

CCD-18 Co sejteket a közepükön, nem toxikus, agaróz gél barriert tartalmazó, 96 well plate-re tettük ki 5×10^5 sejt/well denzitással, 24 órás inkubáció után a barriereket eltávolítottuk, majd rekombináns IL-24 vagy vehiculum kezelést alkalmaztunk. A vizsgált well-ekről fénymikroszkópos felvételt készítettünk Olympus IX81 mikroszkóp (Olympus Corporation, Tokyo, Japán) segítségével a kezelés időpontjában, illetve 5 nappal később. Az egyes well-ek közepén megmaradó sejtmentes területek méretét ImageJ 1.48v szoftverrel (The National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) határoztuk meg.

3.6. MTT sejtproliferációs vizsgálat

MTT sejtproliferációs vizsgálatunkhoz Cell Proliferation Kit I-et (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) használtunk, a kísérlet során a gyártó javaslatai alapján jártunk el. A kioldott festék abszorbanciáját 570 nm-en, Hidex Chameleon Microplate Reader (Triathler, Plate Chameleon, 300SL Lablogic Systems, Inc. Brandon,

FL, USA) segítségével, MikroWin szoftverrel mértük. A háttér fényelnyelését 690 nm-en határoztuk meg.

3.7. SiriusRed kollagén detekciós eljárás

A sejteket Kahle fixáló oldatban inkubáltuk szobahőmérsékleten 10 percen keresztül, majd PBS-sel mostuk. Ezt követően a sejteket Sirius Red festékoldatban (0,1% DirectRed80 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 1,2% pikrinsavban oldva) szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk. A be nem kötődött festéket desztillált vízzel távolítottuk el. A sejtek által termelt kollagénnel arányos mennyiségű, bekötődött festéket 0.1 M-os NaOH oldattal eluáltuk, abszorbanciáját 544 nm-en, Hidex Chameleon Microplate Reader (Triathler, Plate Chameleon, 300SL Lablogic Systems, Inc. Brandon, FL, USA) segítségével, MikroWin szoftverrel mértük. A háttér fényelnyelését 690 nm-en határoztuk meg.

3.8. Laktát-dehidrogenáz (LDH) cytotoxicitás vizsgálat

A vizsgálatot Korzeniewski C. és munkatársai által korábban leírtak alapján végeztük [143]. A laktát-dehidrogenáz az összes sejtben megtalálható citoplazmatikus enzim, mely a sejteket érő toxikus hatásokat követően a sejtek közötti térbe jut. Az LDH enzimaktivitás mérésével a sejteket érő toxikus hatás mértékét tudjuk megbecsülni. A reagensek forgalmazója a Sigma Aldrich. Az abszorbanciát 570 nm-en mértük Hidex Chameleon Microplate Reader és MikroWin 2000 szoftver segítségével.

3.9. Immunfluoreszcens festés

Az α -SMA és az IL-20RB szöveti, illetve sejten belüli elhelyezkedését immunfluoreszcens festési eljárással vizsgáltuk. A fagyasztott human colon biopsziákat és az egér bél mintákat Shandon cryomatrixba (ThermoElectron Co., Madison, WI, USA) ágyasztuk, majd 5 μ m vastagságú metszeteket készítettünk. Felhasználásig a metszeteket -80 °C-ra hűtve tároluk.

A HT-29 colon, a HK-2 vese epitelsejteket, valamint a CCD-18Co fibroblaszt sejteket az antitestekkel történő jelölés előtt 15 percig, szobahőmérsékleten Cytifix/Cytoperm (BD) segítségével fixáltuk és permeabilizáltuk.

Ezt követően α -SMA (sc-53015, egér polyclonalis IgG, 1:2000 hígítás, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), illetve IL-20RB specifikus antitesttel (ab124332, nyúl, 1:100 hígítás, Abcam) inkubáltunk 1 órán át, szobahőmérsékleten. A PBS-esel történő mosások (3x) után Alexa Fluor 488-al (kecske anti-egér IgG, 1:100 hígítás, A11001, Invitrogen), illetve Alexa Fluor 568-al konjugált szekunder antitesttel (szamár anti-nyúl, 1:100 hígítás, A10042, Invitrogen) inkubáltuk szobahőmérsékleten a mintákat. A metszeteket DNS kimutatására (magfestés) Hoechst 33342 festékkel (1:2000 hígítás, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) szobahőmérsékleten 10 percig inkubáltunk. Újabb PBS mosást (3x) követően a metszeteket Vectashield médiummal fixáltuk (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) és fedőlemezzel fedtük. A specificitás ellenőrzésének és az autofluoreszcencia kiküszöbölésének céljából kizárólag szekunder ellenanyaggal is inkubáltuk a kontrollnak használt metszeteket. A szövetek festődését Nikon C2 konfokális lézer scanning mikroszkóppal (Nikon, Minato, Tokió, Japán) vizsgáltuk.

3.10. RNS izolálás, cDNS szintézis és PCR

A mérések során felhasznált szövetekből és sejtekből az RNS izolálást Total RNA Mini izoláló kit (Geneaid Biotech Ltd., New Taipei City, Taiwan) segítségével a gyártó protokolljának megfelelően végeztük el. A kinyert RNS mennyiségét és minőségét DeNovix DS-11 spektrofotométerrel (DeNovix Inc., Wilmington, DE, USA) határoztuk meg. Mintánként 500 ng RNS-ből komplementer DNS-t (cDNS) szintetizáltunk Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) reagensekkel a gyártó utasításainak megfelelően. A valós idejű RT-PCR méréseket

LightCycler 480 SYBR Green I Master enzyme mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) reagenssel, LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) automatán végeztük. A vizsgálni kívánt génekre specifikus primereket (lásd 5. táblázat) az NCBI (National Center for Biotechnology Information) nukleotid

adatbázisában található szekvenciák alapján terveztük és az Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, Iowa, USA) gyártotta le. A különböző célmolekulák mRNS expresszióját a glicerín–aldehid–3–foszfát–dehidrogenáz (*GAPDH*) háztartási gén hányadosaként határoztuk meg az $x = 2^{-\Delta C_p}$ képlet alapján.

5. táblázat. A real time polimeráz lánreakcióban (PCR) alkalmazott primer párok nukleotid szekvenciája, a keletkező termékek hossza és az anellációs hőmérsékletek.

Rövidítések: F: forward; R: reverse; bp-bázispár, Ta- anellációs hőmérséklet

Faj	Gén	Primer párok	Termék hossz	T _a
human	<i>COL1A1</i>	F: 5'-CTGCCCCGCCGCCGAAGTC-3' R: 5'-CCCTCGACGCCGGTGGTTTCTTG-3'	96 bp	63 °C
human	<i>COL3A1</i>	F: 5'-TGCCCACAGCCTCCAAC-3' R: 5'-ATACCAGGGTCACCATTCTCC-3'	113 bp	56 °C
human	<i>FNI</i>	F: 5'-GGCTGCCACGAGGAAATCTGC-3' R: 5'-GTGCCCTCTTCATGACGCTTGTG-3'	229 bp	56 °C
human	<i>GAPDH</i>	F: 5'-AGCAATGCCTCCTGCACCACCAA-3' R: 5'-GCGGCCATCACGCCACAGTTT-3'	159 bp	60 °C
human	<i>IL24</i>	F: 5'-AGGCGGTTTCTGCTATTCC-3' R: 5'-GAGCTGCTTCTACGTCCAAC-3'	55 bp	48 °C
human	<i>IL20RB</i>	F: 5'-GGTGCCAGGAACATGTCAAAT-3' R: 5'-AGGGCCAGTACCAGGGGAATG-3'	188 bp	58 °C
human	<i>MMP2</i>	F: 5'-CACGCTGGGCCCTGTCACCTCCT-3' R: 5'-TGGGGCCTCGTATACGCATCAAT-3'	205 bp	60 °C
human	<i>MMP9</i>	F: 5'-CGCGGGCGGTGATTGACGAC-3' R: 5'-GAATGCCGGGGCCAGGAGGAA-3'	198 bp	63 °C
human	<i>TIMP1</i>	F: 5'-ACCCCCGCCATGGAGAGTG-3' R: 5'-AGGGGATGGATAAACAGGGAAACA-3'	223 bp	58 °C
human	<i>TIMP2</i>	F: 5'-CAGGGCCAAAGCGGTCAGTGAGA-3' R: 5'-CGAGGAGGGGGCCGTGTAGATAAACT-3'	151 bp	57 °C
egér	<i>Acta2</i> (58)	F: 5'-CCCCTGAAGAGCATCGGACA-3' R: 5'-TGGCGGGGACATTGAAGGT-3'	105 bp	60 °C
egér	<i>Coll1a1</i>	F: 5'-CAAAGCTGCTGATGGTTCT-3' R: 5'-GACCAGCTTCACCCTTG-3'	107 bp	60 °C

egér	<i>Col3a1</i>	F: 5'-GTCCCCTGGCTCAAATGGCTCAC-3' R: 5'-GGGGCCCCTTGCTCCTATTAGTCC-3'	175 bp	61 °C
egér	<i>Fnl</i>	F: 5'-GGTCAGGGCCGGGGCAGAT-3' R: 5'-CTGGCTGGGGGTCTCCGTGATAAT-3'	228 bp	60 °C
egér	<i>Gapdh</i>	F: 5'-ATCTGACGTGCCGCCTGGAGAAAC-3' R: 5'-CCCGGCATCGAAGGTGGAAGAGT-3'	164 bp	60 °C
egér	<i>Il24</i>	F: 5'-TGTGGGAGGCCTTCTGGACTGT-3' R: 5'-AGCAGGCTGTGGGCAAGGTAAC-3'	133 bp	57 °C
egér	<i>Mmp2</i>	F: 5'-ACCACCGAGGACTATGAC-3' R: 5'-TGTTGCCCAGGAAAGTGA-3'	121 bp	60 °C
egér	<i>Mmp9</i>	F: 5'-TGCCCTAGTGAGAGACTCTACA-3' R: 5'-CAGCGGTAACCATCCGA-3'	128 bp	60 °C
egér	<i>Pdgfb</i>	F: 5'-CTGGGCGCTCTTCCTTCCTCTC-3' R: 5'-CCAGCTCAGCCCCATCTTCATC-3'	170 bp	60 °C
egér	<i>Tgfb1</i>	F: 5'-GTGCGGCAGCTGTACATTGACTTT-3' R: 5'-GGCTTGCGACCCACGTAGTAGAC-3'	239 bp	60 °C
egér	<i>Timpl</i>	F: 5'-CACGGGCCCGCTAAGGAAC-3' R: 5'-CGTGGCAGGCAAGCAAAGTG-3'	249 bp	58 °C
egér	<i>Timp2</i>	F: 5'-TGCCCTGGCACACGCTTAGC-3' R: 5'-GTACCACGCGCAAGAACCATCA-3'	221 bp	58 °C

3.11. Enzimhez-kötött ellenanyag-vizsgálat (ELISA)

A humán szérum IL-24 szint meghatározás szendvics ELISA módszerrel történt a gyártó (Cloud-Clone Corp., Houston, Texas, USA) protokolljának megfelelően. A gyártó által humán IL-24 specifikus antitesttel coatolt ELISA plate-re felvittük a standard IL-24 hígítási sort (100 µl/well), valamint a humán szérummintákat (100 µl/well). Egy órás inkubációt követően a plate-et a gyártó által biztosított mosópufferrel mostuk (200 µl/well), majd jelöletlen IL-24 specifikus detekciós antitesttel (100 µl/well) inkubáltuk egy órán keresztül. Mosási lépést követően HRP enzim konjugált, a detekciós antitestre specifikus másodlagos antitesttel (100 µl/well) inkubáltuk a mintákat egy órán keresztül. Ezt követően 3,3',5,5'-tetramethylbenzidint (Cloud-Clone Corp., Houston, Texas, USA) szubsztrátot (90 µl/well) adtunk minden wellhez, és 20 percig sötétben inkubáltuk. Az enzim-szubsztrát reakciót 2N kénsav (H₂SO₄) oldat (50 µl/well) hozzáadásával állítottuk le. A minták abszorbanciáját Hidex Chameleon Microplate Reader (Triathler, Plate

Chameleon, 300SL Lablogic Systems, Inc., Brandon, FL, USA) spektrofotométerrel határoztuk meg 450nm-es hullámhosszon. Az eredményeket MikroWin 2000 software segítségével értékeltük ki. Az IL-24 koncentrációt a standard kalibrációs görbe alapján számítottuk ki.

3.12. Áramlási citometria (FACS)

A HT-29 és HK-2 sejteket szobahőmérsékleten centrifugáltuk (2000g, 5 perc), PBS-el mostuk, majd 10 percig inkubáltuk FACS Permeabilizing Solution 2-vel (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). A permeabilizált sejteket PBS-el mostuk, és anti-TGF- β 1 (sc-146, nyúl, Santa Cruz), illetve anti-PDGF-B (sc-7878, nyúl, Santa Cruz) antitesttel 1:50 hígításban szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk. A sejteket ezután ismét FACS Permeabilizing Solution 2-vel mostuk, majd Alexa Fluor 568 szekunder antitesttel (A10042 számár anti-nyúl IgG, 1:200 hígítás, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 30 percig, szobahőmérsékleten inkubáltuk. A negatív kontrollként szolgáló mintákat csak szekunder antitesttel jelöltük. Ezt követően a sejteket ismét FACS Permeabilizing Solution 2-vel mostuk, centrifugáltuk (800g, szobahőmérséklet, 7 perc), majd PBS-ben reszuszpendáltuk. Az analízist a BD FACSAriaTM cytometerrel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) végeztük. Az élő sejteket méret (forward scatter) és granuláltság szerinti (side scatter) szórás alapján határoztuk be. Minden kezelési csoport minden mintáiból 10-10 ezer sejtet számoltunk le, az eredményeket pedig a BD FACSDiva Software (Becton Dickson Co., San Jose, CA, USA) segítségével elemeztük.

3.13. Fehérje izolálás és Western blot

A vizsgált humán és egér colon biopsziás mintákat 50mM HEPES, 150mM NaCl, 1% Triton-X-100, 5mM EDTA, 5mM glikol-bisz(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraecetsav (EGTA), 20mM nátrium-pirofoszfát, 20mM nátrium-fluorid (NaF), 0,2mg/ml fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF), 10 μ g/ml leupeptin és 10 μ g/ml aprotinin (pH 7,4) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) tartalmú lízis pufferben homogenizáltuk (FastPrep FP120 homogenizátor, Qbiogene Inc, Cedex, Franciaország). A homogenizált mintákat centrifugáltuk (10000g, 5 perc, 4°C), majd a felülúszó összfehérje koncentrációját spektrofotometriás módszer, DC Protein Assay (Bio-Rad

Laboratories, Hercules, CA, United States) segítségével határoztuk meg. A fehérje mintákat denaturáltuk (95°C, 5 perc), majd 4-20%-os gradiensű nátrium-dodecil-szulfát (SDS) tartalmú poliakrilamid gélben elektroforetizáltuk (20µg/minta/zseb), 120 V feszültség mellett (~40mA) 60 percig (Penguin™ Dual-Gel Water Cooled Systems, Owl, NH, USA). Markerként ismert molekulásúlyú fehérjék keverékét használtuk (BenchMark™, Gibco/BRL, Eggenstein, Németország). Ezt követően az SDS-poliakrilamid gélről nitrocellulóz membránra (Bio-Rad) blottoltuk a szeparált fehérjét.

Az aspecifikus kötőhelyek és kölcsönhatások gátlásához a blotmembránokat 1 órán át 5% zsírszegény tejport tartalmazó 1x-es PBS pufferben, óvatos rázás mellett inkubáltuk, majd Il-24 (ab182567 nyúl polyclonalis IgG, 1:1000 hígítás, Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság), α -SMA (sc-53015, 1:10000 hígítás, Santa Cruz), fibronectin (ab2413, 1:2000 hígítás, Abcam), pro-collagen-1 α 2 (sc-166572, 1:2000, Santa Cruz), illetve GAPDH specifikus antitesttel (sc-47724, 1:2000, Santa Cruz) 4 °C-on, egy teljes éjszakán át inkubáltuk a membránokat. Majd mosást követően peroxidáz-konjugált anti-nyúl, vagy anti-rabbit szekunder antitesttel (IgG, 1:2000 hígítás, szobahőmérséklet, 1 óra, Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA) inkubáltuk a membránokat. Ezt követően újabb mosási lépésekkel távolítottuk el a feleslegben jelen lévő, a membránokhoz be nem kötődött másodlagos ellenanyagokat. Belső kontrollként GAPDH-t alkalmaztunk.

Az immunreaktív sávokat a kemilumineszcens Western-blot-detektálási protokoll (GE Healthcare, Little Chalfont, Egyesült Királyság) segítségével jelenítettük meg, az így kapott képeket VersaDoc 5000MP rendszerrel (Bio-Rad) vizualizáltuk, majd a Quantity One v4.6.9 (Bio-Rad) és az ImageJ 1.48v (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) szoftverek alkalmazásával analizáltuk. Végül az eredményeket relatív optikai denzitásként fejeztük ki.

