

Az interleukin-24 (IL-24) szerepének vizsgálata gyulladáso  
s bélbetegségben

Doktori tézisek

**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:

Elnök: Prof. Dr. Fekete György, MTA doktora, egyetemi tanár

Tagok: 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

## 1. Bevezetés

A gyulladós bélbetegség (inflammatory bowel disease - IBD) két fő megjelenési formája a Crohn-betegség (Crohn's disease - CD), illetve a colitis ulcerosa (ulcerative colitis - UC). Az IBD 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. Míg az IBD a 20. század elején ritka betegségnak számított, a 20. század közepétől gyors ütemben nőtt az előfordulása, az elmúlt években pedig a változások még erőteljesebbek lettek.

A fő tünetek gyermek és felnőttkorban lényegileg azonosak. Gyermekek esetén a betegség általában gyorsabban progrediál, valamint kiterjedtebb és súlyosabb bélérintettséggel jár. 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.

Élettani körülmények között a bél falon nem jutnak át a baktériumok és termékeik. Azonban a különböző környezeti és genetikai faktorok hatására sérül a bél nyálkahártya barrier funkciója, fellazulnak az epitél sejtek közötti szoros réskapcsolatok, így az a mikrobiális antigének számára áthatolhatóvá válik, és a lamina propria immunsejteinek aktivációját okozva krónikus gyulladást és szöveti átépülést váltanak ki.

A fibroblasztoknak a krónikus gyulladás okozta szöveti átrendeződésben kiemelt szerepük van. Eredetükre a bélrendszerre vonatkozóan több elmélet is létezik, de a legvalószínűbb a nyugvó állapotú, subepitélialis fibroblasztokból való eredet, melyek aktiválódását különböző profibrotikus (TGF- $\beta$ , PDGF) faktorok indukálják. Az aktivált fibroblasztok fokozott proliferációs és migrációs készségének

köszönhetően, a sérülés helyén felszaporodva, nagy mennyiségű extracelluláris mátrix (ECM) komponenst termelve igyekeznek helyreállítani a megbomlott szöveti struktúrát. 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, hegszövet alakul ki, amely a szerv funkciójának csökkenéséhez, vagy annak elvesztéséhez vezet. A hegesedés 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.

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. 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, főként a myeloid és limfoid eredetű immunsejtekből származnak, receptoraik döntően az epitélsejteken expresszálódnak. Az IL-24 kötődhet az IL-20RA/IL-20RB, valamint IL-22RA1/IL-20RB heterodimer receptorhoz is. Az IL-24 fokozott jelenlétét mutatták ki gyulladással, szöveti átrendeződéssel járó betegségek kapcsán, mint a gyulladással járó bélbetegség, a pikkelysömör, vagy a reumatoid artritisz. 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 felnőtt betegek bélbiopsziás mintáiban. 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, overexpresszálása csökkenti a keloidszövetből nyert fibroblasztok proliferációját, expressziója a bőrben a sebgyógyulás során

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

## 2. Célkitűzés

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. Módszerek**

#### **3.1. IBD-s beteganyag és kontroll csoportja**

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.

##### **3.1.2. Vastagbél biopszia minták**

A Western blot analízis során felhasznált mintákat a vastagbél nyálkahártyájából 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.

##### **3.1.3. Szérum minták**

ELISA vizsgálatunk során 15 kontroll gyermektől és 12 Crohn-beteg gyermektől történt vérvétel.

#### **3.2. Állatmodell és kezelési protokollok**

A kísérleteket 7-8 hetes, hím, vad típusú (WT) C57Bl/6J, illetve *Il20rb* génkiütött (KO) egereken végeztük.

##### **3.2.1. Intracolónális IL-24 injektálás**

Boni és munkatársai által leírt eljárást követtük, mely során rekombináns IL-24-et injektáltunk a vastagbél falába az antimesenterialis oldalon az anustól 30 mm-re. A kontroll állatok esetén csak vivőanyag injektálás történt. Mindkét kezelési csoportba 6-6 egeret vontunk be.

##### **3.2.2. DSS indukálta colitises egérmódel**

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 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 DSS kezelés során betegség aktivitási indexet (DAI) és az állatok testsúlyát határoztuk meg.

### **3.3. Sejtvonalak**

Kísérleteink során HT-29 colon epitél, HK-2 vese tubulus epitél sejteket, CCD-18Co fibroblaszt sejtvonalat, perifériás vérben keringő mononukleáris sejteket, illetve lamina propria mononukleáris sejteket vizsgáltunk.