3.14. Statisztikai analízis

Az adatokat a GraphPad Prism 6.01 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) segítségével analizáltuk. Az adatsorok normál eloszlását Kolmogorow-Smirnov teszt segítségével határoztuk meg. Normál eloszlás esetén a csoportok közötti különbözőséget két csoport esetén 2-mintás párosítatlan t-teszttel, kettőnél több csoport esetén one-way ANOVA teszt segítségével határoztuk meg. Amennyiben a normál

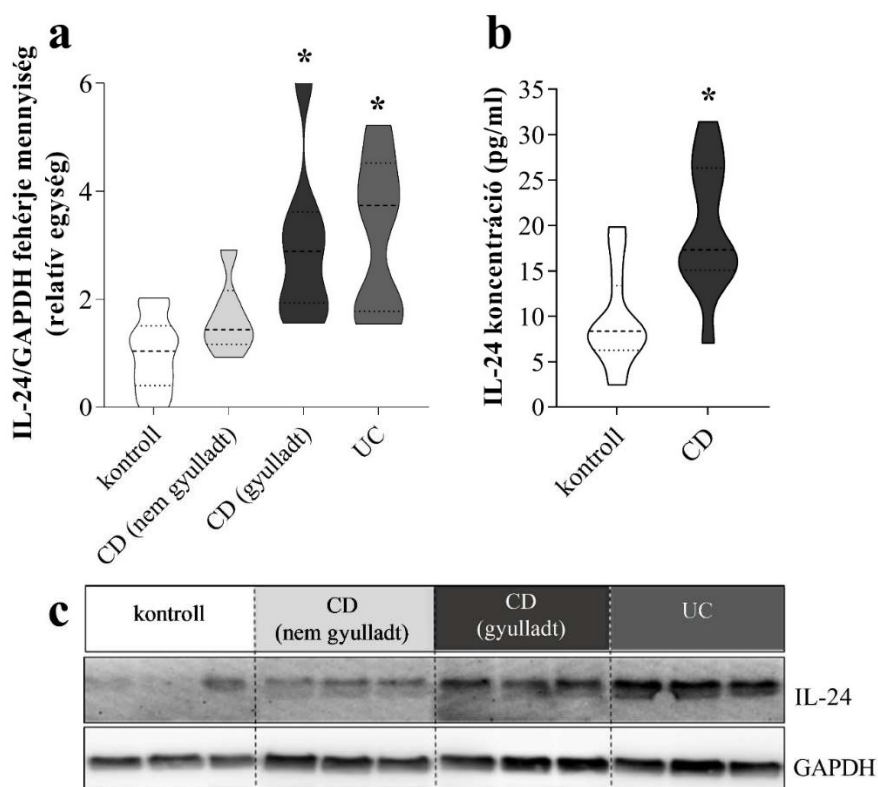
eloszlás feltétele nem teljesült, két csoport esetén Mann-Whitney-U-, több csoport esetén Kruskal-Wallis tesztet használtunk. Az MTT, LDH citotoxicitás, migrációs vizsgálat és SiriusRed festés adatainak többszörös összehasonlítását two-way ANOVA és multiple-t-teszt segítségével végeztük. Szignifikáns eltérést a $p < 0,05$ valószínűség esetén jelöltük különböző szimbólumokkal. A szemléltető grafikonokon átlag és szórás (SD) látható.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az IL-24 és receptorának vizsgálata IBD-ben szenvedő gyermekeknél

Első lépésként az IL-24 jelenlétét vizsgáltuk IBD-s és kontroll gyermekek vastagbél biopsziás és a szérumban. A gyulladt vastagbél területekből nyert biopsziás mintákban mind colitis ulcerosa, mind Crohn-betegek esetén emelkedett IL-24 fehérjeszintet találtunk a kontroll mintákhoz képest. A Crohn-betegek makroszkóposan nem gyulladt vastagbél területről nyert mintáiban az IL-24 szint nem változott a kontrollhoz képest (3. ábra/a, c).

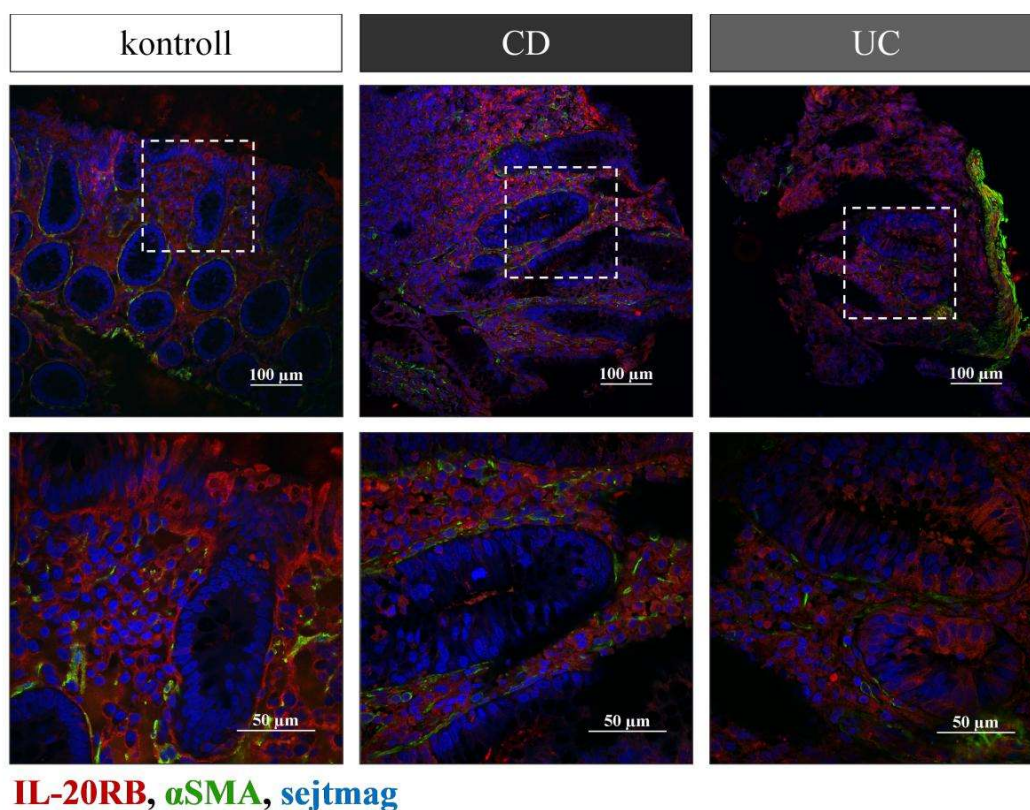
A Crohn-beteg gyermekek IL-24 szérumban szintje emelkedett volt a kontroll gyermekek szérumban szintjéhez képest (3. ábra/b).



3. ábra: Az IL-24 fehérje expressziója IBD-ben. Az IL-24 fehérjeszintjét a belső kontrollként alkalmazott GAPDH mennyiségére normalizálva határoztuk meg Crohn-betegek (n=7-10), colitis ulcerosa-s és kontroll betegek vastagbél biopsziás mintáiban Western-blot analízis segítségével (a, c). A szérumban IL-24 koncentrációját ELISA-val határoztuk meg kontroll (n=12) és Crohn-beteg (n=15) gyermekek mintáiban (b). A

diagramokon átlag + SD adatokat tüntettünk fel. * $p < 0.05$ vs. kontroll (Kruskal-Wallis teszt (a) vagy Mann-Whitney U-teszt (b))

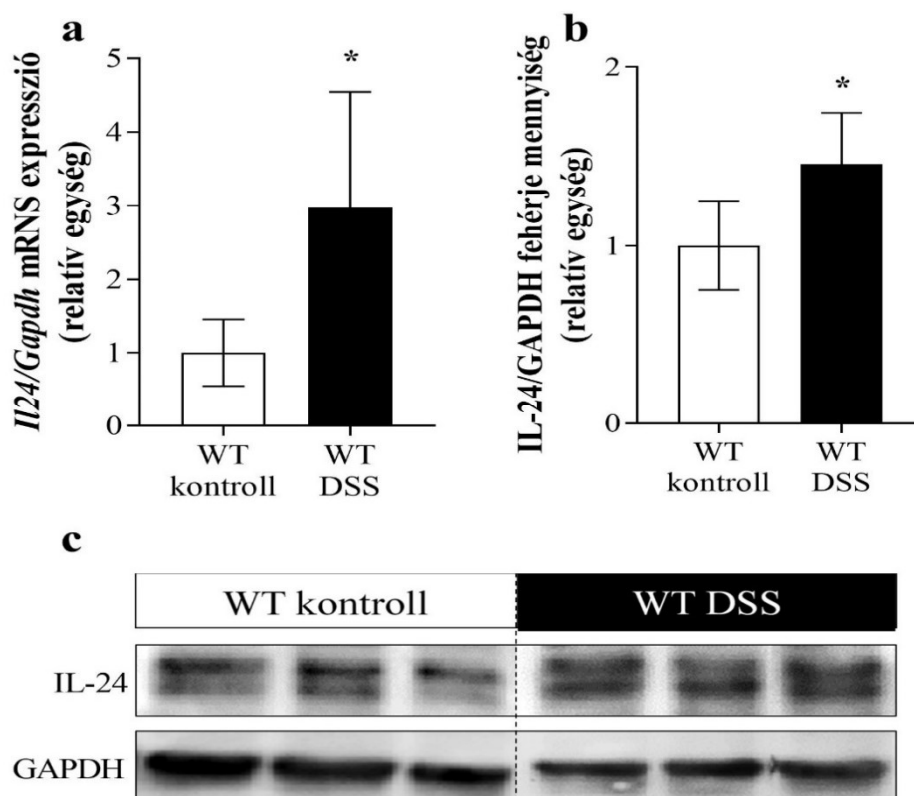
Az IL-24 biológiai aktivitását akkor tudja kifejteni, ha a célsejt expresszálja az IL-24 heterodimer receptorainak IL-20RB alegységét. A 4. ábrán reprezentatív immunfluoreszcens képek láthatóak a kontroll (12 éves lánygyermek, colon polyp), a frissen diagnosztizált Crohn-betegségben (17 éves fiúgyermek, PCDAI:65), illetve colitis ulcerosában (8 éves fiúgyermek, PUCAI:20) szenvedő gyermekek vastagbél nyálkahártyájában. Az IL-20RB immunopozitivitás mind a kontroll, mind a betegek vastagbél biopsziás mintáiban egyaránt jelen van a lamina propria rétegében, az epitel sejtek basalis régiójában és a subepitélialis fibroblasztokban (4. ábra).



4. ábra: Az IL-24 receptorának (IL-20RB) lokalizációja IBD-ben. Az IL-20RB (piros) és az α SMA (zöld) lokalizáció immunfluoreszcens festéssel kontroll és IBD-s gyermekek vastagbél nyálkahártyájában. A sejtmagokat Hoechst33342 festéssel (kék) vizualizáltuk. Nagyítás: 100 μ m és 50 μ m.

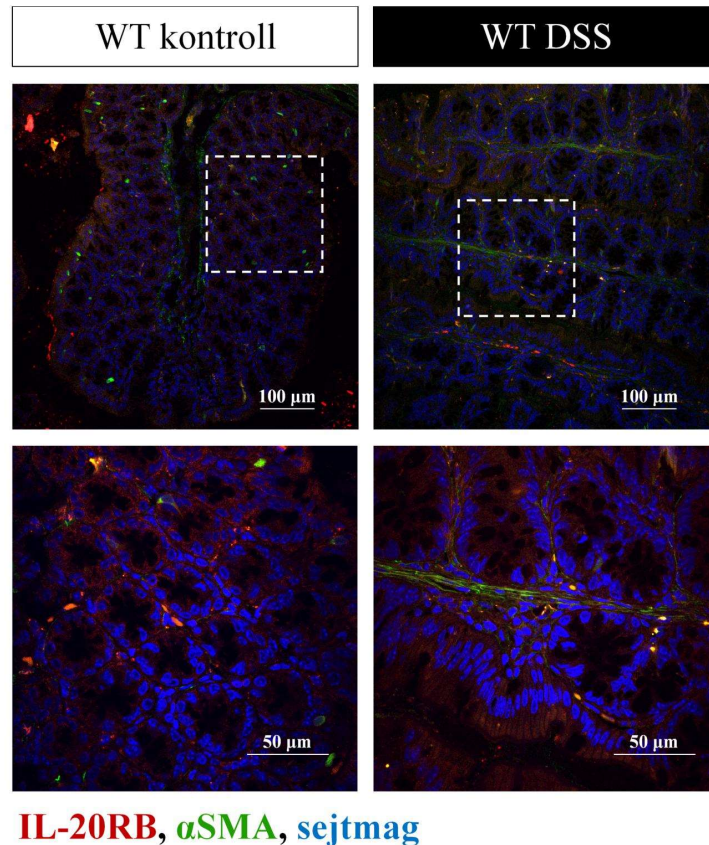
4.2. Az IL-24 és receptorának vizsgálata DSS indukált colitisben

Az IL-24 bélrendszerben betöltött szerepének további tanulmányozása céljából DSS indukált egércolitis modellben megvizsgáltuk az IL-24 jelenlétét mRNS és fehérje szinten, továbbá meghatároztuk az IL-24 receptorának (IL-20RB) szöveti lokalizációját. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy DSS kezelés hatására megemelkedett az IL-24 mRNS expressziója (5. ábra/a) és fehérje szintje (5. ábra/b, c).



5. ábra: IL-24 expresszió DSS egérmodellben. IL-24 mRNS és fehérje expresszió (n=6) meghatározás real-time PCR (a), és Western blot analízis (b, c) eljárással GAPDH belső kontroll mellett. A diagramokon átlag + SD adatokat tüntettünk fel * $p < 0.05$ vs. WT kontroll (Mann-Whitney U-teszt).

Az IL-20RB immunopozitivitás mind a DSS indukált, mind a kontroll egerek vastagbél nyálkahártyájában egyaránt jelen van a lamina propria rétegében, az epitel sejtek basalis régiójában és a subepitélialis fibroblasztokban (6. ábra).

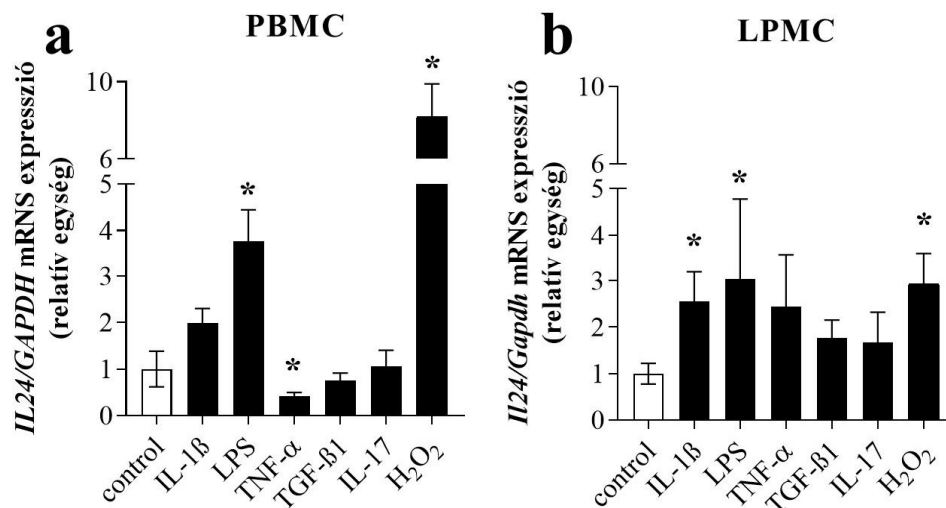


6. ábra: IL-20RB vizsgálata DSS egérmodellben: Az IL-20RB (piros) és α SMA (zöld) lokalizáció immunfluoreszcens festéssel kontroll és DSS kezelt egerek colon nyálkahártyájában. Sejtmagokat Hoechst33342 festéssel (kék) vizualizáltuk. Nagyítás: 100 μ m és 50 μ m

4.3. Gyulladásos faktorok hatása a mononuklearis sejtek (PBMC és LPMC) IL-24 szintézisére

Megvizsgáltuk, hogy milyen molekuláris biológiai folyamatok vezethetnek az IL-24 szintjének emelkedéséhez IBD-ben, ezért az IBD patomechanizmusában jól ismert gyulladásos faktorokkal kezelt mononuklearis sejteken (PBMC, LPMC) vizsgáltuk azok hatását az IL-24 expressziójára (7. ábra).

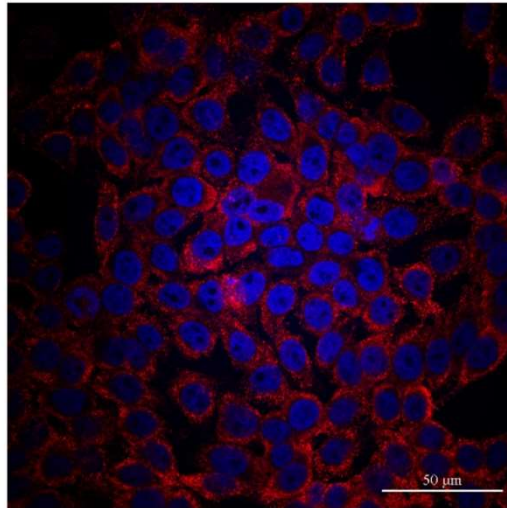
Míg az IL-1 β , LPS és H₂O₂ kezelés növelte a mind a PBMC-k, mind az LPMC-k IL-24 mRNS expresszióját, addig a TNF- α csökkentette a PBMC-k IL-24 expresszióját a kontroll, vehikulummal kezelt sejtekéhez képest. A TGF- β 1 és IL-17 kezelés nem volt hatással a PBMC, illetve LPMC sejtek IL-24 expressziójára (7. ábra).



7. ábra: A PBMC és LPMC mononukleáris sejtekben mért relatív IL-24 mRNS expresszió változása különféle gyulladásozó faktorok hatására. A sejtek IL-24 szintjét IL-1 β , LPS, TNF- α , TGF- β 1, IL-17 and H₂O₂ (n=6) kezelést követően valós idejű PCR-rel határoztuk meg; belső kontrollként a GAPDH expresszióját is meghatároztuk. A diagramokon átlag + SD adatokat tüntettünk fel. *p<0.05 vs. kontroll (Kruskal-Wallis teszt)

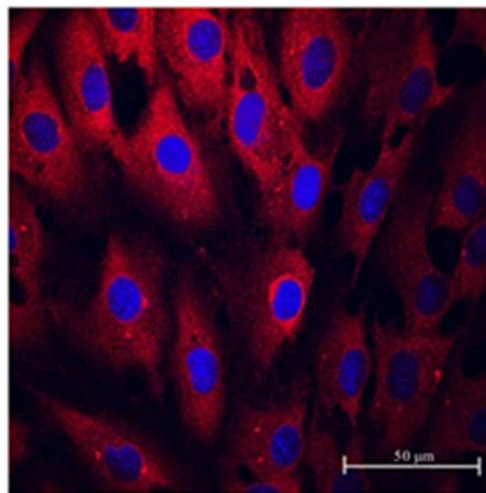
4.4. Az IL-24 hatásának vizsgálata a HT-29 colon és a HK-2 vese epitél sejteken

A következő lépésben megvizsgáltuk, hogy a HT-29 colon epitél és a HK-2 vese proximális tubulus epitél sejteken megtalálható-e az IL-20RB receptor alegység (8. ábra, 9. ábra). Immunfluoreszcens jelölést követően azt találtuk, hogy mind a két sejtvonal kifejezi az IL-24 receptorainak közös alegységét, az IL-20RB-át.



IL-20RB, sejtmag

8. ábra: HT-29 sejt immunfluoreszcens festés. A HT-29 colon epitél sejtek IL-20RB immunopozitívak voltak (piros). A sejtmagok kék színnel (Hoechst 33342) ábrázolódnak. Skála: 50 µm.

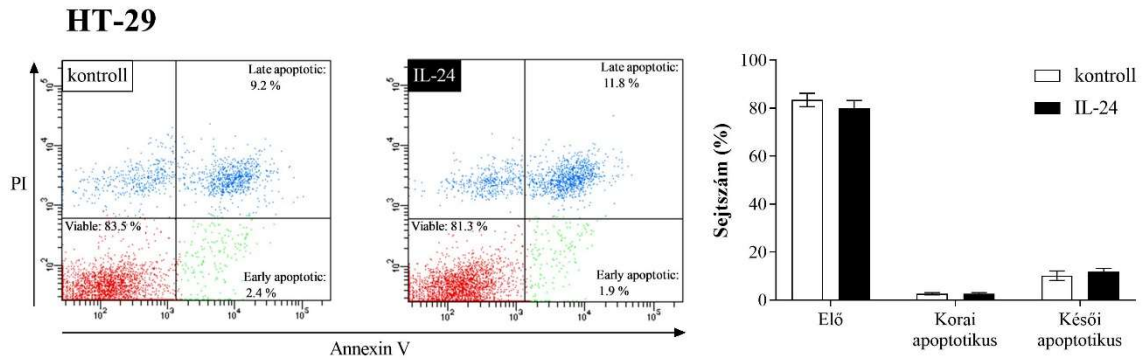


IL-20RB, sejtmag

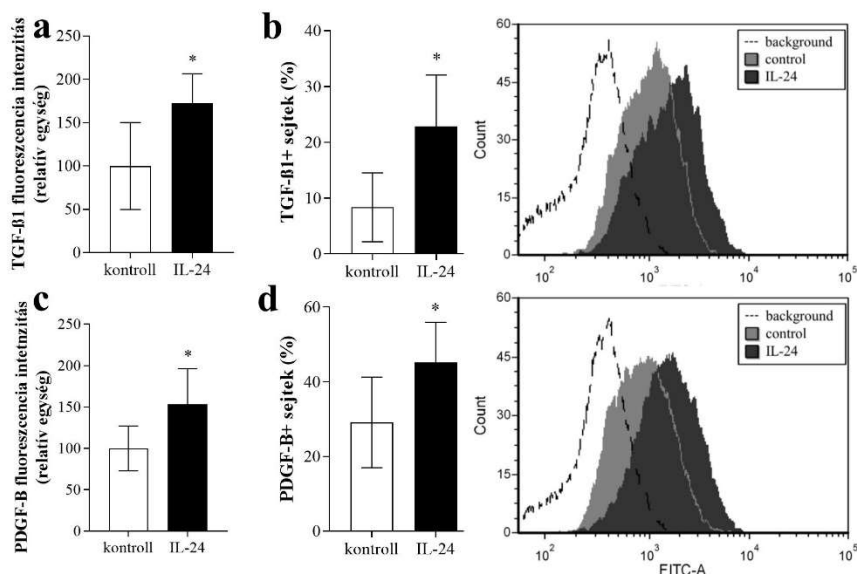
9. ábra: HK-2 sejt immunfluoreszcens festés. A HK-2 vese proximális tubulus epitél sejtek IL-20RB immunopozitívak voltak (piros). A sejtmagok kék színnel (Hoechst 33342) ábrázolódnak. Skála: 50 µm.

A továbbiakban a HT-29 colon és a HK-2 vese proximális tubulus epitél sejteken vizsgáltuk az IL-24 kezelés hatását.

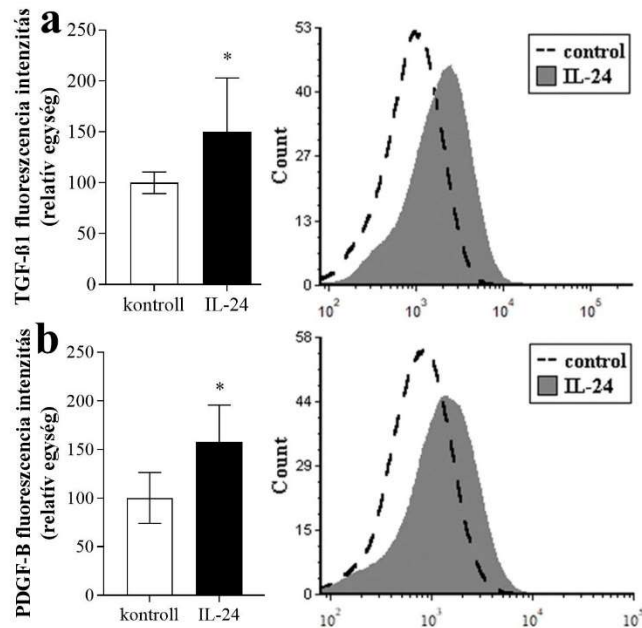
Az IL-24 kezelés nem befolyásolta a HT-29 colon epítél sejtek életképességét (10. ábra). Ugyanakkor az IL-24 kezelés fokozta a HT-29 és a HK-2 sejtek TGF- β 1 (11. ábra/a, 12. ábra/a) és PDGF-B (11. ábra /c, 12. ábra/b) termelését, illetve a TGF- β 1 + (11. ábra/b) és a PDGF-B + sejtek (11. ábra/d) arányát.



10. ábra: Az IL-24 hatása a HT-29 colon epítél sejtek életképességére. Az apoptoikus sejtek aránya Annexin V vizsgálat során (n=6). A diagramokon átlag + SD adatokat tüntettünk fel. Az IL-24 kezelés hatására nem történt szignifikáns változás az egyes viabilitás kategóriába tartozó sejtek arányában (Mann-Whitney U-teszt)



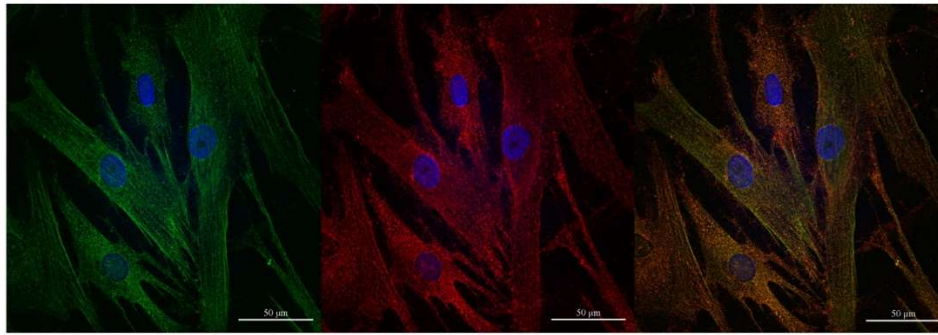
11. ábra: Az IL-24 hatása a HT-29 colon epítél sejteken. IL-24 kezelést követő TGF- β 1 (a) és PDGF-B (c) fluoreszcencia intenzitás, és a TGF- β 1 + (b) és PDGF-B + (d) sejtek aránya, áramlási cytometriás mérés során (n=6). A diagramokon átlag + SD adatokat tüntettünk fel *p<0.05 vs. kontroll (Mann-Whitney U-teszt)



12. ábra: Az IL-24 hatása a HK-2 vese proximalis tubulus epitél sejteken. IL-24 kezelést követő TGF-β1 (a) és PDGF-B (b) fluoreszcencia intenzitás áramlási cytometriás mérés során (n=6). A diagramokon átlag + SD adatokat tüntettünk fel *p<0.05 vs. kontroll (Mann-Whitney U-teszt)

4.5. Az IL-24 hatás vizsgálata a CCD-18Co colon fibroblaszt sejteken

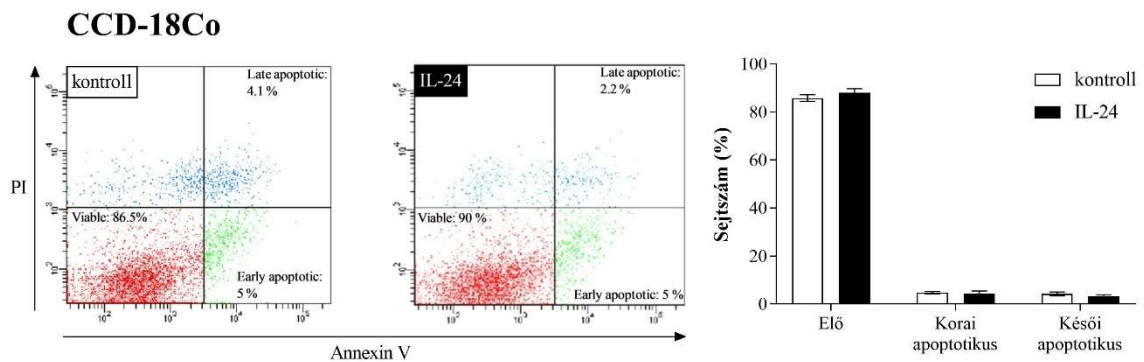
Az előző vizsgálatoknak megfelelően az IL-20RB jelenlétét a CCD-18Co fibroblaszt sejteken is megvizsgáltuk (13. ábra).



αSMA, IL-20RB, sejtmag

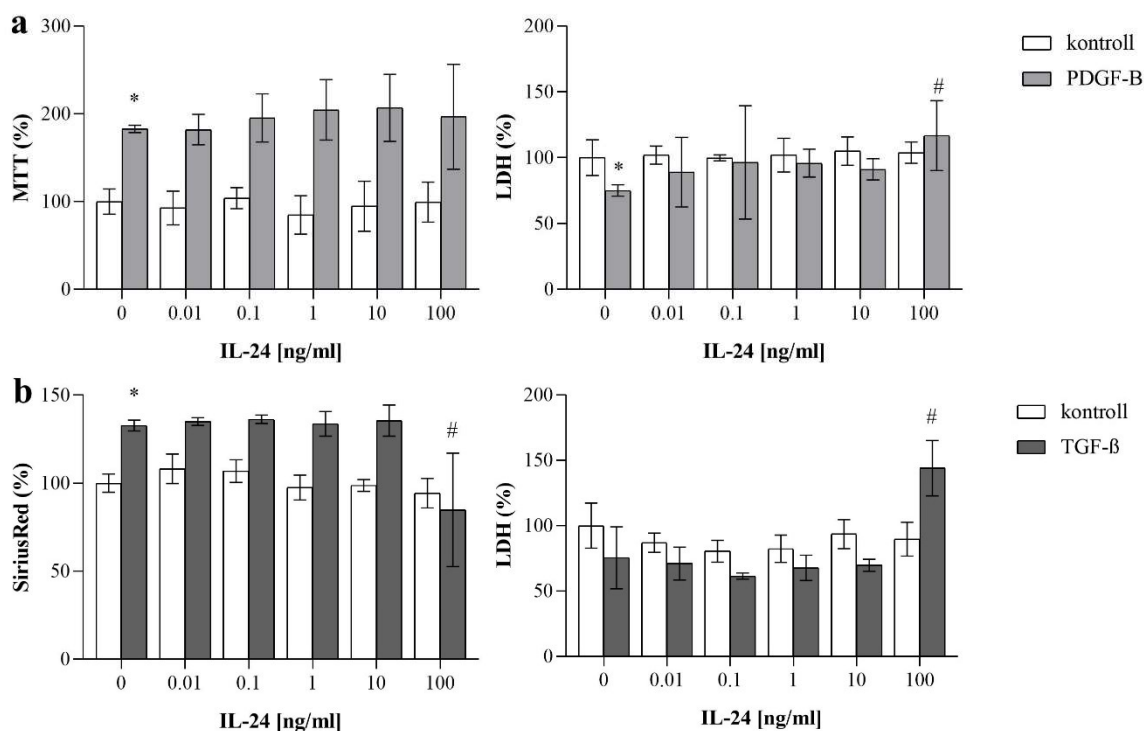
13. ábra: A CCD-18Co colon fibroblasztok IL-20RB (piros) és αSMA (zöld) immunopozitívak voltak (piros). Sejtmagok kék színnel jelölve (Hoechst33342) Nagytítás: 50 μm.

Az IL-24 kezelés nem volt hatással a fibroblaszt sejtek életképességére (14. ábra).



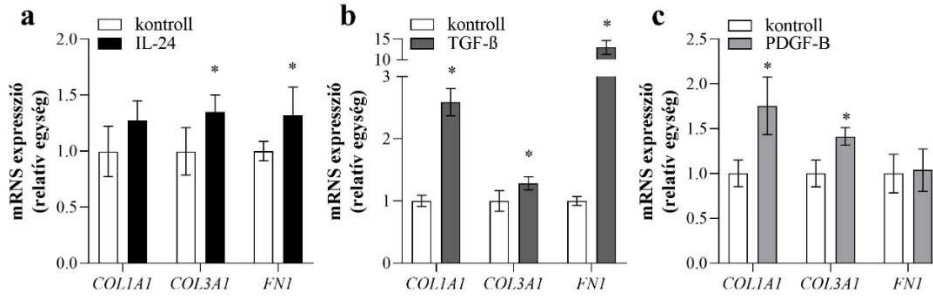
14. ábra: CCD-18Co colon fibroblaszt életképesség vizsgálat. Az apoptotikus sejtek aránya Annexin V vizsgálat során (n=6). A diagramokon átlag + SD adatokat tüntettünk fel. Az IL-24 kezelés hatására nem történt szignifikáns változás az egyes viabilitás kategóriába tartozó sejtek arányában (Mann-Whitney U-teszt)

Az IL-24 kezelés nem volt hatással a fibroblaszt sejtek proliferációjára, illetve eredő extracelluláris mátrix termelésére (15. ábra).

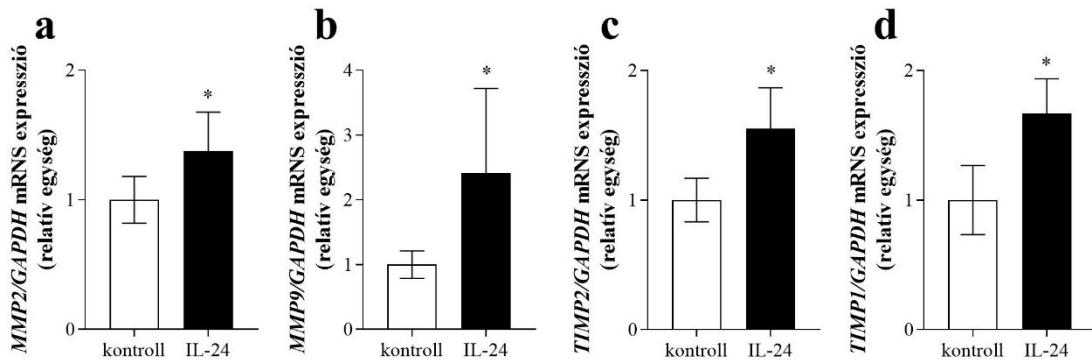


15. ábra: IL-24 hatása a CCD-18 Co fibroblaszt sejtek proliferációjára és a sejten belüli kollagén lerakódásra. A PDGF-B kezelt CCD-18Co sejtek proliferációját MTT teszttel vizsgáltuk (a) (n=5). A TGF-β kezelt sejtek kollagén termelését (b) SiriusRed teszt segítségével becsültük meg (n=5). A citotoxicitás mértékét az alkalmazott kezelések mellett a sejtek felülúszójának LDH meghatározásával vizsgáltuk (n=5). Az eredményeket a kezeletlen sejtek arányában ismertettük (0 ng/ml IL-24 control) átlag±szórás. *p<0.05 vs. *kontroll* (0 ng/ml IL-24) (multiple t-teszt), #p<0.05 vs. *PDGF-B/TGF-β* (0 ng/ml IL-24) (two-way ANOVA)

Az IL-24 kezelés fokozta a sejtek *COL3A1* és *FNI* (16. ábra), illetve *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* és *TIMP2* mRNS expresszióját a kontroll csoporthoz képest (17. ábra/a-d).