#### **3.3.1. HT-29 colon és HK-2 proximális tubulus epitél sejtkultúra és kezelések**

Kísérleteink során a HT-29 colon epitél sejtvonalat és a humán proximális tubulus epitél HK-2 sejteket humán rekombináns IL-24-gyel, a kontroll sejteket vehikulummal 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 sejtkultúra és kezelésük**

A CCD-18Co human colon fibroblaszt sejteket rekombináns IL-24-gyel, TGF- $\beta$ 1-gyel, illetve PDGF-B-val kezeltük (n=6/csoport) 24 órán át. A kontroll sejteket vehikulummal kezeltük. A fent leírt módon kezelt sejtekből annexin/PI festést, RT-PCR-t, MTT és SiriusRed tesztet végeztünk.

#### **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, majd rekombináns IL-1 $\beta$ -val, LPS-sel, rekombináns TNF- $\alpha$ -val, rekombináns TGF- $\beta$ 1-gyel, rekombináns IL-17-tel, illetve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal (hidrogén peroxid) kezeltük az egyes csoportokat (n=6/csoport). A kontroll sejteket vehikulummal kezeltük. 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, majd rekombináns IL-1 $\beta$ -val, LPS-sel, rekombináns TNF- $\alpha$ -val, rekombináns TGF- $\beta$ 1-gyel, rekombináns IL-17-tel, illetve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal kezeltük az egyes csoportokat (n=6/csoport). A kontroll sejteket vehikulummal kezeltük. A fent leírt módon kezelt sejtekből mRNS expressziót mértünk.

### **3.4. Annexin V/ propidium jodid (PI) festés**

Az apoptózis mértékét FITC Annexin V apoptózis detektáló Kit I vizsgáltuk. 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.

### **3.5. Fibroblaszt migrációs vizsgálat**

CCD-18 Co sejteket a közepükön, nem toxikus, agaróz gél barriert tartalmazó, 96 well plate-re tettük ki, majd rekombináns IL-24 vagy vehiculum kezelést alkalmaztunk. Az egyes well-ek közepén megmaradó sejtmentes területek méretét határoztuk meg.

### **3.6. MTT sejtproliferációs vizsgálat**

MTT sejtproliferációs vizsgálatunkhoz Cell Proliferation Kit I-et használtunk. 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.

### **3.7. SiriusRed kollagén detekciós eljárás**

A CCD-18Co sejteket fixáltuk, mostuk, ezt követően Sirius Red festékoldatban inkubáltuk. A be nem kötődött festéket eltávolítottuk. A sejtek által termelt kollagénnel arányos mennyiségű, bekötődött festéket eluáltuk, abszorbanciáját Hidex Chameleon Microplate Reader segítségével, MikroWin szoftverrel mértük.



### **3.8. Laktát-dehidrogenáz (LDH) cytotoxicitás vizsgálat**

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.

### **3.9. Immunfluoreszcens festés**

Az  $\alpha$ -SMA és az IL-20RB szöveti, illetve a sejteken (HT-29, HK-2, CCD-18Co) belüli elhelyezkedését immunfluoreszcens festési eljárással vizsgáltuk. A DNS kimutatására (magfestés) Hoechst 33342 festéket használtunk. A festődést Nikon C2 konfokális lézer scanning mikroszkóppal vizsgáltuk.

### **3.10. RNS izolálás, cDNS szintézis és PCR**

A mérések során a szövetekből és a sejtekből RNS-t izoláltunk, majd az RNS-ből komplementer DNS-t (cDNS) szintetizáltunk. A valós idejű RT-PCR méréseket LightCycler 480 automatán végeztük. A vizsgálni kívánt génekre specifikus primereket az NCBI (National Center for Biotechnology Information) nukleotid adatbázisában található szekvenciák alapján terveztük. 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.

### **3.11. Enzimhez-kötött ellenanyag-vizsgálat (ELISA)**

A humán szérum IL-24 szint meghatározás szendvics ELISA módszerrel történt.

### **3.12. Áramlási citometria (FACS)**

A HT-29 és a HK-2 sejteket permeabilizáltuk, majd anti-TGF- $\beta$ 1, illetve anti-PDGF-B primér antitesttel, ezt követően szekunder antitesttel inkubáltuk. A negatív kontrollként szolgáló mintákat csak szekunder antitesttel jelöltük. Az analízist a BD FACSAria<sup>TM</sup> végeztük. Az élő sejteket méret és granuláltság szerinti szórás alapján határoztuk be. Az eredményeket a BD FACSDiva Software segítségével elemeztük.

### **3.13. Fehérje izolálás és Western blot**

A vizsgált humán és egér colon biopsziás mintákat homogenizáltuk, centrifugáltuk, majd a felülúszó összfehérje koncentrációját spektrofotometriás módszer segítségével határoztuk meg. A fehérje mintákat denaturáltuk, elektroforetizáltuk, majd a szeparált fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk. Az aspecifikus kötőhelyeket és kölcsönhatásokat gátoltuk, majd IL-24,  $\alpha$ -SMA, fibronectin, pro-collagen-1 $\alpha$ 2, illetve GAPDH specifikus primér antitesttel, majd szekunder antitesttel inkubáltuk a membránokat. Belső kontrollként GAPDH-t alkalmaztunk. Az immunreaktív sávokat a kemilumineszcens Western-blot-detektálási protokoll segítségével jelenítettük meg, az így kapott képeket VersaDoc 5000MP rendszerrel vizualizáltuk, majd a Quantity One v4.6.9 és az ImageJ 1.48v szoftverek alkalmazásával analizáltuk. Végül az eredményeket relatív optikai denzitásként fejeztük ki.

### **3.14. Statisztikai analízis**

Az adatokat a GraphPad Prism 6.01 software segítségével analizáltuk. Az adatsorok normál eloszlását Kolmogorow-Smirnov teszt segítségével határoztuk meg. Normál eloszlás esetén a csoportok közötti különbséget 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.

## **4. Eredmények**

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

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. A Crohn-beteg gyermekek IL-24 szérumszintje emelkedett volt a kontroll gyermekek szérumszintjéhez képest.

Az IL-24 biológiai aktivitását akkor tudja kifejezni, ha a célsejt expresszálja az IL-24 heterodimer receptorainak IL-20RB alegységét. Az IL-20RB immunopozitivitás mind a kontroll, mind a betegek vastagbél biopsziás mintáiban egyaránt jelen van a lamina propria rétegében, az epitél sejtek basalis régiójában és a subepitéliális fibroblasztokban.

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

Vizsgálataink során azt találtuk, hogy DSS kezelés hatására megemelkedett az IL-24 mRNS expressziója és fehérje szintje.

Az IL-20RB immunopozitivitás mind a DSS indukált, mind a kontroll egerek vastagbél nyálkahártyájában egyaránt jelen van a lamina propria rétegében, az epitél sejtek basalis régiójában és a subepitéliális fibroblasztokban.

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

Az IBD patomechanizmusában jól ismert gyulladásos faktorokkal kezelt mononuklearis sejteken (PBMC, LPMC) vizsgáltuk azok hatását az IL-24 expressziójára. Míg az IL-1 $\beta$ , LPS és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés növelte mind a PBMC-k, mind az LPMC-k IL-24 mRNS expresszióját, addig a TNF- $\alpha$  csökkentette a PBMC-k IL-24 expresszióját a kontroll, vehikulummal kezelt sejtekéhez képest. A TGF- $\beta$ 1 és IL-17 kezelés nem volt hatással a PBMC, illetve LPMC sejtek IL-24 expressziójára.

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

Immunfluoreszcens jelölést követően azt találtuk, hogy a HT-29 colon epitél és a HK-2 vese proximális tubulus epitél sejtvonal is kifejezi az IL-24 receptorainak közös alegységét, az IL-20RB-át.

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 epitél sejtek életképességét. Ugyanakkor az IL-24 kezelés fokozta a HT-29 és a HK-2 sejtek TGF- $\beta$ 1 és PDGF-B termelését, illetve a TGF- $\beta$ 1 + és a PDGF-B + sejtek arányát.

#### **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 igazoltuk. Az IL-24 kezelés nem volt hatással a fibroblaszt sejtek életképességére, proliferációjára, illetve eredő extracelluláris mátrix termelésére.

Az IL-24 kezelés fokozta a sejtek *COL3A1* és *FN1*, illetve *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* és *TIMP2* mRNS expresszióját a kontroll csoporthoz képest. Továbbá az IL-24 kezelés hatással volt a sejtek migrációs tevékenységére.

#### **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 *Tgfb1*, *Pdgfb*, *Colla1*, *Col3a1*, *Fn1*, *Acta2*, *Mmp2*, *Mmp9*, *Timp1* és *Timp2* mRNS expresszióját a vehikulum kezelt kontrollokhoz képest. Az IL-24 kezelés hatására az FN1 és pro-COL1A2 fehérje mennyisége nőtt a kontroll csoporthoz képest.