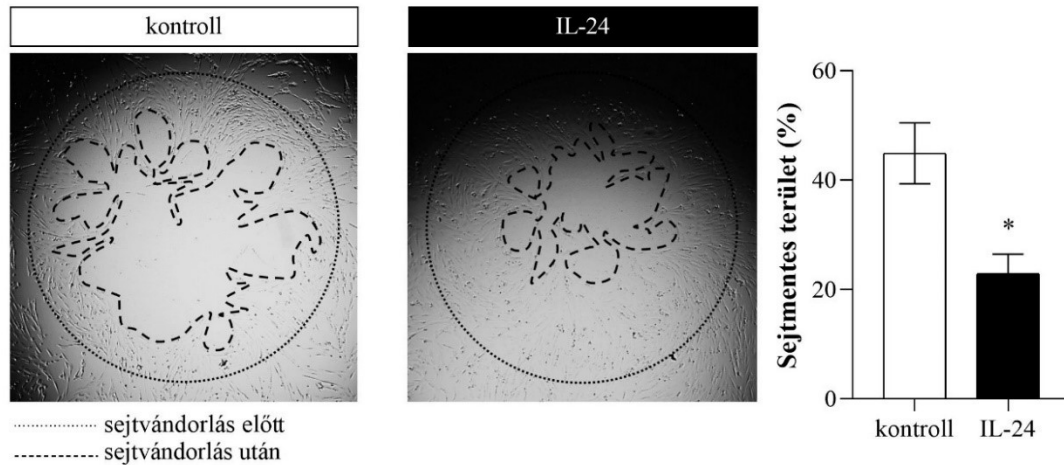


16. ábra: Az IL-24, a TGF-β és a PDGF-B kezelés hatása az ECM termelésre a CCD-18Co colon fibroblaszt sejteken. A CCD-18Co colon fibroblaszt sejtek IL-24 (a), TGF-β (b) és PDGF-B (c) kezelése és *COL1A1*, *COL3A1* és *FN1* mRNS expresszió meghatározása real-time PCR-rel, GAPDH belső kontroll mellett (n=6). A diagramokon átlag + SD adatokat tüntettünk fel. *p<0.05 vs. kontroll (Mann-Whitney U-test)



17. ábra: Az IL-24 hatása a CCD-18 Co sejtekre. A CCD-18Co colon fibroblaszt sejtek *MMP2* (a), *MMP9* (b), *TIMP1* (c) and *TIMP2* (d) mRNS expresszióját valós idejű PCR-rel határoztuk meg, *GAPDH* belső kontroll mellett (n=6). A diagramokon átlag + SD adatokat tüntettünk fel. *p<0.05 vs. kontroll (Mann-Whitney U-test)

Továbbá az IL-24 kezelés fokozta a sejtek migrációs tevékenységét (18. ábra).

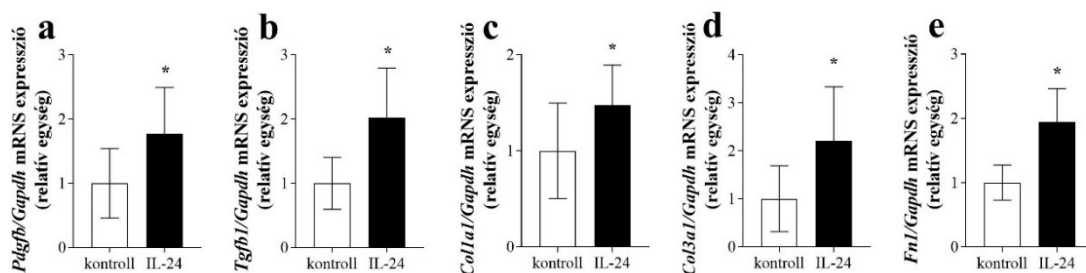


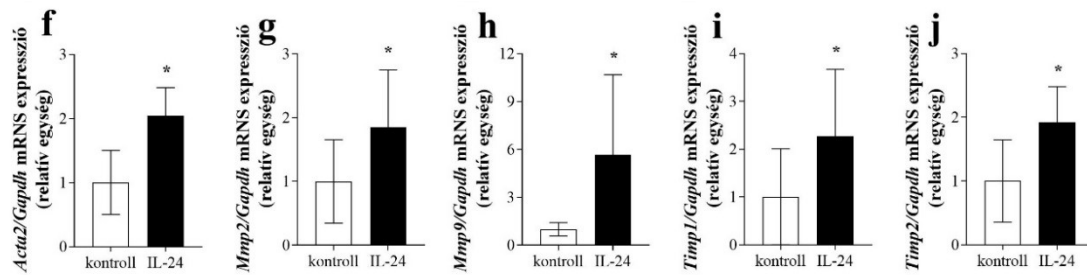
18. ábra: A CCD-18 Co sejtek migrációját a sejtmentes területek méretének összehasonlításával vizsgáltuk az IL-24 kezelt, illetve a kezeletlen kontroll sejtekben. A diagramokon átlag + SD adatokat tüntettünk fel. * $p < 0.05$ vs. kontroll (Mann-Whitney U-test)

4.6. Az IL-24 hatása a szöveti átrendeződésben szerepet játszó különböző faktorokra vad típusú egerek colon nyálkahártyájában

Az IL-24 szöveti átrendeződésre gyakorolt hatásának *in vivo* vizsgálata céljából kísérleteink során az egerek vastagbél nyálkahártyájába IL-24-et injektáltunk.

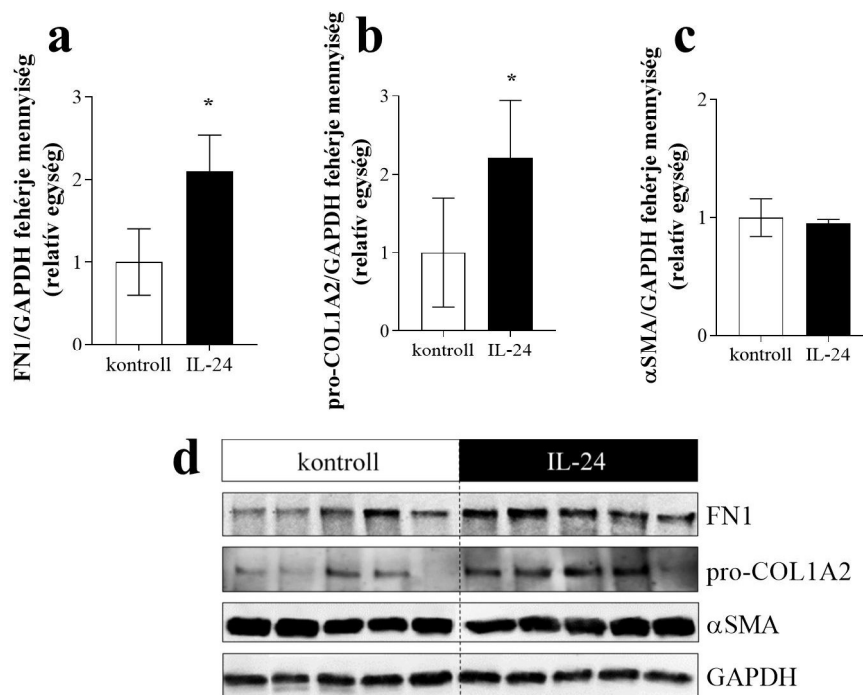
Az IL-24 kezelés fokozta a *Pdgfb*, *Tgfb1*, *Coll1a1*, *Col3a1*, *, *Acta2*, *Mmp2*, *Mmp9*, *Timp1* és *Timp2* mRNS expresszióját a vehikulum kezelt kontrollokhoz képest (19. Ábra/a-j).*





19. ábra: A szöveti átrendeződésben ismert faktorok vizsgálata WT egerekben IL-24 kezelést követően. *Pdgfb* (a) *Tgfb1* (b), *Colla1* (c), *Col3a1* (d), *Fnl* (e), *Acta2* (f), *Mmp2* (g), *Mmp9* (h), *Timp1* (i) és *Timp2* (j) mRNS szintek meghatározása valós idejű PCR-rel, GAPDH belső kontroll mellett (n=6). A szemléltető grafikonokon átlag és szórás (SD) látható. * $p < 0.05$ vs. WT kontroll (Mann-Whitney U-test)

Az IL-24 kezelés hatására az FN1 és pro-COL1A2 fehérje mennyisége nőtt a kontroll csoporthoz képest (20. ábra/a-d).

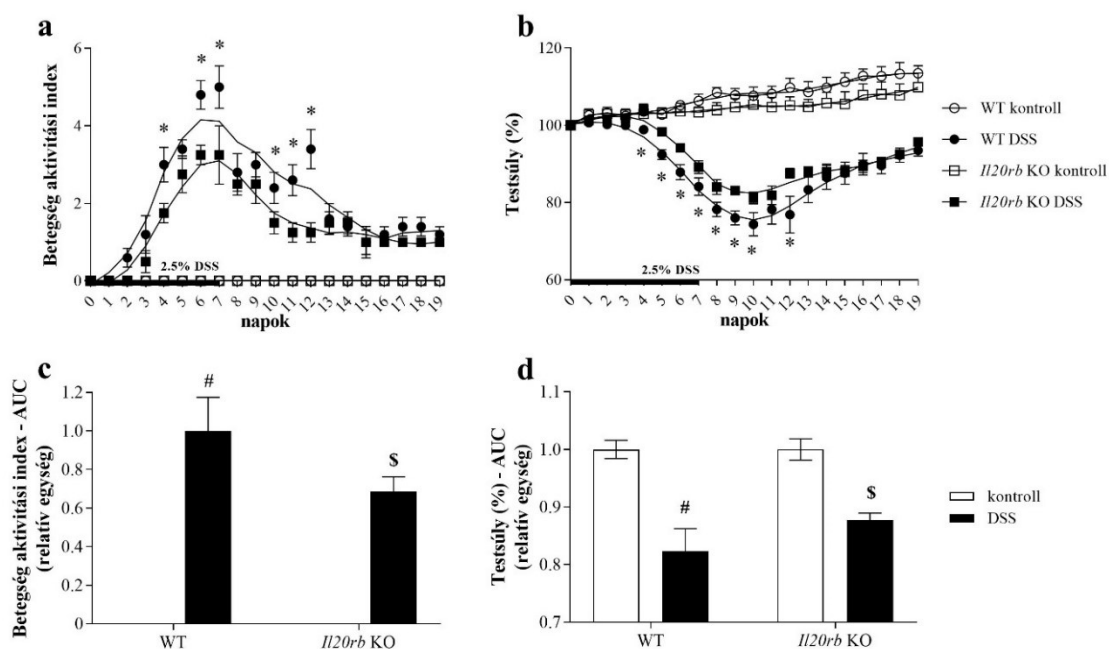


20. ábra: A szöveti átrendeződésben ismert faktorok vizsgálata WT egerekben IL-24 kezelést követően. Fibronectin (FN1) (a, d), pro-collagen I alpha2 típus (pro-COL1A2) (b, d), α SMA (c, d) fehérje szintek meghatározása Western blot analízissel. A

szemléltető grafikonokon átlag és szórás (SD) látható. * $p < 0.05$ vs. WT kontroll (Mann-Whitney U-teszt)

4.7. Vad típusú és *Il20rb* KO egerek testsúlyának és betegség aktivitási indexének változása DSS kezelés mellett

Kísérleteink következő lépéseként megvizsgáltuk az IL-24 receptorának, az *Il20rb* hiányának hatását az egerek DSS indukálta vastagbélgyulladására. Megfigyeltük az egerek betegség aktivitási indexének, illetve testsúlyának változását mind a WT, mind az *Il20rb* KO DSS kezelt egerek csoportjában. A DSS kezelés mindkét csoportban növelte a betegség aktivitási indexét (21. ábra/a, c), és csökkentette az egerek testsúlyát (21. ábra/b, d). Ugyanakkor az *Il20rb* KO csoport egereinél a DSS kezelés indítása után több napig és a kezelési idő alatt összességében is enyhébb tüneteket figyeltünk meg, az állatok testsúlyának csökkenése is kisebb mértékű volt (21. ábra/a-d).



21. ábra: DSS-indukált vastagbélgyulladás súlyossága WT és *Il20rb* KO egerekben.

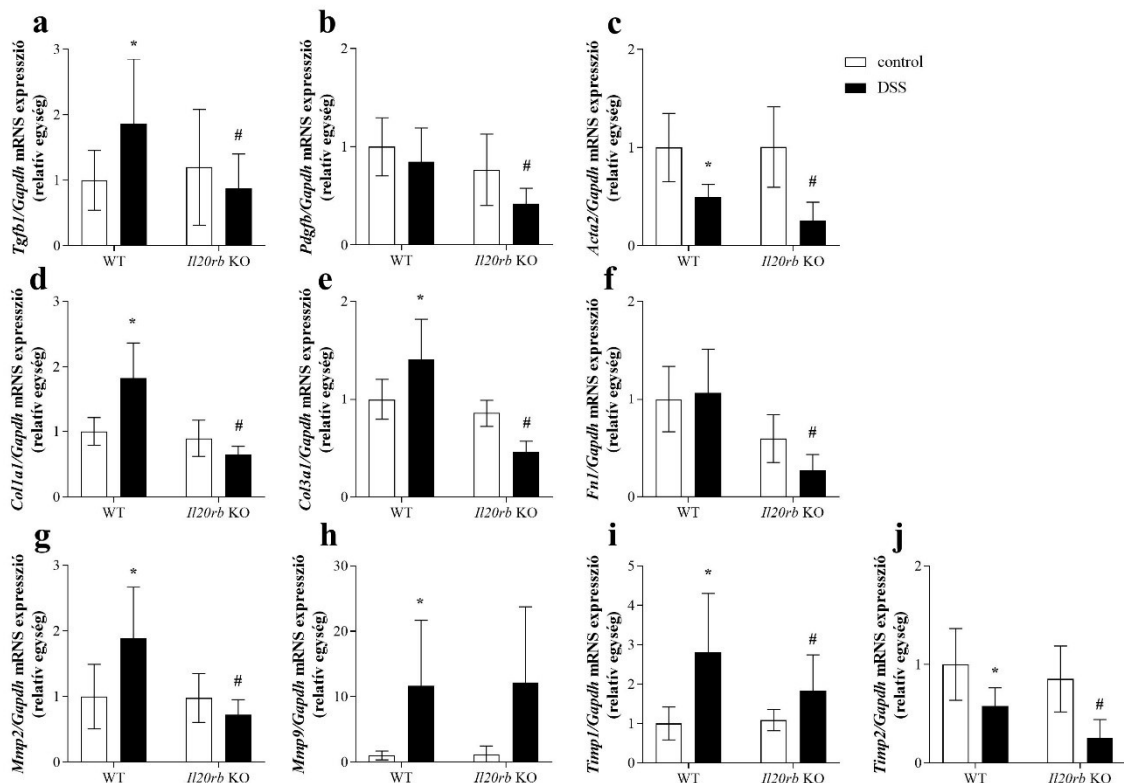
Az egerek betegség aktivitási indexének (a) és az egyes csoportok testsúlyának százalékos változása a kiindulási tömegükhöz képest (b) 19 napon át követve ($n=6$ /csoport). Az ábra mindegyik pontja átlag értéket \pm szórást mutat. * $p < 0.05$ WT DSS vs. *Il20rb* KO DSS ugyanazon a napokon vizsgálva (Mann-Whitney U-teszt). Átlag \pm

szórás görbe alatti terület (AUC) testsúly értékek(c) és betegség aktivitási indexek (d). #p<0.05 vs. WT kontroll; \$p<0.05 vs. WT DSS (Mann-Whitney U-teszt)

4.8. A szöveti átépülésben szerepet játszó faktorok vizsgálata a DSS kezelt WT, illetve *Il20rb* KO egerek vastagbél nyálkahártyájában

A WT, illetve *Il20rb* KO egerek vastagbelében megvizsgáltuk a szöveti átrendeződésben szerepet játszó faktorok szintézisében a DSS kezelés hatására bekövetkező molekuláris biológiai változásokat.