#### **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, és csökkentette az egerek testsúlyát. 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.

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

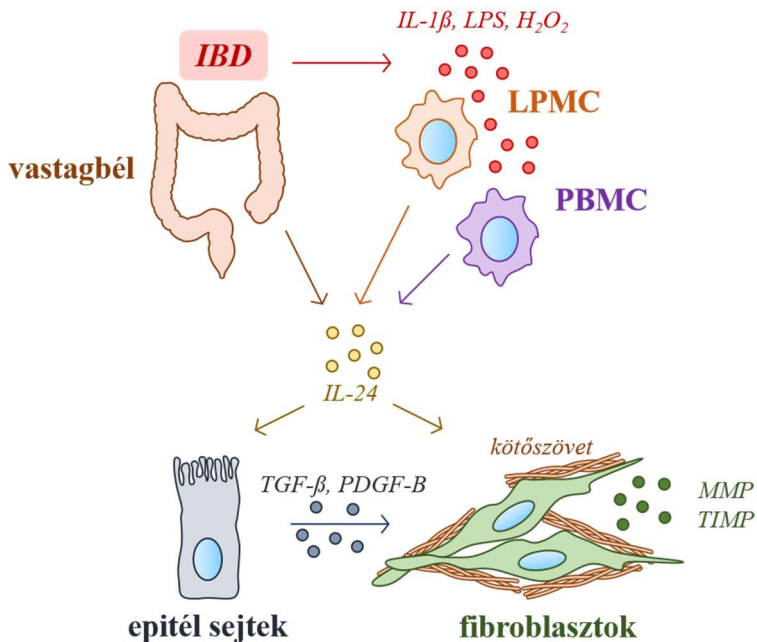
A WT, illetve *Il20rb* KO egerek vastagbélében megvizsgáltuk a szöveti átrendeződésben szerepet játszó faktorok szintézisében a DSS kezelés hatására bekövetkező molekuláris biológiai változásokat. A WT csoportban a DSS kezelés a *Tgfb1*, *Colla1*, *Col3a1*, *Mmp2*, *Mmp9* és *Timp1* expresszióját növelte, míg az *Acta2* és *Timp2* expresszió csökkent a kezeletlen csoporthoz képest. Az IL-20 receptor hiányában DSS kezelés során kevésbé növekedett a *Tgfb1*, *Pdgfb*, *Colla1*, *Col3a1*, *Fnl*, *Acta2*, *Mmp2*, *Timp1* és *Timp2* mRNS expressziója a WT csoporthoz képest.

A kísérlet során mért mRNS szintű változásokhoz hasonlóan azt tapasztaltuk, hogy a DSS kezelés mellett a FN1 és az  $\alpha$ 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.

## 5. Következtetések

PhD munkám célja az interleukin-24 molekula gyulladásoos bélbetegségek patomechanizmusában betöltött szerepének vizsgálata humán biopsziás és szérum minták vizsgálata, valamint *in vivo* DSS-indukálta colitises egermodell és *in vitro* sejtes kísérletek segítségével. Eredményeink alapján elmondható:

1. Az IL-24 fokozottan expresszálódik a kezeletlen IBD-s gyermekek vastagbél nyálkahártyájában, fokozottan jelen van a beteg gyermekek szérumában, 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, kezeletlen csoporthoz 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 $\beta$ , LPS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és TNF- $\alpha$  hatással van a mononukleáris sejtek (PBMC, LPMC) IL-24 expressziójára.
4. Az IL-20RB jelen van a HT-29 vastagbél epitélisejteken, az IL-24 kezelés fokozza a sejtek profibrotikus faktor (TGF- $\beta$  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 eger vastagbél nyálkahártyában a profibrotikus faktorok, és a különböző extracelluláris mátrix komponensek termelését.
7. Kisebb mértékű profibrotikus faktor és extracelluláris mátrix komponens termelődést figyeltünk meg az *Il20rb* KO egerek DSS indukált vastagbélgyulladásáa során, mint a WT egerek esetén.



**1. 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.**

## **6. Saját publikációk jegyzéke**

### **6.1. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények**

- Ónody 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

### **6.2. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent közlemények**

- 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, Győrffy H, Veres G, Tulassay T, Vannay A, Arató A. (2014) Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  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