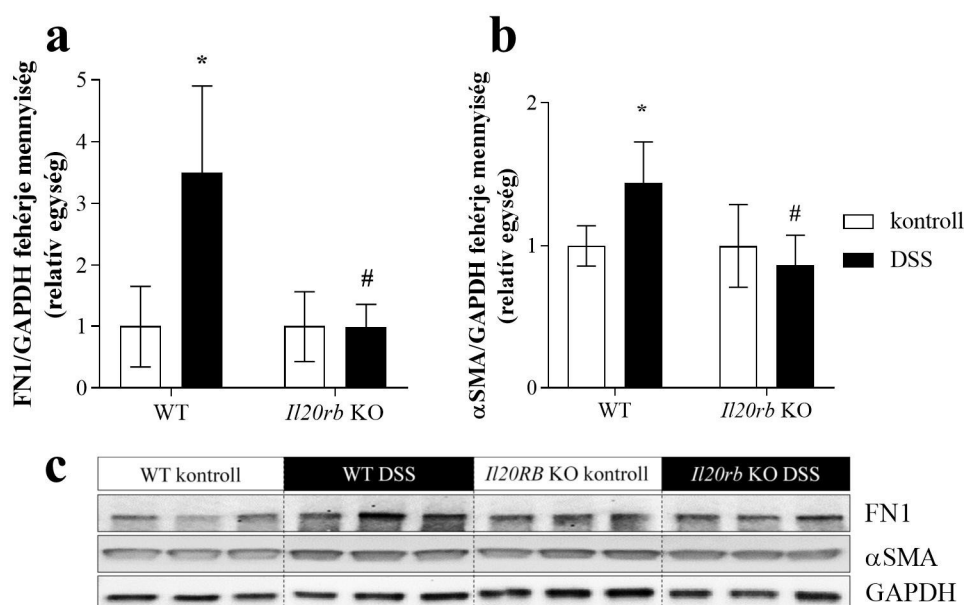
A WT csoportban a DSS kezelés a *Tgfb1*, *Colla1*, *Col3a1*, *Mmp2*, *Mmp9* és *Timp1* expresszióját növelte, míg az *Acta2* és *Timp2* expresszió csökkent a kezeletlen csoporthoz képest. Az IL-20 receptor hiányában DSS kezelés során alacsonyabb expressziót mértünk a *Tgfb1*, *Pdgfb*, *Colla1*, *Col3a1*, *Fnl*, *Acta2*, *Mmp2*, *Timp1* és *Timp2* mRNS expressziója a WT csoporthoz képest. (22. Ábra)



22. ábra: Szöveti átépülésben szerepet játszó faktorok vizsgálata DSS kezelt WT vs. *Il20rb* KO egerek csoportjában. *Tgfb1* (a), *Pdgfb* (b), *Acta2* (c), *Colla1* (d), *Col3a1* (e), *Fnl* (f), *Mmp2* (g), *Mmp9* (h), *Timp1* (i) és *Timp2* (j) mRNS expresszió meghatározás valós-idejű PCR-rel, *GAPDH* belső kontroll (n=6) mellett. A szemléltető grafikonokon

átlag és szórás (SD) látható. * $p < 0.05$ vs. WT kontroll; # $p < 0.05$ vs. WT DSS (Mann-Whitney U-teszt)

A kísérlet során mért mRNS szintű változásokhoz hasonlóan azt tapasztaltuk, hogy a DSS kezelés mellett a FN1 és az α SMA fehérje mennyisége megemelkedett a WT csoportban a DSS-sel nem kezelt kontroll WT csoporthoz képest. Az *Il20rb* KO csoportban ezen fehérjék szintje nem mutatott szignifikáns eltérést a kontroll, illetve a DSS csoportban tapasztaltak között (23. ábra).



23. ábra: Szöveti átépülésben szerepet játszó faktorok vizsgálata DSS kezelt WT vs. *Il20rb* KO egerek csoportjában. FN1 (c, d) és α SMA (c, e) fehérjemennyiség meghatározás Western-blot analízis során. A szemléltető grafikonokon átlag és szórás (SD) látható. * $p < 0.05$ vs. WT kontroll; # $p < 0.05$ vs. WT DSS (Mann-Whitney U-teszt)

5. MEGBESZÉLÉS

Az IBD két fő megjelenési formája a CD, illetve az UC. Mindkét forma a gasztrointesztinális rendszer krónikus gyulladásával jár, a betegség remissziókkal és relapszusokkal tarkított. Pontos patomechanizmusa napjainkig sem tisztázott, úgynevezett multifaktoriális betegség lévén kialakulásában genetikai, immunológiai és környezeti tényezők sajátos interakciói játszanak szerepet, melyből adódik, hogy definitív, kóroki terápiája sem megoldott. Az utóbbi évtizedekben megváltozott a betegség földrajzi előfordulása és kormegoszlása is, egyre több a gyermekkorban és az időskorban diagnosztizált eset. Ezzel párhuzamosan az IBD-ben szenvedők száma is világszerte ugrásszerűen megnőtt. A nyugati, fejlett országokban a lakosság mintegy 0,5%-a szenved IBD-ben [5]. Sajnos a kórkép egyre gyakrabban kezdődik el már a gyermekkorban [144]. Magyarországon a HUPIR adatai alapján a gyermekkorban kezdődő forma gyakorisága 2014-ben 8,7/100 000 gyermek [12], ami a súlyosabb és hosszabb betegségfolyás miatt kifejezett közegészségügyi terhet jelent. Mindezek alapján kiemelt jelentőségű a gyermekkori IBD vizsgálata, a kialakulását elősegítő tényezők azonosítása, a pontos patomechanizmus megértése.

A bélrendszer normál működésének és egészséges szerkezetének fenntartásához elengedhetetlen az immunrendszer, az epitélisejtek és a subepitélialis fibroblasztok kooperációja. IBD során a krónikus gyulladás miatt, az immunrendszer állandóan aktivált, amely miatt felborulnak a finoman hangolt szabályozási körök. Ennek következtében a fibroblasztok is állandóan aktivált állapotban vannak, ami túlzott ECM termeléshez és lerakódáshoz, malabszorpcióhoz és motilitási zavarokhoz vezet [145]. Sajnos az IBD-s betegek nagy részénél egy vagy több sebészeti beavatkozás szükséges a bélfal súlyos hegesedése miatt [146].

Az IL-24 az IL-10 citokin család, azon belül pedig az IL-20 citokin alcsoport tagja. Irodalmi adatok alapján az IL-24 a JAK és STAT1, STAT3 transzkripciós faktorok aktiválásával kontrollálja a különböző sejtek túlélését és proliferációját. Fő forrásai a monocyták, a makrofágok és a Th-2 sejtek [147]. Szerepét leírták különböző autoimmun folyamatokban, például ízületi gyulladásban, psoriasisban, de tumoros, cardiovascularis betegségekben, sebgyógyulásban, illetve vírus infekcióban is [73, 79]. (). Ismert, hogy az IL-24 adenovirális overexpressziója számos tumoros sejtvonalon apoptózist indukál [81, 82]. A sebgyógyulás során a bőrben megemelkedik az IL-24 expressziója [84], és

adenovirális overexpressziója hatékonyan csökkenti a humán keloidszövetből izolált fibroblasztok proliferációját [83]. Ezen vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy az IL-24 részt vesz a bélfal szöveti hegesedésének folyamatában is.

Korábban Andoh A., illetve Fonseca-Camarillo G. és munkatársai IBD-s felnőtt beteganyagon vizsgálták az IL-24 szerepét [75, 80]. Vizsgálataik szerint az IL-24 a colon epitél sejtekben Janus-kináz-1 (JAK-1)/STAT-3 függő útvonalon keresztül fokozza a membránkötött mucinok (MUC1, MUC3, MUC4) expresszióját. Ennek alapján azt feltételezik, hogy az IL-24 az IBD során elsősorban a mucosa integritásának fenntartásáért felel [75]. Ennek ellenére az IL-24 IBD-ben betöltött pontos biológiai szerepe az irodalomban kevésbé ismert, ezért célul tűztük ki ennek vizsgálatát kezeletlen, IBD-ben szenvedő gyermekekben.

Az irodalmi adatokhoz hasonlóan, emelkedett IL-24 szintet mértünk a kezeletlen, IBD-ben szenvedő gyermekek (3. ábra), illetve a DSS kezelt egerek (5. ábra) gyulladt vastagbél nyálkahártyájában.

Kísérleteink következő lépéseként azt vizsgáltuk, hogy az IBD-ben ismert szerepet játszó gyulladási faktorok [148], mint az IL-1 β , az LPS, a H₂O₂, a TNF- α , az IL-17 és a TGF- β miként hatnak a perifériás vér, illetve a lamina propria mononukleáris sejteinek IL-24 termelésére (7. ábra/a, b). Azt találtuk - saját kutatócsoportunk vizsgálatához [149] és más korábbi irodalmi eredményekhez [147] hasonlóan -, hogy a mononukleáris sejtek képesek IL-24 szintézisre (7. ábra). Andoh A. és munkatársai [75] által leírtakhoz hasonlóan, mi is azt láttuk, hogy az IL-1 β fokozza az IL-24 szintézisét. Azonban kísérleteink során a mononukleáris sejtek LPS, illetve H₂O₂ kezelésének hasonló vagy erősebb hatása volt azok IL-24 termelésére.

A TNF- α az irodalomból jól ismert gyulladási faktor, mely az IBD kapcsán számos citokin termelését indukálja. Kísérleteink során azonban meglepő módon azt tapasztaltuk, hogy a perifériás mononukleáris sejtek IL-24 szintézisét csökkentette (7. ábra/a). Eredményeinkhez hasonlóan Kumari S. és munkatársai is kimutatták, hogy a TNF- α által indukált NF- κ B jelátviteli útvonal gátlása után a keratinocyták IL-24 szintézise megnő, mely alapján feltételezhető, hogy a TNF- α képes az IL-24 szintézisét gátolni [150]. A TNF- α IL-24 szintézisre való gátló hatása hátterében az állhat, hogy a külső ingereknek folyamatosan kitett sejtekben - mint az immunsejtek vagy a bél epitél sejtei - a TNF- α az ABIN3, az IRAK-M, a SOCS3 és az ATF3 útvonalakon keresztül képes gátolni a különböző citokinek szintézisét, megóvva ezzel a szervezetet az

immunrendszer folyamatos túlaktiválódásától [151, 152]. Ezt az elméletet erősítik korábbi kísérleteink is, amelyek során azt tapasztaltuk, hogy míg a primer duodenális fibroblasztok TNF- α kezelése növelte azok IL-24 szintézisét, a vékonybél epitel sejtekben, amelyek folyamatosan külső ingereknek vannak kitéve, épp ellenkezőleg hatott, csökkentette azt [149]. Összegezve az eddigi megfigyeléseket és eredményeket, azt feltételezzük, hogy a TNF- α negatív visszacsatolás révén gátolja a túlzott IL-24 termelést a perifériás mononukleáris sejtekben.

A következőkben célunk az IL-24 biológiai szerepének és szabályozásának az IBD-vel járó nyálkahártya átépülésben való vizsgálata volt.

Az IL-24 kötődhet az IL-20RA/IL-20RB, valamint IL-22RA1/IL-20RB heterodimer receptor pároshoz egyaránt. Az IL-20RB alegység tehát mindkét receptor dimer alkotóeleme, ezért vizsgálataink során először ennek a közös alegységnek a jelenlétét vizsgáltuk a különböző biológiai mintákban. Azt tapasztaltuk, hogy az IL-20RB mind az IBD-s betegek (4. ábra), mind a DSS kezelt egerek (6. ábra) nyálkahártya epitel sejtjein, valamint a HT-29 colon epitel sejteken (8. ábra) egyaránt jelen van. A jelen kísérletünkkel párhuzamosan végzett, az IL-24 vesehegesedésben való szerepét vizsgáló kísérleteink során is azt tapasztaltuk, hogy a HK-2 proximális tubulus epitel sejteken is jelen van az IL-20RB (9. ábra) [153]. További kísérleteink során ezért kitüntetett figyelmet szenteltünk az IL-24 epitel sejtekre való hatásának vizsgálatára. Korábbi tanulmányok leírták, hogy az IL-20 citokin alszalád tagjai apoptózist indukálhatnak különböző daganatos és nem daganatos epitel sejteken, ezért kíváncsiak voltunk, hogy az IL-24 hat-e a sejtek életképességére [154-158]. Meglepő módon a kísérleteink során az IL-24 kezelés nem befolyásolta a HT-29 colon epitel sejtek életképességét (10. ábra).

Megvizsgálva azonban az IL-24 epitelsejtek profibrotikus faktorok termelésére való hatását azt találtuk, hogy az IL-24 fokozta mind a HT-29 sejtek TGF- β 1, mind a PDGF-B termelését (11. ábra). Hasonló eredményeket kaptunk a HK-2 vese tubulus epitel sejtek IL-24 kezelése során (12. ábra) [153]. Mindkét növekedési faktor szerepe jól ismert a szöveti átépülés folyamatában [148, 159]. Ennek megfelelően a CCD-18Co colon fibroblasztok TGF- β 1 kezelése fokozta a sejtek által termelt ECM komponenseket amint ezt az elvégzett SiriusRed teszt (15. ábra/b), illetve a fokozott *COL1A*, *COL3A1* és *FNI* mRNS expresszió (16. ábra) is igazolt. Hasonló módon a CCD-18Co fibroblasztok PDGF-B kezelése is fokozta azok proliferációját, illetve *COL1A1* és *COL3A1* expresszióját (16. ábra).

Mivel a CCD-18Co colon fibroblasztok is IL-20RB pozitívak voltak az immunfluoreszcens festés során (6. ábra), ezért kíváncsiak voltunk, hogy az IL-24 direkt módon miként hat a fibroblasztok viselkedésére. Méréseink során az IL-24 nem volt hatással sem a fibroblasztok életképességére, proliferációjára, sem azok ECM termelésére. A fibroblasztok IL-24-gyel és TGF- β 1-el vagy PDGF-B-el való együttes kezelésnek sem volt hatása a sejtek TGF- β 1, vagy PDGF-B kezelése által kiváltott proliferációjához, illetve ECM termeléséhez képest (15. ábra).

Az IL-24 kezelés ugyanakkor a TAS (transient agarose spot) teszt [160] tanulsága szerint fokozta a sejtmentes terület fibroblasztok általi kitöltésének sebességét, ami (figyelembe véve, hogy az IL-24 kezelés nem volt hatással a fibroblasztok proliferációjára), azt sugallja, hogy az IL-24 fokozza a fibroblasztok motilitását (18. ábra). Ezzel összefüggésben további eredményeink azt mutatták, hogy az IL-24 kezelés fokozta a zselatinázok, mint például az *MMP2* és *MMP9*, illetve a szöveti inhibitorainak, a *TIMP1* és a *TIMP2* expresszióját (17. ábra). Irodalmi adatok alapján ismert, hogy IBD-s betegek nyálkahártyájában fokozott az MMP-2 és MMP-9 expresszió, melynek mértéke szorosan összefügg a betegség aktivitási indexének mértékével [161, 162]. Az MMP-k egyrészt az ECM bontásáért, másrészt a különböző sejtek proliferációjáért és migrációjáért is felelnek [163, 164]. Proteolitikus hatásuk révén a különböző inaktív formájú gyulladáshoz vezető faktorokat – például az IL-1 β -t és a TNF- α -t – hasítja és ezáltal aktiválja, fokozva ezzel a gyulladás mértékét [165]. A sejtek proliferációs és migrációs képességét a TIMP-ek is befolyásolják [166-169].

In vitro eredményeink alapján feltételezzük, hogy az IL-24 részt vesz a nyálkahártya átépülésben, egyrészt azáltal, hogy a vastagbél epitél sejteiben fokozza a TGF- β és PDGF-B termelést, másrészt azzal, hogy fokozza myofibroblasztok migrációs képességét.

Végül megvizsgáltuk, hogy miként befolyásolja az IL-24 a szöveti átalakulásban szereplő faktorok szintézisét *in vivo*. Az egerek vastagbelének lokális IL-24 kezelése növelte a különböző profibrotikus faktorok, mint a *Tgfb1*, a *Pdgfb*, a *Colla1*, a *Col3a1*, az *Fn1*, az *Acta2*, az *Mmp2*, az *Mmp9*, a *Timp1* és a *Timp2* expresszióját (19. ábra) és fokozta a FN1 és pro-COL1A2 fehérje mennyiségét (20. ábra). Ez az eredmény gyulladással nem érintett vastagbélben demonstrálta az IL-24 szerepét a szöveti átépülésben, ezért az IL-24 hatását DSS kezelés mellett, *Il20rb* KO egerek bevonásával vizsgáltuk tovább [170]. Ebben a kísérleti modellben az egerek DSS kezelése okozta akut

gyulladást egy regenerációs, tehát nyálkahártya átépüléssel és hegesedéssel járó fázis követi [171-173]. A DSS kezelés mind a WT, mind az *Il20rb* KO egerek esetén súlyos tüneteket, fogyást, hasmenést, véres székletet, folyamatosan romló általános állapotot okozott. Azonban az *Il20rb* KO egerek esetén ezek a klinikai tünetek szignifikánsan enyhébbek voltak, ami arra enged következtetni, hogy az IL-20 citokin alcsalád aktivitása fokozza a vastagbélgyulladással járó panaszokat, tüneteket (21. ábra). Ezt a megállapítást tovább erősíti, hogy az *Il20rb* KO csoport esetén a szöveti átépülésben szerepet játszó citokinek, mint a *Tgfb1*, a *Pdgfb*, a *Colla1*, a *Col3a1*, az *Fn1*, az *Acta2*, az *Mmp2*, a *Timp1* és a *Timp2* expressziója a DSS kezelés hatására kisebb mértékben fokozódott, mint a WT csoportban (22. ábra). Ezek a mérési eredmények összhangban állnak a korábbi, unilaterális ureter obstrukciós (UUO) egérmódelben megállapított megfigyeléseinkkel, miszerint kisebb mértékű ECM lerakódást figyeltünk meg az *Il20rb* KO egerek fibrotikus veséjében, mint a WT kontroll egerekéiben [153].

In vivo kísérleteink során arra a következtetésre jutottunk, hogy az IL-20 citokineknek fontos és sokoldalú szerepük van a vastagbélgyulladás következtében kialakuló szöveti átépülésben. Habár az *Il20rb* KO egérmódelben az IL-19, az IL-20 és az IL-24 hiányával is számolnunk kell, összességében *in vivo* és *in vitro* eredményeink egyértelműen bizonyítják az IL-24 IBD-hez társuló szöveti hegesedésben betöltött szerepét. Eredményeinket Rao LZ és munkatársai bleomycin indukálta tüdő fibrosis módelben végzett kísérlete is alátámasztja, mely szerint az IL-24 az *Il20rb* KO egerekben alacsonyabb TGF- β expressziót, illetve csökkent ECM lerakódást figyeltek meg a WT csoporthoz képest [174].

6. KÖVETKEZTETÉSEK

PhD munkám célja az interleukin-24 molekula gyulladáshoz kapcsolódó bélbetegségek patomechanizmusában betöltött szerepének vizsgálata humán biopsziás és szérumból minták vizsgálata, valamint *in vivo* DSS-indukált colitises egérmódellet és *in vitro* sejtes kísérletek segítségével.

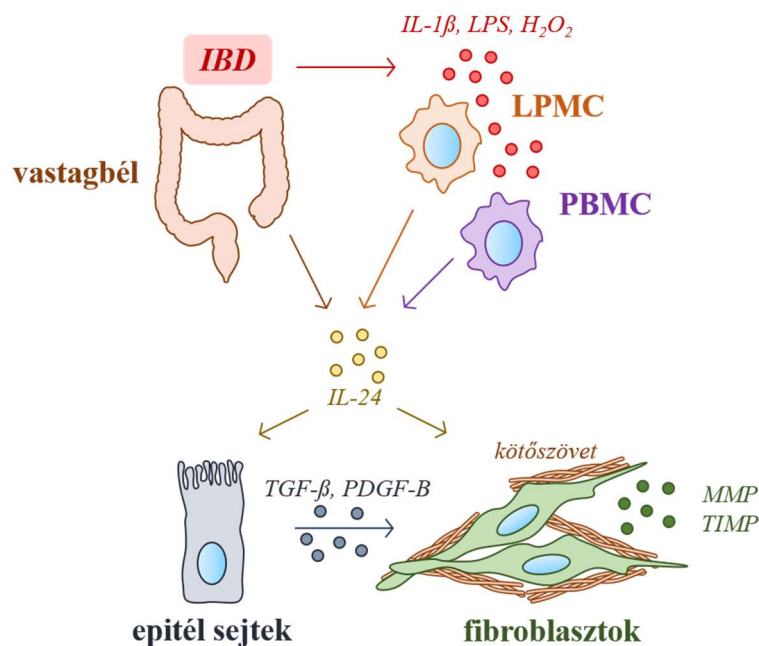
Eredményeink alapján elmondható:

1. Az IL-24 fokozottan expresszálódik a kezelt IBD-s gyermekek vastagbél nyálkahártyájában, fokozottan jelen van a beteg gyermekek szérumból, továbbá az IL-24 receptora (IL-20RB) jelen van az IBD-vel érintett és a kontroll humán biopsziákban egyaránt.
2. Az IL-24 fokozottan expresszálódik a DSS kezelt egerek gyulladt vastagbél nyálkahártyájában a kontroll, kezelt csoportokhoz képest, továbbá az IL-24 receptora (IL-20RB) jelen van mind a DSS kezelt, mind a kontroll csoport vastagbél nyálkahártyájában.
3. Az IBD patomechanizmusában kiemelt jelentőségű IL-1 β , LPS, H₂O₂ és TNF- α hatással van a mononukleáris sejtek (PBMC, LPMC) IL-24 expressziójára.
4. Az IL-20RB jelen van a HT-29 vastagbél epitelsejteken, az IL-24 kezelés fokozza a sejtek profibrotikus faktor (TGF- β és PDGF-B) termelését.
5. Az IL-20RB jelen van a CCD-18Co fibroblaszt sejteken, az IL-24 kezelés fokozza a sejtek migrációját és a kollagének, a zselatinázok és inhibitoraik szintézisét.
6. *In vivo* kísérleti körülmények között a direkt IL-24 kezelés fokozza az egér vastagbél nyálkahártyában a profibrotikus faktorok, és a különböző extracelluláris mátrix komponensek termelését.
7. Kiseb mértékű profibrotikus faktor és extracelluláris mátrix komponens termelődést figyeltünk meg az *Il20rb* KO egerek DSS indukált vastagbélgyulladásánál, mint a WT egerek esetén.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A dolgozat alapjául szolgáló kutatási munka során az interleukin-24 (IL-24) szerepét vizsgáltuk a gyulladásos bélbetegség (inflammatory bowel disease-IBD) során kialakuló szöveti átrendeződésben. Az IBD két fő megjelenési formája a Crohn-betegség (Crohn's disease-CD), illetve a colitis ulcerosa (ulcerative colitis-UC), melyek a gasztrointesztinális rendszer krónikus gyulladásával, idővel a bélrendszer szöveti átépülésével járnak. A betegség előfordulása világszerte évről évre növekszik, miközben az oki terápia nem megoldott. A CD-ben szenvedő betegek több mint 70%-a, a CU-ban szenvedők pedig több, mint 35%-a műtéti beavatkozásra szorul. PhD munkám célja az IBD során látott szöveti átrendeződés patomechanizmusában szerepet játszó molekuláris biológiai folyamatok és markerek jelenlegi ismereteinknél pontosabb feltárása, detektálása volt.

Kísérleteink rámutattak, hogy az IL-24 szerepére az IBD okozta gyulladás során látott szöveti átépülés patomechanizmusában (24. ábra).



24. ábra: A gyulladás hatására aktiválódó immunsejtek (LPMC, PBMC) által termelt IL-24 közvetlenül, az epitél sejtek profibrotikus faktorainak termelésén keresztül, illetve a fibroblasztok aktivációját serkentve fokozza a kollagénben dús ECM lerakódását gyulladásos bélbetegségben.

Kutatásunk során kimutattuk, hogy a terápia naív IBD-s gyermekek vastagbél nyálkahártyájában az IL-24 expresszió szignifikánsan magasabb, mint a kontroll csoportban.

In vivo kísérleteink során azt találtuk, hogy az IL-20RB receptor hiányában a kémiai indukált vastagbélgyulladás okozta tünetek enyhébbek a kontroll csoportéhoz képest. Az IL-24 *in vivo* és *in vitro* egyaránt fokozza az epitel sejtek TGF- β 1, illetve PDGF-B termelését, továbbá hozzájárul a fibroblasztok migrációs kapacitásának növeléséhez. Az IL-24 ezen kívül fokozza az extracelluláris mátrix átépülésében szerepet játszó molekulák, mint az MMP-2, -9, TIMP-1, illetve -2 expresszióját *in vitro* a fibroblasztokban, illetve *in vivo* a bélszövetben is.

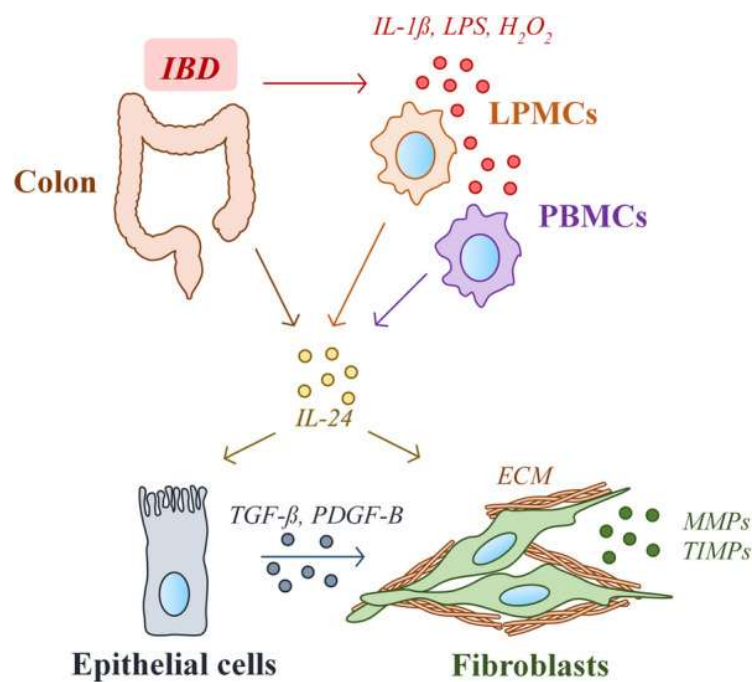
Az IBD molekuláris folyamatainak egyre mélyebb feltérképezése hozzájárulhat új biomarkerek azonosításához, új gyógyszerek fejlesztéséhez, amelyek kiegészíthetik az IBD kezelésének jelenlegi terápiás lehetőségeit.

8. SUMMARY

In my PhD thesis I investigated the role of interleukin-24 (IL-24) in tissue remodeling during inflammatory bowel disease.

IBD has two main types including Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). IBD is characterized by chronic inflammation, and over time with tissue remodeling of the gastrointestinal tract. The incidence of the disease is increasing worldwide year by year, while causal therapy has not been resolved. More than 70% of CD patients and more than 35% of UC patients need one or more surgical intervention over their lifetime. The aim of our study was to investigate the molecular pathways, mechanisms and markers involved in the pathomechanism of IBD.

Our experiments demonstrated the role of IL-24 in the pathomechanism of tissue remodeling in IBD (25. figure).



25. Figure Schematic model of the proposed mechanism underlying the role of IL-24 in the IBD-associated tissue remodeling. Our results showed increased amount of IL-24 in the inflamed colonic mucosa of IBD patients or DSS treated mice. IBD-related factors, including IL-1 β , LPS or H₂O₂ are direct inducers of IL-24 in immune cells derived from lamina propria (LPMCs) or peripheral blood (PBMCs). IL-24 enhances the synthesis of pro-fibrotic factors, including TGF- β and PDGF-B in epithelial cells. These

growth factors together with IL-24 induce the activation of colonic fibroblast leading to the excessive deposition of extracellular matrix (ECM) components.

We found increased amount of IL-24 in the inflamed colon mucosa of therapy naive children with CD and UC versus control.

In our in vivo experiments, we found that in the absence of the IL-20RB receptor, the symptoms of chemically induced colitis were milder compared to the control group.

The IL-24 enhances the production of TGF- β 1 and PDGF-B by epithelial cells both in vivo and in vitro, and it contributes to an increase in the migration capacity of fibroblasts. It also enhances the expression of extracellular matrix components such as MMP-2, -9, TIMP-1, and -2 in fibroblasts in vivo and in vitro as well.

Deeper understanding of the molecular processes of IBD may contribute to the identification of new biomarkers and development of new drugs that may complement the current therapeutic options for the treatment of IBD.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Winter DA, Karolewska-Bochenek K, Lazowska-Przeorek I, Lionetti P, Mearin ML, Chong SK, Roma-Giannikou E, Maly J, Kolho K-L, Shaoul R. (2015) Pediatric IBD-unclassified is less common than previously reported; results of an 8-year audit of the EUROKIDS registry. *Inflammatory bowel diseases*, 21: 2145-2153
2. Alatab S, Sepanlou SG, Ikuta K, Vahedi H, Bisignano C, Safiri S, Sadeghi A, Nixon MR, Abdoli A, Abolhassani H. (2020) The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet gastroenterology & hepatology*, 5: 17-30
3. Kim SC, Ferry GD. (2004) Inflammatory bowel diseases in pediatric and adolescent patients: clinical, therapeutic, and psychosocial considerations. *Gastroenterology*, 126: 1550-1560
4. Perrin JM, Kuhlthau K, Chughtai A, Romm D, Kirschner BS, Ferry GD, Cohen SA, Gold BD, Heyman MB, Baldassano RN, Winter HS. (2008) Measuring quality of life in pediatric patients with inflammatory bowel disease: psychometric and clinical characteristics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 46: 164-171
5. Loftus EV, Jr. (2004) Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*, 126: 1504-1517
6. Kovács Á, Lakatos L. (2011) Gyulladásos bélbetegségek. *Medicina*, Budapest,
7. Mak WY, Zhao M, Ng SC, Burisch J. (2020) The epidemiology of inflammatory bowel disease: East meets west. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 35: 380-389
8. Burisch J, Pedersen N, Cukovic-Cavka S, Brinar M, Kaimakliotis I, Duricova D, Shonova O, Vind I, Avnstrom S, Thorsgaard N, Andersen V, Krabbe S, Dahlerup JF, Salupere R, Nielsen KR, Olsen J, Manninen P, Collin P, Tsianos EV, Katsanos KH, Ladefoged K, Lakatos L, Bjornsson E, Ragnarsson G, Bailey Y, Odes S, Schwartz D, Martinato M, Lupinacci G, Milla M, De Padova A, D'Inca R, Beltrami M, Kupcinskas L, Kiudelis G, Turcan S, Tighineanu O, Mihu I, Magro F, Barros LF, Goldis A, Lazar D, Belousova E, Nikulina I, Hernandez V,

- Martinez-Ares D, Almer S, Zhulina Y, Halfvarson J, Arebi N, Sebastian S, Lakatos PL, Langholz E, Munkholm P, EpiCom g. (2014) East-West gradient in the incidence of inflammatory bowel disease in Europe: the ECCO-EpiCom inception cohort. *Gut*, 63: 588-597
9. Burisch J, Jess T, Martinato M, Lakatos P, EpiCom E. (2013) The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *J Crohns Colitis* 7 (4): 322–337.
 10. Nagy G, Minik K, Újszászy L, Juhasz L. (1994) A gyulladásoos bélbetegségek epidemiológiája Borsod-Abaúj-Zemplén megyében 1963-1992. *Lege Artis Med*, 4: 424-430
 11. Lakatos L, Mester G, Erdelyi Z, Balogh M, Szipocs I, Kamaras G, Lakatos PL. (2004) Striking elevation in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in a province of western Hungary between 1977-2001. *World J Gastroenterol*, 10: 404-409
 12. Muller KE, Lakatos PL, Arato A, Kovacs JB, Varkonyi A, Szucs D, Szakos E, Solyom E, Kovacs M, Polgar M, Nemes E, Guthy I, Tokodi I, Toth G, Horvath A, Tarnok A, Csozsanszki N, Balogh M, Vass N, Bodi P, Dezsófi A, Gardos L, Micskey E, Papp M, Cseh A, Szabo D, Voros P, Veres G, Hungarian IBDRG. (2013) Incidence, Paris classification, and follow-up in a nationwide incident cohort of pediatric patients with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 57: 576-582
 13. Muller K, Veres G. (2018) Five-year prospective follow-up of paediatric IBD patients based on HUPIR (Hungarian paediatric IBD registry). In *JOURNAL OF CROHNS & COLITIS* Vol. 12 pp. S517-S517, OXFORD UNIV PRESS GREAT CLARENDON ST, OXFORD OX2 6DP, ENGLAND
 14. Abdel Hadi L, Di Vito C, Riboni L. (2016) Fostering inflammatory bowel disease: sphingolipid strategies to join forces. *Mediators of inflammation*, 2016:
 15. Mirkov MU, Verstockt B, Cleynen I. (2017) Genetics of inflammatory bowel disease: beyond NOD2. *The lancet Gastroenterology & hepatology*, 2: 224-234
 16. Orchard TR, Satsangi J, Van Heel D, Jewell DP. (2000) Genetics of inflammatory bowel disease: a reappraisal. *Scand J Immunol*, 51: 10-17
 17. Satsangi J, Morecroft J, Shah NB, Nimmo E. (2003) Genetics of inflammatory bowel disease: scientific and clinical implications. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 17: 3-18

18. Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, Lappalainen M, Färkkilä M, Kontula K. (2006) Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology: WJG*, 12: 3668
19. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH. (2001) A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411: 603-606
20. Oostenbrug LE, Nolte IM, Oosterom E, van der Steege G, te Meerman GJ, van Dullemen HM, Drenth JP, de Jong DJ, van der Linde K, Jansen PL, Kleibeuker JH. (2006) CARD15 in inflammatory bowel disease and Crohn's disease phenotypes: an association study and pooled analysis. *Dig Liver Dis*, 38: 834-845
21. Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y, Fukuda Y, Takahashi S, Ogura Y, Inohara N, Nunez G, Kishi Y, Koike Y, Shimosegawa T, Shimoyama T, Hibi T. (2002) Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 123: 86-91
22. Lakatos PL, Lakatos L, Szalay F, Willheim-Polli C, Osterreicher C, Tulassay Z, Molnar T, Reinisch W, Papp J, Mozsik G, Ferenci P, Hungarian IBD SG. (2005) Toll-like receptor 4 and NOD2/CARD15 mutations in Hungarian patients with Crohn's disease: phenotype-genotype correlations. *World J Gastroenterol*, 11: 1489-1495
23. Guan Q. (2019) A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *J Immunol Res*, 2019: 7247238
24. Zhao M, Burisch J. (2019) Impact of genes and the environment on the pathogenesis and disease course of inflammatory bowel disease. *Digestive diseases and sciences*, 64: 1759-1769
25. Lapis K. (2010) Barrier-and autophagic functions of the intestinal epithelia: role of disturbances in the pathogenesis of Crohn's disease. *Orvosi Hetilap*, 151: 1645-1655
26. Schoultz I, Keita ÅV. (2019) Cellular and molecular therapeutic targets in inflammatory bowel disease—focusing on intestinal barrier function. *Cells*, 8: 193
27. Probert CS, Jayanthi V, Pinder D, Wicks AC, Mayberry JF. (1992) Epidemiological study of ulcerative proctocolitis in Indian migrants and the indigenous population of Leicestershire. *Gut*, 33: 687-693

28. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. (1991) The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden. *Gastroenterology*, 100: 350-358
29. Bernstein CN, Rawsthorne P, Cheang M, Blanchard JF. (2006) A population-based case control study of potential risk factors for IBD. *Am J Gastroenterol*, 101: 993-1002
30. Timm S, Svanes C, Janson C, Sigsgaard T, Johannessen A, Gislason T, Jogi R, Omenaas E, Forsberg B, Toren K, Holm M, Braback L, Schlunssen V. (2014) Place of upbringing in early childhood as related to inflammatory bowel diseases in adulthood: a population-based cohort study in Northern Europe. *Eur J Epidemiol*, 29: 429-437
31. Radon K, Windstetter D, Poluda AL, Mueller B, von Mutius E, Koletzko S, Chronische Autoimmunerkrankungen und Kontakt zu Tieren Study G. (2007) Contact with farm animals in early life and juvenile inflammatory bowel disease: a case-control study. *Pediatrics*, 120: 354-361
32. Van Kruiningen HJ, Joossens M, Vermeire S, Joossens S, Debeugny S, Gower-Rousseau C, Cortot A, Colombel JF, Rutgeerts P, Vlietinck R. (2005) Environmental factors in familial Crohn's disease in Belgium. *Inflamm Bowel Dis*, 11: 360-365
33. Danese S, Sans M, Fiocchi C. (2004) Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmunity reviews*, 3: 394-400
34. Ananthakrishnan AN, Bernstein CN, Iliopoulos D, Macpherson A, Neurath MF, Ali RAR, Vavricka SR, Fiocchi C. (2018) Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 15: 39-49
35. Jorgensen SP, Agnholt J, Glerup H, Lyhne S, Villadsen GE, Hvas CL, Bartels LE, Kelsen J, Christensen LA, Dahlerup JF. (2010) Clinical trial: vitamin D3 treatment in Crohn's disease - a randomized double-blind placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther*, 32: 377-383
36. Aujnarain A, Mack DR, Benchimol EI. (2013) The role of the environment in the development of pediatric inflammatory bowel disease. *Current gastroenterology reports*, 15: 1-11

37. Rampton DS, Sladen GE. (1981) Relapse of ulcerative proctocolitis during treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Postgrad Med J*, 57: 297-299
38. Schwartz AG, Targan SR, Saxon A, Weinstein WM. (1982) Sulfasalazine-induced exacerbation of ulcerative colitis. *N Engl J Med*, 306: 409-412
39. Kaplan GG, Ng SC. (2017) Understanding and preventing the global increase of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 152: 313-321. e312
40. Ardizzone S, Porro GB. (2002) Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. *Journal of internal medicine*, 252: 475-496
41. Baron S, Turck D, Leplat C, Merle V, Gower-Rousseau C, Marti R, Yzet T, Lerebours E, Dupas J, Debeugny S. (2005) Environmental risk factors in paediatric inflammatory bowel diseases: a population based case control study. *Gut*, 54: 357-363
42. Kaplan GG, Pedersen BV, Andersson RE, Sands BE, Korzenik J, Frisch M. (2007) The risk of developing Crohn's disease after an appendectomy: a population-based cohort study in Sweden and Denmark. *Gut*, 56: 1387-1392
43. Ananthakrishnan AN. (2015) Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 12: 205-217
44. Khalili H, Ananthakrishnan AN, Konijeti GG, Liao X, Higuchi LM, Fuchs CS, Spiegelman D, Richter JM, Korzenik JR, Chan AT. (2013) Physical activity and risk of inflammatory bowel disease: prospective study from the Nurses' Health Study cohorts. *BMJ*, 347: f6633
45. Timmer A, Preiss JC, Motschall E, Rucker G, Jantschek G, Moser G. (2011) Psychological interventions for treatment of inflammatory bowel disease. *Cochrane Database Syst Rev*, CD006913
46. Wahed M, Corser M, Goodhand JR, Rampton DS. (2010) Does psychological counseling alter the natural history of inflammatory bowel disease? *Inflamm Bowel Dis*, 16: 664-669
47. Fransen K, van Sommeren S, Westra HJ, Veenstra M, Lamberts LE, Modderman R, Dijkstra G, Fu J, Wijmenga C, Franke L, Weersma RK, van Diemen CC. (2014) Correlation of genetic risk and messenger RNA expression in a Th17/IL23 pathway analysis in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 20: 777-782

48. Yamada A, Arakaki R, Saito M, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. (2016) Role of regulatory T cell in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 22: 2195-2205
49. Kucharzik T, Maaser C, Lügering A, Kagnoff M, Mayer L, Targan S, Domschke W. (2006) Recent understanding of IBD pathogenesis: implications for future therapies. *Inflamm Bowel Dis*, 12: 1068-1083
50. Steele SR, Hull TL, Maykel NHA, Read TE, Whitlow CB. (2019) *The ASCRS Manual of Colon and Rectal Surgery*, Springer
51. Pinet K, McLaughlin KA. (2019) Mechanisms of physiological tissue remodeling in animals: Manipulating tissue, organ, and organism morphology. *Dev Biol*, 451: 134-145
52. Wynn TA. (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*, 214: 199-210
53. Arnott ID, Kingstone K, Ghosh S. (2000) Abnormal intestinal permeability predicts relapse in inactive Crohn disease. *Scand J Gastroenterol*, 35: 1163-1169
54. de Bruyn M, Vandooren J, Ugarte-Berzal E, Arijs I, Vermeire S, Opdenakker G. (2016) The molecular biology of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in inflammatory bowel diseases. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 51: 295-358
55. Sziksz E, Veres-Székely A, Pap D, Fekete A, Veres Gb, Tulassay T, Szabó A, Vannay dm. (2014) Mucosal Architectural Rearrangement in Coeliac Disease. *International Journal of Celiac Disease*, 2: 89-92
56. LeBleu VS, Taduri G, O'Connell J, Teng Y, Cooke VG, Woda C, Sugimoto H, Kalluri R. (2013) Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med*, 19: 1047-1053
57. Lemoinne S, Cadoret A, El Mourabit H, Thabut D, Housset C. (2013) Origins and functions of liver myofibroblasts. *Biochim Biophys Acta*, 1832: 948-954
58. Hinz B. (2007) Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *Journal of Investigative Dermatology*, 127: 526-537
59. Jun J-I, Lau LF. (2018) Resolution of organ fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, 128: 97-107
60. Moore-Morris T, Guimarães-Camboa N, Banerjee I, Zambon AC, Kisseleva T, Velayoudon A, Stallcup WB, Gu Y, Dalton ND, Cedenilla M, Gomez-Amaro R,

- Zhou B, Brenner DA, Peterson KL, Chen J, Evans SM. (2014) Resident fibroblast lineages mediate pressure overload-induced cardiac fibrosis. *J Clin Invest*, 124: 2921-2934
61. Sato Y, Yanagita M. (2017) Resident fibroblasts in the kidney: a major driver of fibrosis and inflammation. *Inflamm Regen*, 37: 17
 62. Derkacz A, Olczyk P, Olczyk K, Komosinska-Vassev K. (2021) The Role of Extracellular Matrix Components in Inflammatory Bowel Diseases. *J Clin Med*, 10:
 63. Cox TR, Erler JT. (2011) Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech*, 4: 165-178
 64. Brocker C, Thompson D, Matsumoto A, Nebert DW, Vasiliou V. (2010) Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. *Hum Genomics*, 5: 30-55
 65. Khalili H, Chan SSM, Lochhead P, Ananthakrishnan AN, Hart AR, Chan AT. (2018) The role of diet in the aetiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 15: 525-535
 66. Mao L, Kitani A, Strober W, Fuss IJ. (2018) The Role of NLRP3 and IL-1beta in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Front Immunol*, 9: 2566
 67. Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K. (2005) Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*, 22: 285-294
 68. Onishi RM, Gaffen SL. (2010) Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology*, 129: 311-321
 69. Zhu S, Qian Y. (2012) IL-17/IL-17 receptor system in autoimmune disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)*, 122: 487-511
 70. Ito R, Kita M, Shin-Ya M, Kishida T, Urano A, Takada R, Sakagami J, Imanishi J, Iwakura Y, Okanoue T, Yoshikawa T, Kataoka K, Mazda O. (2008) Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 377: 12-16
 71. Sziksz E, Pap D, Lippai R, Beres NJ, Fekete A, Szabo AJ, Vannay A. (2015) Fibrosis Related Inflammatory Mediators: Role of the IL-10 Cytokine Family. *Mediators Inflamm*, 764641: 24

72. Rutz S, Wang X, Ouyang W. (2014) The IL-20 subfamily of cytokines--from host defence to tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 14: 783-795
73. Wang M, Liang P. (2005) Interleukin-24 and its receptors. *Immunology*, 114: 166-170
74. Wolk K, Kunz S, Asadullah K, Sabat R. (2002) Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J Immunol*, 168: 5397-5402
75. Andoh A, Shioya M, Nishida A, Bamba S, Tsujikawa T, Kim-Mitsuyama S, Fujiyama Y. (2009) Expression of IL-24, an activator of the JAK1/STAT3/SOCS3 cascade, is enhanced in inflammatory bowel disease. *J Immunol*, 183: 687-695
76. He M, Liang P. (2010) IL-24 transgenic mice: in vivo evidence of overlapping functions for IL-20, IL-22, and IL-24 in the epidermis. *J Immunol*, 184: 1793-1798
77. Wolk K, Haugen HS, Xu W, Witte E, Waggie K, Anderson M, Vom Baur E, Witte K, Warszawska K, Philipp S, Johnson-Leger C, Volk HD, Sterry W, Sabat R. (2009) IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not. *J Mol Med (Berl)*, 87: 523-536
78. Kragstrup TW, Greisen SR, Nielsen MA, Rhodes C, Stengaard-Pedersen K, Hetland ML, Hørslev-Petersen K, Junker P, Østergaard M, Hvid M, Vorup-Jensen T, Robinson WH, Sokolove J, Deleuran B. (2016) The interleukin-20 receptor axis in early rheumatoid arthritis: novel links between disease-associated autoantibodies and radiographic progression. *Arthritis Res Ther*, 18: 61
79. Kragstrup TW, Otkjaer K, Holm C, Jørgensen A, Hokland M, Iversen L, Deleuran B. (2008) The expression of IL-20 and IL-24 and their shared receptors are increased in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. *Cytokine*, 41: 16-23
80. Fonseca-Camarillo G, Furuzawa-Carballeda J, Granados J, Yamamoto-Furusho JK. (2014) Expression of interleukin (IL)-19 and IL-24 in inflammatory bowel disease patients: a cross-sectional study. *Clin Exp Immunol*, 177: 64-75
81. Kreis S, Philippidou D, Margue C, Behrmann I. (2008) IL-24: a classic cytokine and/or a potential cure for cancer? *J Cell Mol Med*, 12: 2505-2510
82. Chada S, Sutton RB, Ekmekcioglu S, Ellerhorst J, Mumm JB, Leitner WW, Yang HY, Sahin AA, Hunt KK, Fuson KL, Poindexter N, Roth JA, Ramesh R, Grimm

- EA, Mhashilkar AM. (2004) MDA-7/IL-24 is a unique cytokine--tumor suppressor in the IL-10 family. *Int Immunopharmacol*, 4: 649-667
83. Liang J, Huang RL, Huang Q, Peng Z, Zhang PH, Wu ZX. (2011) Adenovirus-mediated human interleukin 24 (MDA-7/IL-24) selectively suppresses proliferation and induces apoptosis in keloid fibroblasts. *Ann Plast Surg*, 66: 660-666
84. Soo C, Shaw WW, Freymiller E, Longaker MT, Bertolami CN, Chiu R, Tieu A, Ting K. (1999) Cutaneous rat wounds express c49a, a novel gene with homology to the human melanoma differentiation associated gene, mda-7. *J Cell Biochem*, 74: 1-10
85. Pap D, Sziksz E, Kiss Z, Rokony R, Veres-Székely A, Lippai R, Takács IM, Kis É, Fekete A, Reusz G, Szabó AJ, Vannay A. (2017) Microarray Analysis Reveals Increased Expression of Matrix Metalloproteases and Cytokines of Interleukin-20 Subfamily in the Kidneys of Neonate Rats Underwent Unilateral Ureteral Obstruction: A Potential Role of IL-24 in the Regulation of Inflammation and Tissue Remodeling. *Kidney Blood Press Res*, 42: 16-32
86. Atreya R, Zimmer M, Bartsch B, Waldner MJ, Atreya I, Neumann H, Hildner K, Hoffman A, Kiesslich R, Rink AD, Rau TT, Rose-John S, Kessler H, Schmidt J, Neurath MF. (2011) Antibodies against tumor necrosis factor (TNF) induce T-cell apoptosis in patients with inflammatory bowel diseases via TNF receptor 2 and intestinal CD14(+) macrophages. *Gastroenterology*, 141: 2026-2038
87. László LP, László L. (2006) A gyulladásoos bélbetegségek genetikája (The genetics of inflammatory bowel disease). *Lege artis medicinae* 16: 121-112-
88. Neurath MF. (2014) Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*, 14: 329-342
89. Levin AD, Wildenberg ME, van den Brink GR. (2016) Mechanism of Action of Anti-TNF Therapy in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis*, 10: 989-997
90. Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. (1983) Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem*, 258: 7155-7160
91. Ikushima H, Miyazono K. (2010) TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 10: 415-424

92. Massagué J. (2012) TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13: 616-630
93. Horbelt D, Denkis A, Knaus P. (2012) A portrait of Transforming Growth Factor beta superfamily signalling: Background matters. *Int J Biochem Cell Biol*, 44: 469-474
94. Derynck R, Zhang YE. (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 425: 577-584
95. Biancheri P, Giuffrida P, Docena GH, MacDonald TT, Corazza GR, Di Sabatino A. (2014) The role of transforming growth factor (TGF)-beta in modulating the immune response and fibrogenesis in the gut. *Cytokine Growth Factor Rev*, 25: 45-55
96. Powrie F, Carlino J, Leach MW, Mauze S, Coffman RL. (1996) A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. *J Exp Med*, 183: 2669-2674
97. Del Zotto B, Mumolo G, Pronio AM, Montesani C, Tersigni R, Boirivant M. (2003) TGF-beta1 production in inflammatory bowel disease: differing production patterns in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol*, 134: 120-126
98. Kumagai S, Ohtani H, Nagai T, Funa K, Hiwatashi NO, Shimosegawa, Nagura H. (2001) Platelet-derived growth factor and its receptors are expressed in areas of both active inflammation and active fibrosis in inflammatory bowel disease. *Tohoku J Exp Med*, 195: 21-33
99. Demoulin JB, Essagher A. (2014) PDGF receptor signaling networks in normal and cancer cells. *Cytokine Growth Factor Rev*, 25: 273-283
100. Friedman SL, Sheppard D, Duffield JS, Violette S. (2013) Therapy for fibrotic diseases: nearing the starting line. *Sci Transl Med*, 5: 167sr161
101. Chen YT, Chang FC, Wu CF, Chou YH, Hsu HL, Chiang WC, Shen J, Chen YM, Wu KD, Tsai TJ, Duffield JS, Lin SL. (2011) Platelet-derived growth factor receptor signaling activates pericyte-myofibroblast transition in obstructive and post-ischemic kidney fibrosis. *Kidney Int*, 80: 1170-1181

102. Andoh A, Fujino S, Okuno T, Fujiyama Y, Bamba T. (2002) Intestinal subepithelial myofibroblasts in inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol*, 37 Suppl 14: 33-37
103. Gill SE, Parks WC. (2008) Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol*, 40: 1334-1347
104. Wynn TA, Ramalingam TR. (2012) Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med*, 18: 1028-1040
105. Lambert E, Dassé E, Haye B, Petitfrère E. (2004) TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol*, 49: 187-198
106. Tan TK, Zheng G, Hsu TT, Lee SR, Zhang J, Zhao Y, Tian X, Wang Y, Wang YM, Cao Q, Wang Y, Lee VW, Wang C, Zheng D, Alexander SI, Thompson E, Harris DC. (2013) Matrix metalloproteinase-9 of tubular and macrophage origin contributes to the pathogenesis of renal fibrosis via macrophage recruitment through osteopontin cleavage. *Lab Invest*, 93: 434-449
107. Wang X, Zhou Y, Tan R, Xiong M, He W, Fang L, Wen P, Jiang L, Yang J. (2010) Mice lacking the matrix metalloproteinase-9 gene reduce renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*, 299: F973-982
108. Mulder DJ, Noble AJ, Justinich CJ, Duffin JM. (2014) A tale of two diseases: the history of inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*, 8: 341-348
109. Tremaine WJ. (2007) Review article: Indeterminate colitis--definition, diagnosis and management. *Aliment Pharmacol Ther*, 25: 13-17
110. Day AS, Ledder O, Leach ST, Lemberg DA. (2012) Crohn's and colitis in children and adolescents. *World J Gastroenterol*, 18: 5862-5869
111. Lonovics J, Tulassay Z, Varró V. (2003) *Klinikai Gasztroenterológia*. pp. 213-225, Medicina
112. de Bie CI, Paerregaard A, Kolacek S, Ruemmele FM, Koletzko S, Fell JM, Escher JC. (2013) Disease phenotype at diagnosis in pediatric Crohn's disease: 5-year analyses of the EUROKIDS Registry. *Inflamm Bowel Dis*, 19: 378-385
113. Hébuterne X, Filippi J, Al-Jaouni R, Schneider S. (2009) Nutritional consequences and nutrition therapy in Crohn's disease. *Gastroenterol Clin Biol*, 33 Suppl 3: S235-244

114. Waśko-Czopnik D, Paradowski L. (2012) The influence of deficiencies of essential trace elements and vitamins on the course of Crohn's disease. *Adv Clin Exp Med*, 21: 5-11
115. Gerasimidis K, McGrogan P, Edwards CA. (2011) The aetiology and impact of malnutrition in paediatric inflammatory bowel disease. *J Hum Nutr Diet*, 24: 313-326
116. Andrisani G, Guidi L, Papa A, Armuzzi A. (2012) Anti-TNF alpha therapy in the management of extraintestinal manifestation of inflammatory bowel disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 16: 890-901
117. Ott C, Scholmerich J. (2013) Extraintestinal manifestations and complications in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 10: 585-595
118. Turner D, Griffiths AM, Walters TD, Seah T, Markowitz J, Pfefferkorn M, Keljo D, Waxman J, Otley A, LeLeiko NS, Mack D, Hyams J, Levine A. (2012) Mathematical weighting of the pediatric Crohn's disease activity index (PCDAI) and comparison with its other short versions. *Inflamm Bowel Dis*, 18: 55-62
119. Sawczenko A, Sandhu BK. (2003) Presenting features of inflammatory bowel disease in Great Britain and Ireland. *Arch Dis Child*, 88: 995-1000
120. Lakatos L, Kiss LS, David G, Pandur T, Erdelyi Z, Mester G, Balogh M, Szipocs I, Molnar C, Komaromi E, Lakatos PL. (2011) Incidence, disease phenotype at diagnosis, and early disease course in inflammatory bowel diseases in Western Hungary, 2002-2006. *Inflamm Bowel Dis*, 17: 2558-2565
121. Dignass A, Eliakim R, Magro F, Maaser C, Chowers Y, Geboes K, Mantzaris G, Reinisch W, Colombel JF, Vermeire S, Travis S, Lindsay JO, Van Assche G. (2012) Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis*, 6: 965-990
122. Müller KE, Lakatos PL, Arató A, Kovács JB, Várkonyi Á, Szucs D, Szakos E, Sólyom E, Kovács M, Polgár M. (2013) Incidence, Paris classification, and follow-up in a nationwide incident cohort of pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 57: 576-582
123. 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.

- (2009) Appraisal of the pediatric ulcerative colitis activity index (PUCAI). *Inflamm Bowel Dis*, 15: 1218-1223
124. Oliva S, Thomson M, de Ridder L, Martin-de-Carpi J, Van Biervliet S, Braegger C, Dias JA, Kolacek S, Miele E, Buderus S, Bronsky J, Winter H, Navas-Lopez VM, Assa A, Chong SKF, Afzal NA, Smets F, Shaoul R, Hussey S, Turner D, Cucchiara S. (2018) Endoscopy in Pediatric Inflammatory Bowel Disease: A Position Paper on Behalf of the Porto IBD Group of the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 67: 414-430
125. Levine A, Koletzko S, Turner D, Escher JC, Cucchiara S, de Ridder L, Kolho KL, Veres G, Russell RK, Paerregaard A, Buderus S, Greer ML, Dias JA, Veereman-Wauters G, Lionetti P, Sladek M, Martin de Carpi J, Staiano A, Ruemmele FM, Wilson DC, European Society of Pediatric Gastroenterology H, Nutrition. (2014) ESPGHAN revised porto criteria for the diagnosis of inflammatory bowel disease in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 58: 795-806
126. Laass MW, Roggenbuck D, Conrad K. (2014) Diagnosis and classification of Crohn's disease. *Autoimmun Rev*, 13: 467-471
127. Nitzan O, Elias M, Peretz A, Saliba W. (2016) Role of antibiotics for treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 22: 1078-1087
128. Ruemmele FM. (2004) Infliximab: how to use it in pediatric Crohn's disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 39: 12-14
129. Hwang JM, Varma MG. (2008) Surgery for inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 14: 2678-2690
130. Roses RE, Rombeau JL. (2008) Recent trends in the surgical management of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 14: 408-412
131. Polle SW, van Koperen PJ, van Berge Henegouwen MI, Slors JF, Stokkers PC, Bemelman W. (2009) [Laparoscopic surgery for inflammatory bowel disease; an update]. *Ned Tijdschr Geneesk*, 153: B284
132. Reinisch W, Dejaco C, Knoflach P, Petritsch W, Vogelsang H, Tilg H. (2004) [Immunosuppressive therapy for inflammatory bowel disease: consensus by the Austrian working group on IBD]. *Z Gastroenterol*, 42: 1033-1045; discussion 1046-1037

133. Schwartz DA, Loftus EV, Jr., Tremaine WJ, Panaccione R, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. (2002) The natural history of fistulizing Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology*, 122: 875-880
134. Maggiori L, Panis Y. (2013) Surgical management of IBD--from an open to a laparoscopic approach. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 10: 297-306
135. ESPGHAN. (2005) Inflammatory bowel disease in children and adolescents: recommendations for diagnosis--the Porto criteria. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 41: 1-7
136. Hyams JS, Ferry GD, Mandel FS, Gryboski JD, Kibort PM, Kirschner BS, Griffiths AM, Katz AJ, Grand RJ, Boyle JT, et al. (1991) Development and validation of a pediatric Crohn's disease activity index. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 12: 439-447
137. Dotson JL, Crandall WV, Zhang P, Forrest CB, Bailey LC, Colletti RB, Kappelman MD. (2015) Feasibility and validity of the pediatric ulcerative colitis activity index in routine clinical practice. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 60: 200-204
138. Oliva-Hemker M, Fiocchi C. (2002) Etiopathogenesis of inflammatory bowel disease: the importance of the pediatric perspective. *Inflamm Bowel Dis*, 8: 112-128
139. Turner D, Mack D, Leleiko N, Walters TD, Uusoue K, Leach ST, Day AS, Crandall W, Silverberg MS, Markowitz J, Otley AR, Keljo D, Mamula P, Kugathasan S, Hyams J, Griffiths AM. (2010) Severe pediatric ulcerative colitis: a prospective multicenter study of outcomes and predictors of response. *Gastroenterology*, 138: 2282-2291
140. Boni L, Benevento A, Dionigi G, Rovera F, Diurni M, Dionigi R. (2005) Injection of colorectal cancer cells in mesenteric and antimesenteric sides of the colon results in different patterns of metastatic diffusion: an experimental study in rats. *World J Surg Oncol*, 3: 69
141. Kim JJ, Shajib MS, Manocha MM, Khan WI. (2012) Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. *J Vis Exp*,
142. McManus D, Novaira HJ, Hamers AAJ, Pillai AB. (2019) Isolation of Lamina Propria Mononuclear Cells from Murine Colon Using Collagenase E. *J Vis Exp*,

143. Korzeniewski C, Callewaert DM. (1983) An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods*, 64: 313-320
144. Hammer T, Nielsen KR, Munkholm P, Burisch J, Lynge E. (2016) The Faroese IBD Study: Incidence of Inflammatory Bowel Diseases Across 54 Years of Population-based Data. *J Crohns Colitis*, 10: 934-942
145. Latella G, Sferra R, Specca S, Vetuschci A, Gaudio E. (2013) Can we prevent, reduce or reverse intestinal fibrosis in IBD? *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 17: 1283-1304
146. Rieder F, Brenmoehl J, Leeb S, Schölmerich J, Rogler G. (2007) Wound healing and fibrosis in intestinal disease. *Gut*, 56: 130-139
147. Poindexter NJ, Walch ET, Chada S, Grimm EA. (2005) Cytokine induction of interleukin-24 in human peripheral blood mononuclear cells. *J Leukoc Biol*, 78: 745-752
148. Lawrance IC, Rogler G, Bamias G, Breynaert C, Florholmen J, Pellino G, Reif S, Specca S, Latella G. (2017) Cellular and Molecular Mediators of Intestinal Fibrosis. *J Crohns Colitis*, 11: 1491-1503
149. Rokonay R, Veres-Székely A, Szebeni B, Pap D, Lippai R, Béres NJ, Veres G, Szabó AJ, Vannay Á. (2020) Role of IL-24 in the mucosal remodeling of children with coeliac disease. *Journal of translational medicine*, 18: 1-13
150. Kumari S, Bonnet MC, Ulvmar MH, Wolk K, Karagianni N, Witte E, Uthoff-Hachenberg C, Renauld JC, Kollias G, Toftgard R, Sabat R, Pasparakis M, Haase I. (2013) Tumor necrosis factor receptor signaling in keratinocytes triggers interleukin-24-dependent psoriasis-like skin inflammation in mice. *Immunity*, 39: 899-911
151. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. (2016) TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol*, 12: 49-62
152. Lee A, Qiao Y, Grigoriev G, Chen J, Park-Min KH, Park SH, Ivashkiv LB, Kalliolias GD. (2013) Tumor necrosis factor α induces sustained signaling and a prolonged and unremitting inflammatory response in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*, 65: 928-938
153. Pap D, Veres-Székely A, Szebeni B, Rokonay R, Ónody A, Lippai R, Takács IM, Tislér A, Kardos M, Oswald F, Fekete A, Szabó AJ, Vannay Á. (2020)

- Characterization of IL-19, -20, and -24 in acute and chronic kidney diseases reveals a pro-fibrotic role of IL-24. *J Transl Med*, 18: 172
154. Hsu YH, Li HH, Sung JM, Chen WT, Hou YC, Chang MS. (2013) Interleukin-19 mediates tissue damage in murine ischemic acute kidney injury. *PLoS One*, 8: e56028
 155. Li HH, Hsu YH, Wei CC, Lee PT, Chen WC, Chang MS. (2008) Interleukin-20 induced cell death in renal epithelial cells and was associated with acute renal failure. *Genes Immun*, 9: 395-404
 156. Sarkar D, Su ZZ, Lebedeva IV, Sauane M, Gopalkrishnan RV, Valerie K, Dent P, Fisher PB. (2002) mda-7 (IL-24) Mediates selective apoptosis in human melanoma cells by inducing the coordinated overexpression of the GADD family of genes by means of p38 MAPK. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 10054-10059
 157. Sauane M, Gopalkrishnan RV, Sarkar D, Su ZZ, Lebedeva IV, Dent P, Pestka S, Fisher PB. (2003) MDA-7/IL-24: novel cancer growth suppressing and apoptosis inducing cytokine. *Cytokine Growth Factor Rev*, 14: 35-51
 158. Su ZZ, Lebedeva IV, Sarkar D, Gopalkrishnan RV, Sauane M, Sigmon C, Yacoub A, Valerie K, Dent P, Fisher PB. (2003) Melanoma differentiation associated gene-7, mda-7/IL-24, selectively induces growth suppression, apoptosis and radiosensitization in malignant gliomas in a p53-independent manner. *Oncogene*, 22: 1164-1180
 159. Pohlers D, Brenmoehl J, Löffler I, Müller CK, Leipner C, Schultze-Mosgau S, Stallmach A, Kinne RW, Wolf G. (2009) TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim Biophys Acta*, 1792: 746-756
 160. Veres-Székely A, Pap D, Szebeni B, Órfi L, Szász C, Pajtók C, Lévai E, Szabó AJ, Vannay Á. (2022) Transient Agarose Spot (TAS) Assay: A New Method to Investigate Cell Migration. *International Journal of Molecular Sciences*, 23: 2119
 161. Jakubowska K, Pryczynicz A, Iwanowicz P, Niewiński A, Maciorkowska E, Hapanowicz J, Jagodzińska D, Kemon A, Guzińska-Ustymowicz K. (2016) Expressions of Matrix Metalloproteinases (MMP-2, MMP-7, and MMP-9) and Their Inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterol Res Pract*, 2016: 2456179
 162. O'Sullivan S, Gilmer JF, Medina C. (2015) Matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease: an update. *Mediators Inflamm*, 2015: 964131

163. Ratzinger G, Stoitzner P, Ebner S, Lutz MB, Layton GT, Rainer C, Senior RM, Shipley JM, Fritsch P, Schuler G, Romani N. (2002) Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin. *J Immunol*, 168: 4361-4371
164. Newby AC. (2006) Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res*, 69: 614-624
165. Fic P, Zakrocka I, Kurzepa J, Stepulak A. (2011) [Matrix metalloproteinases and atherosclerosis]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 65: 16-27
166. Akahane T, Akahane M, Shah A, Thorgeirsson UP. (2004) TIMP-1 stimulates proliferation of human aortic smooth muscle cells and Ras effector pathways. *Biochem Biophys Res Commun*, 324: 440-445
167. Porter JF, Shen S, Denhardt DT. (2004) Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 stimulates proliferation of human cancer cells by inhibiting a metalloproteinase. *Br J Cancer*, 90: 463-470
168. Guo C, Piacentini L. (2003) Type I collagen-induced MMP-2 activation coincides with up-regulation of membrane type 1-matrix metalloproteinase and TIMP-2 in cardiac fibroblasts. *J Biol Chem*, 278: 46699-46708
169. Cantemir V, Cai DH, Reedy MV, Brauer PR. (2004) Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression during cardiac neural crest cell migration and its role in proMMP-2 activation. *Dev Dyn*, 231: 709-719
170. Wahl C, Müller W, Leithäuser F, Adler G, Oswald F, Reimann J, Schirmbeck R, Seier A, Weiss JM, Prochnow B, Wegenka UM. (2009) IL-20 receptor 2 signaling down-regulates antigen-specific T cell responses. *J Immunol*, 182: 802-810
171. Kim SY, Park MJ, Kwon JE, Choi SY, Seo HB, Jung KA, Choi JW, Baek JA, Lee HH, Lee BI, Park SH, Cho ML. (2018) Ro60 Inhibits Colonic Inflammation and Fibrosis in a Mouse Model of Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. *Immunol Lett*, 201: 45-51
172. Koga H, Yang H, Adler J, Zimmermann EM, Teitelbaum DH. (2008) Transanal delivery of angiotensin converting enzyme inhibitor prevents colonic fibrosis in a mouse colitis model: development of a unique mode of treatment. *Surgery*, 144: 259-268

173. Yamaguchi H, Suzuki K, Nagata M, Kawase T, Sukumaran V, Thandavarayan RA, Kawauchi Y, Yokoyama J, Tomita M, Kawachi H, Watanabe K, Yoneyama H, Asakura H, Takagi R. (2012) Irsogladine maleate ameliorates inflammation and fibrosis in mice with chronic colitis induced by dextran sulfate sodium. *Med Mol Morphol*, 45: 140-151
174. Rao LZ, Wang Y, Zhang L, Wu G, Zhang L, Wang FX, Chen LM, Sun F, Jia S, Zhang S, Yu Q, Wei JH, Lei HR, Yuan T, Li J, Huang X, Cheng B, Zhao J, Xu Y, Mo BW, Wang CY, Zhang H. (2021) IL-24 deficiency protects mice against bleomycin-induced pulmonary fibrosis by repressing IL-4-induced M2 program in macrophages. *Cell Death Differ*, 28: 1270-1283

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

10.1. Az értekezés témájában megjelent eredeti, nemzetközi publikációk

- Onody A, Veres-Székely A, Pap D, Rokonay R, Szebeni B, Sziksz E, Oswald F, Veres G, Cseh Á, Szabó AJ. (2021) Interleukin-24 regulates mucosal remodeling in inflammatory bowel diseases. *Journal of translational medicine*, 19: 1-16
- Pap D, Veres-Székely A, Szebeni B, Rokonay R, Ónody A, Lippai R, Takács IM, Tislér A, Kardos M, Oswald F, Fekete A, Szabó AJ, Vannay Á. (2020) Characterization of IL-19, -20, and -24 in acute and chronic kidney diseases reveals a pro-fibrotic role of IL-24. *J Transl Med*, 18: 172

10.2. Egyéb, nem az értekezés témájában megjelent, eredeti, nemzetközi publikációk

- Voros P, Sziksz E, Himer L, Onody A, Pap D, Frivolt K, Szebeni B, Lippai R, Gyorffy H, Fekete A, Brandt F, Molnar K, Veres G, Arato A, Tulassay T, Vannay A. (2013) Expression of PARK7 is increased in celiac disease. *Virchows Arch*, 463: 401-408
- Sziksz E, Molnár K, Lippai R, Pap D, Onody A, Veres-Székely A, Vörös P, Szabó D, Györffy H, Veres G, Tulassay T, Vannay A, Arató A. (2014) Peroxisome proliferator-activated receptor- γ and thymic stromal lymphopoietin are involved in the pathophysiology of childhood coeliac disease. *Virchows Arch.*, 465(4):385-93
- Sziksz E, Veres G, Vannay A, Prókai A, Gál K, Onody A, Korponay-Szabó IR, Reusz G, Szabó A, Tulassay T, Arató A, Szebeni B. (2010) Increased heat shock protein 72 expression in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 51: 573-578
- Vannay A, Sziksz E, Prokai A, Veres G, Molnar K, Szakal DN, Onody A, Korponay-Szabo IR, Szabo A, Tulassay T, Arato A, Szebeni B. (2010) Increased expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in coeliac disease. *Pediatr Res*, 68: 118-122

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Vannay Ádámnak, a Kutató Laboratórium vezetőjének, hogy magatartásával és gondolkodás módjával mindvégig példaként állt előttem. Hálás vagyok szakmai segítségéért, és az élet más kérdéseit is érintő baráti tanácsaiért.

Őszinte hálával tartozom Dr. Tulassay Tivadar és Dr. Szabó J. Attila Professzor Uraknak, hogy a Semmelweis Egyetem I. Sz. Gyermekklinika Kutató Laboratóriumában lehetőséget biztosítottak számomra a kutatómunka elvégzéséhez.

Kutatócsoportunk valamennyi jelenlegi és volt tagjának, Dr. Veres-Székely Apornak, Dr. Pap Domonkosnak, Dr. Szebeni Beátának, Dr. Balicza Leonóranak, Dr. Sziksz Ernának, Dr. Lippai Ritának és Bernáth Máriának nagyon köszönöm, hogy baráti légkörben, önzetlenül segítettek a kísérletek elvégzésében, az eredmények kiértékelésében, és a publikálásban.

Dr. Arató András Professzor Úr már az egyetemi éveim alatt, a tudományos diákköri tevékenység kapcsán a molekuláris biológiai gondolkodásmód irányába terelgetett, és tanácsaival mindig segítséget nyújtott, amit ezúton is nagyon köszönök.

Köszönettel tartozom Dr. Veres Gábornak[†], Dr. Dezsőfi-Gottl Antalnak, Dr. Cseh Áronnak, Dr. Béres Nóra Juditnak, Dr. Müller Katalin Eszternek és Kis Zoltánnak, valamint a Semmelweis Egyetem I. Sz. Gyermekklinika Gasztroenterológiai és Hepatológiai Osztály és Ambulancia valamennyi munkatársának a humán minták gyűjtésében nyújtott segítségért.

Végül szeretném megköszönni családom, legfőképpen szüleim, férjem és gyermekeim rendületlen támogatását, türelmét és biztatását, amely nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre.