

# Az interleukin-24 szerepe a cöliákia patomechanizmusában

Doktori értekezés

**Rokonay Réka**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Vannay Ádám, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Menyhart Otília, Ph.D., egyetemi adjunktus  
Dr. Szántai-Kis Csaba, Ph.D., vezető kutató

Szigorlati bizottság:

Elnök: Dr. Szabó András, D.Sc, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Szokol Bálint, Ph.D., kutató vegyész  
Dr. Szirtesné Dr. Tomsits Erika, Ph.D., egyetemi docens

Budapest  
2022

## TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke.....	5
1 Bevezetés.....	7
1.1 A cöliákia.....	7
1.1.1 A cöliákia patomechanizmusa.....	7
1.1.2 A cöliákia tünetei, gyakori társbetegségei, szövődményei.....	10
1.1.3 A cöliákia diagnózisa.....	12
1.1.4 In vitro és in vivo modellek a cöliákia kutatásában.....	14
1.1.5 A cöliákia terápiája.....	16
1.2 Szöveti átrendeződés, regeneráció a bélben.....	18
1.2.1 Eпитél sejtek.....	19
1.2.2 Immunsejtek.....	20
1.2.3 Miofibroblasztok.....	21
1.3 Az IL-20 citokin alcsalád.....	22
1.3.1 IL-19.....	23
1.3.2 IL-20.....	23
1.3.3 IL-24.....	23
1.3.4 Az IL-19, -20, -24 citokinek receptorai.....	24
2 Célkitűzések.....	25
3 Módszerek.....	26
3.1 Betegek és biopsziák.....	26
3.2 Sejtkultúrák és kezelések.....	27
3.2.1 Rekombináns fehérjék.....	27
3.2.2 FHs74Int vékonybél epítél sejtvonal.....	27
3.2.3 Primer duodenális miofibroblasztok.....	28

3.2.4	Perifériás vérből izolált mononukleáris sejtek (PBMC).....	29
3.3	Molekuláris biológiai módszerek.....	30
3.3.1	Immunhisztokémiai festés .....	30
3.3.2	Immuncitokémiai festés.....	30
3.3.3	RNS izolálás, reverz transzkripció, polimeráz láncreakció (PCR).....	31
3.3.4	Fehérje izolálás, Western-blot .....	33
3.3.5	Enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat (ELISA) .....	34
3.3.6	MTT sejtproliferációs és viabilitás teszt.....	34
3.3.7	LDH citotoxicitás teszt .....	35
3.3.8	Áramlási citometriás Annexin V apoptózis teszt .....	35
3.3.9	Kollagén lerakódást kimutató Sirius Red teszt.....	36
3.3.10	Miofibroblasztok stresszrost orientációjának, morfológiájának vizsgálata grafikus analízissel .....	36
3.4	Statisztika.....	37
4	Eredmények.....	39
4.1	Az IL-19, -20, -24, IL-20RB, $\alpha$ -SMA és FN mennyiségének vizsgálata cöliákiás és kontroll gyermekek duodenum nyálkahártyájában .....	39
4.2	Az IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ és IL-17 kezelések hatása az IL-19, -20, -24, valamint az IL-20RA, IL-20RB és IL-22RA receptor alegységek expressziójára.....	42
4.2.1	FHs74Int vékonybél epitél sejtek .....	42
4.2.2	Primer duodenális miofibroblasztok.....	45
4.2.3	Perifériás vérből izolált mononukleáris sejtek .....	48
4.3	Az oxidatív stressz hatása a vékonybél epitél sejtjeire .....	51
4.4	Az IL-24 kezelés hatása a vékonybél epitél sejtekre .....	54
4.5	Az IL-24 kezelés hatása a duodenális miofibroblasztokra .....	56
4.5.1	Az IL-24 kezelés hatása a duodenális miofibroblasztok proliferációjára. 56	

4.5.2	Az IL-24 kezelés hatása a duodenális miofibroblasztok stresszrost hálózatára.....	57
4.5.3	Az IL-24 kezelés hatása a duodenális miofibroblasztok kötőszövet termelésére.....	59
5	Megbeszélés.....	61
6	Következtetések.....	69
7	Összefoglalás .....	70
8	Summary.....	72
9	Irodalomjegyzék .....	73
10	Saját publikációk jegyzéke .....	95
11	Köszönetnyilvánítás .....	97

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

tTG2	2-es típusú szöveti transzglutamináz
$\alpha$ -SMA	alfa simaizom aktin
APC	antigénprezentáló sejtek
CTL	citotoxikus T limfocita
CRP	C-reaktív protein
EMA	endomízium elleni antitest
ELISA	enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat
EGF	epidermális növekedési faktor
ECM	extracelluláris mátrix
FBS	magzati borjú szérum
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
FN	fibronektin
GAPDH	gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz
GFD	gluten-free diet, glutén mentes diéta
HLA	humán leukocita antigén
IBD	gyulladásos bélbetegség
IBS	irritábilis bél szindróma
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etánszulfonsav
HLA	humán leukocita antigén
IFN- $\gamma$	interferon gamma
IL-	interleukin-
IEL	intraepiteliális limfocita
Ig	immunglobulin
IGF	inzulinszerű növekedési fektor
LDH	laktát dehidrogenáz
MICA/B	fő hisztokompatibilitási komplex lánc gén A/B
MMP	mátrix metalloproteázok
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium -bromid
TIMP	mátrix metalloproteázok szöveti inhibitorai

MF	miofibroblaszt
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex
PBMC	perifériás vérből izolált mononukleáris sejtek
PBS	foszfátpufferelt sóoldat
PCR	polimeráz láncreakció
pdMF	primer duodenális miofibroblaszt
PI	propídium-jodid
Treg	regulátoros T sejt
TGF- $\beta$	transzformáló növekedési faktor béta
TGA	transzglutamináz elleni antitest
TLR	toll-szerű receptorok
TNF- $\alpha$	tumor nekrosis faktor alfa
TRIS	trisz-(hidroximetil)-aminometán
PDGF-B	vérmelezke eredetű növekedési faktor B

## 1 BEVEZETÉS

### 1.1 A cöliákia

A cöliákia, más néven gluténszenzitív enteropátia, vagy lisztérzékenység, egy első sorban a vékonybelet érintő autoimmun megbetegedés, amelyet a táplálékkal a béllumenbe kerülő glutén vált ki az arra genetikailag fogékony egyéneknél [1]. A cöliákia az enteropátia mellett számos, ugyancsak a glutén immunogén hatásához köthető extraintesztinális tünettől járhat, valamint a vérben specifikus autoantitestek jelennek meg, ezért szisztémás, egész szervezetet érintő kórképnek is tekinthető [2]. A cöliákia gyakorisága magas, a népesség mintegy 1%-át érinti világszerte, és előfordulása folyamatosan növekvő tendenciát mutat [3]. Jelenleg egyetlen igazán hatékony terápiája az élethosszig tartó szigorú glutén mentes diéta (gluten-free diet, GFD), amely az esetek nagyrésztében a bálnyalakártyát károsító kórfolyamat leállítását és a tünetek teljes remisszióját eredményezi [2]. Azonban a rendkívül nagy teher, amit a GFD betartása ró a betegeknek, valamint a terápiára nem reagáló, úgynevezett refrakter esetek egyre növekvő száma új terápiás megoldások keresését teszi indokolttá. Ennek érdekében a cöliákia patomechanizmusának minél pontosabb megismerése szükséges.

#### 1.1.1 A cöliákia patomechanizmusa

##### 1.1.1.1 A cöliákia kialakulásáért felelős tényezők

##### Glutén

A cöliákia kialakulásáért felelős legfőbb faktor a glutén, amely egy a búzában, rozsban és árpában megtalálható, prolamin típusú tartalékfehérje [4]. Az immunogén hatásért a glutén alkoholban oldódó fehérjefrakciója, a búza gliadinja, a rozs secalinja és az árpa hodreinje felelős. Ezek a fehérjék prolinban és glutaminban rendkívül gazdagok, ami különösen ellenállóvá teszi őket a gyomor, a hasnyálmirigy, és a bél epitél sejteinek lumen felületét borító keféselegy enzimjeinek proteolitikus hatásával szemben [5, 6]. Az emésztő folyamatok ellenére megmaradó hosszú fehérje fragmensek az epitél sejtrétegen transz-, vagy paracelluláris úton képesek a vékonybél lamina propriajába jutni és ott a cöliákiára jellemző kóros immunreakciót kiváltani.

### Genetikai háttér

A cöliákia kialakulásának nem csak a gluténbevitel, hanem az egyén genetikai hajlama is feltétele. A betegség genetikai meghatározottságát bizonyítja a családi halmozódás, a betegek elsőfokú rokonainak körében a cöliákia gyakorisága megközelítőleg 8% [7]. A jelenleg ismert genetikai faktorok közül a *HLA-DQA1* és *HLA-DQB1* gének (HLA: humán leukocita antigén) által kódolt HLA-DQ2 és HLA-DQ8 antigénekkal való asszociáció a legmeghatározóbb. A HLA-DQ2 és -DQ8 dimer, II-es típusú fő hisztokompatibilitási komplex (MHC II) típusú molekulák, amelyek az antigénprezentáló sejtek (APC) felszínén fejeződnek ki. A cöliákias betegek több, mint 90%-a HLA-DQ2, a maradék 10%-uk pedig HLA-DQ8 pozitív. A két antigént azonban nem csak a cöliákiasok, hanem az egészséges európai és észak-amerikai népesség közel 40%-a is hordozza, ami azt jelzi, hogy ez a genetikai háttér szükséges, de nem elégséges feltétele a cöliákia megjelenésének [8, 9]. Újabb vizsgálatok a HLA mellett 42 nem-HLA régiót is összefüggésbe hoztak a cöliákiával, amelyek közül számos kódol olyan géneket, amelyek termékei a cöliákia patomechanizmusában szerepet játszó molekuláris útvonalak (pl. NF- $\kappa$ B, JAK-STAT, CCR szignalizációs útvonal) elemei [10, 11].

### Környezeti tényezők

A glutén fogyasztás rendkívül gyakori, a cöliákiára való hajlamot meghatározó HLA gének pedig a populáció 40%-ában jelen vannak, a cöliákia ennek ellenére csak a népesség kb. 1%-át érinti. Ez a tény a cöliákia kialakulásában a környezeti tényezők szerepét is felveti [12]. Az elmúlt évtizedekben számos környezeti hatás szerepét vizsgálták, azonban a különböző tanulmányok eredményei rendkívül ellentmondásosak. Az elsők között merült fel a csecsemőkori anyatejes táplálás időtartamának, az első gluténbevitel idejének, valamint a korai életévekben fogyasztott glutén mennyiségének szerepe. Bár a legelső vizsgálatok a rövidebb ideig tartó anyatejes táplálást [13], a 4 hónapos kor előtti vagy 7 hónapos kor utáni első gluténbevitt [14], illetve a nagymennyiségű gluténfogyasztást az első életévekben kockázat növelő tényezőként mutatták ki [15], ezeket az összefüggéseket egyik későbbi vizsgálat sem tudta megerősíteni. Szintén felmerült a születés körüli tényezők közül a születés földrajzi helyének, az évszaknak, a szülés módjának (hüvelyi szülés vagy császármetszés), és az anya szülés előtti időszakban való gluténfogyasztásának szerepe [15]. Ezek közül egyedül a nyári születés, mint kockázati tényező nyert bizonyítást [16]. A gyermekkori fertőzések,



különösen a bélrendszert érintő megbetegedések (pl. rotavírus) kockáztnövelő hatását több tanulmány is megerősíti [17-19]. A gyógyszerek közül a proton pumpa inhibitorok szedése jelentősen növeli a cöliákia kialakulásának esélyét [20], viszont egyik, gyermekkorban potenciálisan felírható antibiotikum szedése sem bizonyult rizikótényezőnek [21]. Említésre méltó még a mikrobiom összetételének szerepe a cöliákia kialakulásában. Több vizsgálat alapján a cöliákiás betegek vékonybelében, illetve székletében található baktériumflóra összetétele jelentősen eltér az egészségesektől [22, 23]. Egy tanulmányban *Clostridium*, *Prevotella* és *Actinomyces* specioseket azonosítottak cöliákiások bélnyálkahártyájában, míg az egészségesekben ezek nem voltak jelen [24]. Elterést tapasztaltak még a *Bacteroides*, *Proteobacterium*, *Lactobacillus*, és *Bifidopacterium* speciosek arányában cöliákiások és egészségesek bélflórája között [25, 26].

#### 1.1.1.2 A cöliákia során kialakuló immunválasz mechanizmusa

A cöliákiára jellemző krónikus gyulladásért, valamint az ennek következtében kialakuló boholyatrófiáért és kripta hiperpláziáért adaptív- és veleszületett immunrendszeri mechanizmusok egyaránt felelősek.

A glutén részleges emésztése következtében létrejövő nagy méretű peptidok transzcitózissal, vagy a fellazult sejtkapcsoló struktúrák révén paracellulárisan jutnak át a bél epitél sejtrétegén, és kerülnek a kötőszövet, immunsejtek, és fibroblasztok alkotta lamina propriába [6, 27]. Itt a glutén peptidok módosításon esnek át, a 2-es típusú szöveti transzglutamináz (tTG2) keresztköti, illetve glutaminsavvá deamidálja a peptidok glutamin oldalláncait [28]. Az így fokozottan immunogénné váló peptidokat az APC-k (monociták, makrofágok, dendritikus sejtek) HLA-DQ2 és HLA-DQ8 felszíni receptoraik segítségével mutatják be a Th1 típusba tartozó, csak a cöliákiásokban jelen lévő glutén-specifikus CD4+ T-sejteknek, így aktiválva azokat [29, 30]. Újabb irodalmi adatok szerint az antigén bemutatásban glutén-, illetve tTG2-specifikus B-sejtek is részt vesznek [9, 27]. Az aktivált glutén-specifikus CD4+ T-sejtek proinflammatorikus citokineket, többek között interferon gammát (IFN- $\gamma$ ), tumor nekrozis faktor alfát (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL-) 21-et, IL-4-et szecernálnak, amelyek segítik a fehérvérsejtek kitapadását, aktiválják a Th2 sejteket, monocitákat, citotoxikus T-sejteket, valamint a fibroblasztokat, illetve hozzájárulnak a veleszületett immunrendszer részét képező intraepiteliális limfociták (IEL) aktiválásához is [31]. A Th2 sejtek citokinjei felelősek a

B-sejtek plazmasejtté differenciálásáért, amelyek antitesteket termelnek a tTG2, valamint a deamidált gliadin peptidek ellen. A tTG2 elleni antitestek nagyban hozzájárulnak a bélnyálkahártya epitél rétegének károsodásához, mivel a tTG-t megkötve megakadályozzák a transzformáló növekedési faktor béta (TGF- $\beta$ ) aktiválását, ami elengedhetetlen az epitélium regenerációjához, újjáépüléséhez. Ezen kívül felelősek lehetnek a cöliákia bélrendszeren kívüli tüneteinek kialakulásáért is [32].

A leírt folyamatokkal egyidőben a veleszületett immunválasz mechanizmusai is beindulnak. Bizonyos glutén peptidek, illetve egyes nem glutén típusú búzafehérjék (pl.  $\alpha$ -amiláz) az APC-k TLR4 mikrobiális mintázatfelismerő receptoraihoz kötődve [33] indukálják azok IL-15, IL-18 és I-es típusú interferon termelését [27, 34, 35]. A glutén peptidek közvetlenül is képesek epitéliális stresszt kiváltani [36], ami ugyancsak gyulladásszerű citokinek, többek között nagy mennyiségű IL-15 termelődéséhez vezet [37]. Glutén hatására fokozódik az epitél sejtek MHC-1 szerű MICA, MICB és HLA-E felszíni fehérjéinek expressziója is [38]. Az IL-15 aktiválja a különböző T-sejt típusokból álló IEL populációt, amelyek a veleszületett immunválasz fő effektorai. Cöliákiában számuk jelentősen megemelkedik, és jól korrelál a nyálkahártya atrófia súlyosságával [39]. Az IEL-ek a Fas receptor/Fas ligand mechanizmussal [40], NKG2D receptorukkal az epitél sejtek felszíni MICA/MICB fehérjéihez kapcsolódva [41], valamint granzim és perforin enzimeik segítségével [42] a nyálkahártya epitél sejtjeinek apoptózisát indukálják, így legfőbb okozói a boholyatrófia kialakulásának. Az IL-15 felelős a természetes ölösejt szerű citotoxikus T limfociták (CTL) aktiválásáért is, amelyek NKG2C - HLA-E kapcsolat révén ugyancsak az epitélsejtek apoptózisát okozzák [43-45]. Említést érdemel még az IL-15 regulátoros T ( $T_{reg}$ ) sejtekre kifejtett gátlása, ami által elvész ezeknek a sejteknek a glutén iránti toleranciát fokozó hatása. A cöliákiás nyálkahártyában nagy mennyiségű  $\gamma/\delta$  T-sejt mutatható ki. Ezek a sejtek képesek a CTL-ek gátlása által az atrófia mértékét csökkenteni, és számuk tartós glutén mentes diéta esetén is magas marad [38].

### ***1.1.2 A cöliákia tünetei, gyakori társbetegségei, szövődményei***

#### ***1.1.2.1 Tünetek***

Bár egyre nagyobb figyelem irányul rá, és a betegséggel kapcsolatos ismeretanyag is egyre nő, a cöliákia még napjainkban is aluldiagnosztizált, ami részben a rendkívül

változatos formában jelentkező tüneteknek köszönhető [2]. Annak ellenére, hogy a cöliákia elsősorban a vékonybél megbetegedése, a tünetek gyakorlatilag bármely szervrendszert érinthetik.

A cöliákia leggyakrabban gyermekkorban, a glutén bevezetését követő években jelentkezik. Klasszikus malabszorciós formája krónikus hasmenéssel, hasi fájdalommal, puffadással, étvágytalansággal, fogyással, valamint növekedésben való elmaradással jár. Mivel az esetek döntő többségében a cöliákia időben felismerésre kerül, a gyakori vizes hasmenéssel, hányással, kiszáradással, és sokkal járó cöliakiás krízis gyakorlatilag már nem fordul elő [46]. Egyre gyakoribb azonban, hogy a betegség idősebb korban jelentkezik, ekkor a betegek általában enyhe emésztőrendszeri tünetekkel, fáradékonysággal fordulnak orvoshoz [47]. Klasszikus, és atípusos esetben is jellemzőek a felszívódási zavar miatt kialakuló különböző vitaminhiányok és következményes hiánybetegségek (vashiányos vérszegénység, vérzékenység), valamint a szacharóz és laktóz felszívódási zavara. Ezeken kívül gyakori a késői nemi érés, a menstruációs, illetve fertilitási zavarok, valamint a spontán vetélés [48, 49]. Változatos neurológiai tüneteket, így epilepsziát, ataxiát, neuro- és mielopátiát is leírtak cöliákia kapcsán [50], valamint ritkán kardiovaszkuláris problémák is megjelenhetnek [51]. A gluténintolerancia következtében alakulhat ki a *dermatitis herpetiformis*, egy krónikus, viszkető bőrbetegség, amely gyakran a cöliákia egyetlen látható tüneteént jelentkezik [52].

Más autoimmun betegségben szenvedők, illetve a cöliakiások elsőfokú rokonainak célzott szűrése során kerültek felfedezésre a betegség tünetmentes, úgynevezett csendes, és látens formái [53]. Csendes cöliákia esetén kimutatható a vékonybél károsodása, valamint a tTG ellen termelt antitestek is. Látens cöliakiában azonban csak az antitest vizsgálat ad pozitív eredményt, a vékonybél szövettani képe normális, bár később boholyatrófia kialakulásával kell számolni.

#### 1.1.2.2 Gyakori társbetegségek

A cöliákia gyakran társul más autoimmun, illetve szisztémás betegségekkel [54], többek között 1-es típusú diabétesz mellitusszal [55], autoimmun pajzsmirigybetegségekkel, Sjögren-szindrómával, krónikus autoimmun hepatitiszsel, juvenilis reumatoid artritiszsel, vitiligoval [56], valamint gyakoribb Down- és Turner-szindrómás betegekben is [57]. Ezeken kívül az átlag populációhoz viszonyított előfordulása nagyobb immunglobulin A (IgA)-nefropátiás [58] és szelektív IgA hiányos [59] betegek esetében is.

### *1.1.2.3 Szövődmények*

A cöliákiára jellemző súlyos boholyatrófia tartós fennállása nagy kockázatot jelent malignus szövődmények kialakulására. Kezeletlen, vagy terápiára nem reagáló cöliakiásokban gyakoribb a vékonybél T-sejtes limfómája [60], valamint az egyéb vékonybéltre, szájra, garatra és nyelőcsőre lokalizálódó tumorok előfordulása [61].

### *1.1.3 A cöliákia diagnózisa*

A cöliákia diagnózisa az ESPGHAN (European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) ajánlása szerint a beteg panaszain, szerológiai vizsgálatokon, valamint a vékonybélből vett biopszia minták Marsh klasszifikáció szerinti szövettani elemzésén alapul [62]. A cöliákia klinikai vonatkozásában az utóbbi évek legnagyobb áttörése, hogy a cöliákia diagnózisa biopsziás mintavétel nélkül is kimondható típusos tünetek, két alkalommal mért, a normális tízszeresét meghaladó kettes típusú szöveti transzglutamináz elleni (TGA) IgA antitest titer, valamint endomízium elleni antitest (EMA) pozitivitás esetén. Típusos tünetek mellett csak ezen szerológiai paraméterek hiányában van szükség a biopszia elvégzésére. Amennyiben felmerül a szerológia fals negativitása (pl. glutén bevitel hiányában), a HLA meghatározás nyújthat segítséget. Ezekon felül diagnosztikus kritérium, hogy a klinikai kép összefüggést mutasson a gluténbevitellel, a gluténmentes diétát a panaszok megszűnése és a szerológiai paraméterek normalizálódása kövesse.

#### *1.1.3.1 Szerológiai vizsgálatok*

Amennyiben a tünetek alapján felmerül a cöliákia lehetősége, a beteg szérumában szükséges az IgA és IgG típusú EMA, valamint TGA mennyiségének vizsgálata [63]. Az EMA és TGA normálishoz képest emelkedett értéke igazolja a cöliákia diagnózisát. A vizsgálat a terápia hatásának nyomon követésére és a fokozott kockázati csoportba tartozók szűrésére is alkalmas.

#### *1.1.3.2 Laboratóriumi vizsgálatok*

Bár a jellemző eltérések nem specifikusak cöliákiára, a diagnosztikus folyamat részét képezik laboratóriumi vizsgálatok is. Gyakori az alacsony vas, transferrin, ferritin, szérum-összfehérje, albumin, kalcium, koleszterin és protrombin szint, valamint a zsírszéklet.

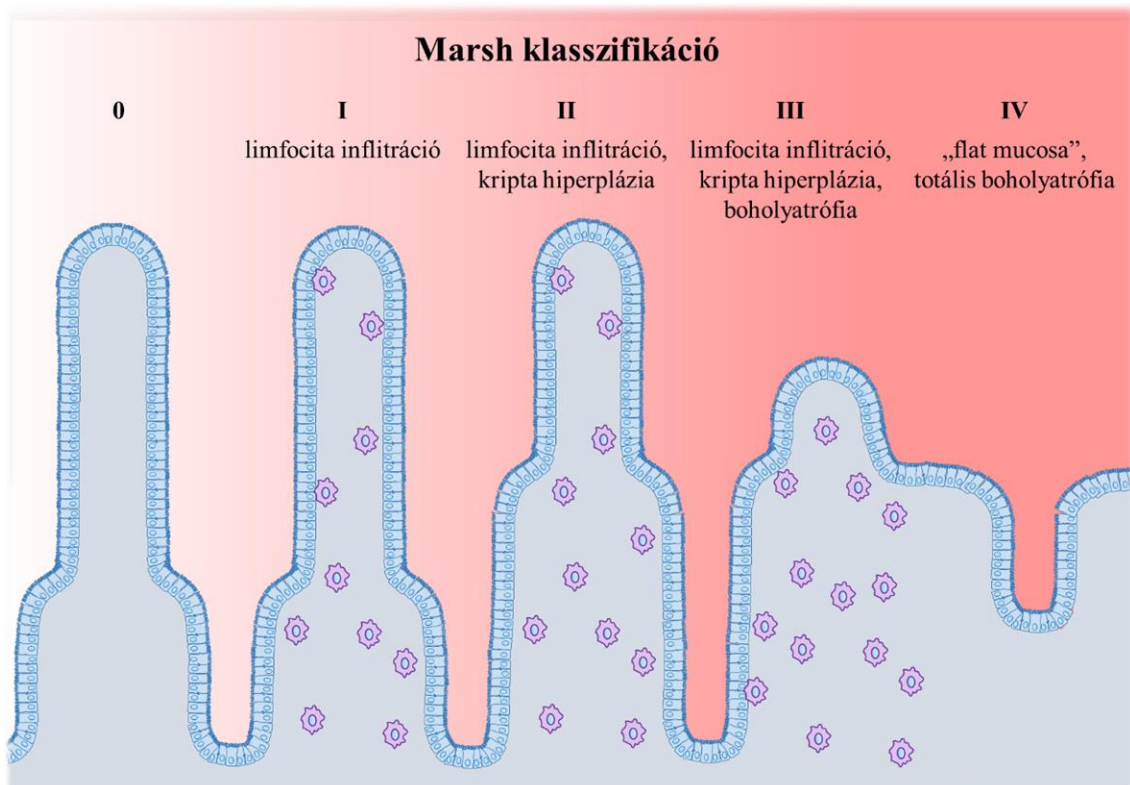
### 1.1.3.3 *Szövettani vizsgálat*

A szövettani vizsgálatot a duodénumból, illetve a jejunumból endoszkóppal vett mintán végzik [64]. A szövettani mintákat a módosított Marsh-kritériumok szerint értékelik és osztályozzák, melyek a következők: emelkedett IEL szám, a lamina propria sejtes infiltrációja, boholyatrófia, valamint kripta hiperplázia.

Az IEL szám emelkedése a legkorábban jelentkező, és legérzékenyebben változó eltérés a glutén bélnyálkahártyára kifejtett patológiás hatása következtében. Az ép vékonybél nyálkahártyára jellemző maximum 40 IEL/100 enterocita arányt meghaladó érték a mukózában zajló kóros immunfolyamatot jelez. Az IEL szám emelkedése nem specifikus a cöliákiára. A lamina propriába fokozott mértékben infiltrálódó sejtek között limfociták, granulociták, valamint monociták is megtalálhatóak. A bélkárosodás súlyosabb formáiban a kripta hiperplázia, majd a boholyatrófia is megjelenik. A nyálkahártya károsodásának mértékét jelző paraméter a boholy/kripta arány.

A módosított Marsh-kritériumok alapján a cöliákia a következőképpen klasszifikálható (1. ábra):

- Marsh 0: preinfiltratív forma, normális szerkezetű nyálkahártya, IEL<40/100 enterocita
- Marsh I: infiltratív forma, normális szerkezetű nyálkahártya, de az IEL-k emelkedett számban vannak jelen
- Marsh II: hiperplasztikus forma, normális boholyszerkezet, de a kripták hiperpláziásak és IEL-k emelkedett számban vannak jelen
- Marsh III/a,b,c: destruktív forma, parciális/ szubtotális/ totális boholyatrófia, kripta hiperplázia, IEL-k emelkedett számban vannak jelen
- Marsh IV: hipoplasztikus forma (flat mucosa), totális boholyatrófia, de a kriptamagasság és az IEL szám normális



**1. ábra. Sematikus ábra a Marsh klasszifikáció alapjául szolgáló szövettani eltérésekről.** A cöliákia diagnózisának részeként a betegség súlyossága a vékonybél szöveti elemzésével jellemezhető. A besorolás alapja az immunsejt infiltráció, kripta hiperplázia, illetve a boholyatrófia mértéke. (Saját ábra)

#### 1.1.3.4 *HLA-DQ* tipizálás

Diagnosztikai nehézségek esetén, valamint a cöliakiás beteg rokonaiban a betegség rizikójának felmérése érdekében meghatározható a HLA-DQ2 és DQ8 allélok jelenléte.

#### 1.1.4 *In vitro és in vivo modellek a cöliákia kutatásában*

Mivel a cöliákia patomechanizmusa rendkívül összetett, annak kísérleti körülmények között történő vizsgálata jelentős kihívás elé állítja a kutatókat [65]. Az alábbi fejezet célja a cöliákia patofiziológiájának egyes alfolyamatait modellező kísérletrendszerek ismertetése, melyek segíthetnek a betegség lefolyásának jobb megértésében, a diagnózis felállításában, valamint új terápiás lehetőségek kifejlesztésében.

#### 1.1.4.1 *In vitro*

A cöliákia modellezésére kifejlesztett sejtes rendszerek több csoportba oszthatók aszerint, hogy epitél sejteket, immunsejteket, vagy vegyes sejtpopulációt, esetleg biopszia tenyészetet alkalmaznak.

Számos tanulmány kimutatta, hogy a glutén *in vitro* körülmények között is gyulladós válasz és károsodás kialakulását eredményezi epitél sejteken. A kísérletek során p31-43, illetve p57-68 gliadin peptidfragmensek segítségével indukálnak oxidatív stresszt, sejthalált, illetve gyulladós citokinek (IL-15, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) felszabadulását [66-68]. Bár a sejtvonalakon végzett kísérletek nagy előnye, hogy a sejtek könnyen felszaporíthatóak, a kísérletek jól reprodukálhatóak, a különböző sejtvonalak (Caco-2, IEC-6, FHS74Int, T84) azonban nagyon heterogén választ adhatnak a glutén expozícióra [65, 69]. Az epitél sejteken végzett vizsgálatokhoz hasonlóan egyes immunsejtek, így T-sejtek, monociták, dendritikus sejtek is fokozott gyulladós faktor (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) termelést mutatnak proteolízisen átesett gluténnal történő kezelést követően [70-73].

A fent említett modellek hátránya, hogy csupán az egyes sejtípusok válasza vizsgálható egy időben, a cöliákia patomechanizmusában azonban fontos szerepet játszik a bélhám homeosztázisában résztvevő sejtek közötti interakció. Ennek vizsgálatára alkalmas modell a vékonybél szövetből izolált primer epitél sejtek, fibroblasztok, antigénprezentáló sejtek és T-sejtek vegyes kultúrája, amelynek néhány napig tartó fenntarthatósága alatt a sejtek kriptaszerű struktúrát, úgynevezett organoid tenyészetet alkotnak [65, 74]. A legtöbb és legkomplexebb információ az *in vitro* fenntartott, gliadinnal kezelt vékonybél biopsziák vizsgálatával nyerhető. Ez a modell a sejt-sejt interakciók vizsgálata mellett alkalmas szövettani változások tanulmányozására, valamint nyomon követhető a jelátvitel, vagy akár a glutén transzport is [75, 76]. Ezen bonyolult rendszerek hátránya azonban, hogy létrehozásuk, fenntartásuk speciális körülményeket igényel, csak invazív mintavétel árán hozzáférhető, valamint néhány napos élettartamuk miatt az elvégezhető kísérletek száma rendkívül korlátozott [69].

#### 1.1.4.2 *In vivo*

Mind a betegségek sejtes és molekuláris mechanizmusának megértésében, mind a lehetséges terápiás lehetőségek vizsgálatában fontos szerepet kapnak az állatkísérletek. A cöliákia modellezésére használt *in vivo* rendszerek bár jóval komplexebb képet mutatnak, mint az előzőekben ismertetett *in vitro* módszerek, a cöliákia a többi betegséghez képest

is nehezen, hiányosan adaptálható állatokra [65, 77]. Ennek oka, hogy ezidáig nem sikerült olyan modellt létrehozni, amelyben egyszerre lenne jelen a humán betegségre jellemző minden patofiziológiai tényező és tünet, így az egyes modellekben a cöliákiának csak egy-egy aspektusa vizsgálható.

Magasabb rendű állatokban, így kutyákban, majmokban, lovakban glutén fogyasztás hatására spontán kialakulhat a humán betegséghez hasonló glutén-szenzitív enteropátia, azonban sem az ehhez szükséges idő, sem a kórképet produkáló állatok száma nem előre jelezhető [78-80]. Kiszámíthatatlanságuk, csekély mértékű reprodukálhatóságuk miatt így a spontán modellek rutinszerű alkalmazhatósága limitált.

A tudományos vizsgálatok során leggyakrabban rágcsálókat, főként egereket, és patkányokat alkalmaznak kísérleti állatként [81]. Cöliákia vizsgálatára is léteznek rágcsáló modellek, azonban a betegség indukciója nagyon speciális körülményeket igényel [82]. Patkányokban az újszülött csiramentes állatokat IFN- $\gamma$  injekcióval, majd hosszú ideig gliadinnal kezelve cöliákiára jellemző szövettani eltérések válthatók ki [83]. Hasonló tapasztalható több generáción át GFD diétán tartott Balb/c egerekben glutén-expozíció hatására [84]. A specifikus, betegség patomechanizmusában szerepet játszó útvonalak genetikailag módosított egereken vizsgálhatók. Ilyen modellek többek között a HLA-DQ2/DQ8, illetve IL-15 transzgen-, valamint a Rag 1 génkiütött egerek, amelyekben glutén hatására T-sejt mediált vékonybélgyulladás alakul ki [85].

### ***1.1.5 A cöliákia terápiája***

A cöliákia jelenlegi egyetlen igazán hatékony terápiája az élethosszig tartó, szigorú glutén mentes diéta, amely az esetek nagyrésztében a tünetek teljes remisszióját és a bélnyálkahártya gyógyulását eredményezi [86]. Azonban a rendkívül nagy teher, amit a GFD pontos betartása ró a betegekre [87, 88], valamint a terápiára nem reagáló, úgynevezett refrakter esetek egyre növekvő száma [89] új terápiás megoldások keresését teszi indokolttá.

A cöliákia kórfolyamatának egyre részletesebb, pontosabb megismerésének köszönhetően az elmúlt évek során számos új, a betegség patomechanizmusának egyes pontjait célzó hatóanyag klinikai vizsgálata indult el [90, 91].

A larazotid acetát a bélhám barrierfunkciójának biztosításában kulcsszerepet játszó sejtkapcsoló struktúrák (tight junction) állapotát hivatott megőrizni. Bár a fázis II



vizsgálatok alapján a gyógyszer nem tudta meggátolni a bél permeabilitásának romlását, mérsékelte a gasztrointesztinális tünetek súlyosságát [92].

Az endopeptidáz enzimek (pl. ALV003) terápiás alkalmazásával a cél a glutén immunogén fragmenseinek enzimatis bontása már a béllumenben, mielőtt még az epitél rétegen átjutva a lamina propriába penetrálnának és immunreakciót váltanának ki. Jelenleg is zajló klinikai vizsgálatok alapján alacsony gliadin bevitel mellett az ALV003 (más néven Latiglutenase) endopeptidáz hatékony lehet a boholyatrófia megelőzésében és a tünetek mérséklésében. [93].

A glutén bontásának és a nyálkahártyába jutásának megelőzése a cél glutén-megkötő polimerek alkalmazásával is. A BL-7010 hatóanyag preklinikai vizsgálatai biztató eredményeket hoztak, csökkenő nyálkahártyakárosodást és immunsejt infiltrációt tapasztaltak, valamint a hatóanyag segítette a bél normál permeabilitásának megőrzését. Humán hatékonyságának vizsgálatára jelenleg klinikai vizsgálatok zajlanak [91].

Az elmúlt évek során a mikrobiom szerepe is felmerült a cöliákia patomechanizmusában [94]. A betegség során megfigyelhető diszbiózist probiotikummal kezelve javultak a betegek gasztrointesztinális tünetei [95, 96]. Ez a javulás azonban elsősorban a cöliákia mellett irritábilis bél szindrómában (IBS) is szenvedő betegekre jellemző, ami felveti annak lehetőségét, hogy a probiotikumok inkább az IBS, semmint a cöliákia tüneteinek kezelésére alkalmasak [95, 97].

Ígéretesnek tűnt a Nexvax2 immunmoduláns vakcina, melynek célja a betegek deszenzitizálása, a  $T_{reg}$  sejtválasz fokozása volt. Bár az állatkísérletek biztató eredményekkel szolgáltak, a humán vizsgálatok során a vakcina hatástalannak bizonyult [98, 99].

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a krónikus fertőzések segítenek az autoimmun, illetve allergiás kórképek kialakulásának megelőzésében. Erre alapozva vizsgálták a cöliakiás betegek bőre alá injekciózott horogféreg hatásait, amely a tapasztalatok szerint a gasztrointesztinális tünetek és a bélnyálkahártya állapotának javulását eredményezte [100].

Hatékonyak lehetnek a cöliákia kezelésére a más kórképekre kifejlesztett célzott immunterápiák, amelyek alkalmazásának célja a cöliakiára jellemző T-sejt túlaktiváció mérséklése [90, 91]. Az IL-15 jelátvitelét gátló tofacitinib állatkísérletekben tartósan mérsékelte a boholyatrófiát, és egy esettanulmány szerint a kezelt cöliakiás beteg

tüneteinek remisszióját okozta [101]. Jelenleg IL-15 elleni humanizált antitestek fejlesztésén is dolgoznak [102]. Ugyancsak egy esetriport tanúsága szerint a gyulladással járó bélbetegség (IBD) kezelésében használt TNF- $\alpha$  gátló infliximab hatékony lehet a refrakter cöliákia kezelésében [103].

A nagy affinitású mesterséges glutén-peptid analóg HLA blokkoló hatóanyagok célja az APC-k és T-sejtek közti interakció, az antigénbemutatás és immunaktiváció gátlása. Sikerült kifejleszteni olyan polipeptideket, amelyek sejtes körülmények között a gluténhez képest nagyságrendekkel erősebben kötődnek a HLA-DQ2, illetve -DQ8 receptorokhoz, de *in vivo* hatékonyságuk még nem bizonyított [104, 105].

Preklinikai, illetve klinikai I fázisban jár a tTG2 gátlók fejlesztése, melyek sejtes- és állatmodellekben hatékonyan gátolják a cöliákia patomechanizmusában központi szerepet játszó enzim működését [91, 106].

A gyógyszerkutatás mellett zajlanak élelmiszeripari fejlesztések is, melyek célja a glutén immunogén epitópjainak eliminálása a gabonából. Ilyen eljárás lehet a gabona genetikai módosítása, a gabonatermékek enzimatis emésztése fermentálás útján, vagy az immunogén fragmensek módosítása mikrohullám, illetve hő közlésével [93].

## 1.2 Szöveti átrendeződés, regeneráció a bélben

Szöveti átrendeződés alatt azt a folyamatot értjük, amely során egy meghatározott funkcióval bíró, ép szövet struktúrája és ezáltal a funkciója valamilyen külső inger hatására megváltozik [107, 108]. A szöveti átrendeződést számos tényező kiválthatja, az endogén induktorok mellett ilyenek a gyulladás, fertőzés, autoimmun reakció, toxinok, illetve a sugárzás, vagy mechanikai sérülés következtében kialakuló szövetkárosodás. Függetlenül a kiváltó októl és az érintett szervtől, a folyamat patomechanizmusa egységes képet mutat [109]. A sérült sejtekből gyulladással járó mediátorok szabadulnak fel, melyek hatására a környező erek kitágulnak, permeabilitásuk fokozódik, valamint aktiválódnak a szöveti regeneráció központi sejtjei, a miofibroblasztok. A tápcsatorna funkciójából következően a bélhám a lumen felől folyamatos mechanikai, biológiai és kémiai ingereknek van kitéve, ezért a bél epitél sejtjeinek károsodása és regenerációja állandóan jelen lévő, egymással párhuzamosan zajló folyamat [110]. Az epitél réteg alapjául szolgáló, tehát a reepitelizációhoz nélkülözhetetlen bazális membrán komponenseit a

miofibroblasztok termelik, amely sejtek más szervektől eltérően az egészséges bélszövetben is állandóan jelen vannak.

A szöveti regeneráció célja a szövet fiziológiás struktúrájának és funkciójának a biztosítása. Azonban ha a kiváltó inger hosszútávon fennmarad (pl. krónikus gyulladás esetén), az átrendeződés rendkívül precízen szabályozott folyamata zavart szenved, a folyamatban részt vevő különböző sejtípusok proliferációja és elpusztulása, a kötőszövet felépülése és bontása közti kényes egyensúly felbomlik [111]. Kóros szöveti átrendeződés számos bélrendszeri megbetegedéshez társul. A legismertebb és leggyakoribb ezek közül az IBD szövődeményeként fellépő hegesedés (az extracelluláris mátrix kóros felszaporodása), de az irradiációs -, és a krónikus ischaemiás bélgyulladás, valamint a cisztás fibrózis is okozhatja a bélfal hegesedését. Szintén a kóros szöveti átrendeződés eredményei a gasztrointesztinális tályogok és fekélyek, hasonlóan a cöliákiás betegek vékonybelében megfigyelhető jellegzetes szövettani elváltozáshoz, a boholyatrófiához és a kripta hiperpláziához [112, 113]. Érdekes, hogy bár a cöliákiára maga a hegesedés nem jellemző, a bélnyálkahártya nagyfokú, funkciósökkenéssel járó átalakulása figyelhető meg, amely háttérben többek között a bazális membrán struktúrájának és a miofibroblasztok működésének abnormalitása áll [110, 114, 115]. A cöliákiás betegek bélhámjának kóros átépülése súlyos következményekkel jár. A nem megfelelő szöveti gyógyulás, az epitél sejtréteg újraképződésének hiánya a funkciósökkenés miatt felszívódási zavarokhoz, gyermekkorban a fejlődés elmaradásához vezet, a bélhám integritásának csökkenése pedig előrevetíti és segíti a krónikus gyulladásos állapot fenntartását [116].

Mivel jelen tanulmányban a cöliákiára jellemző szöveti átrendeződést a folyamatban alapvető jelentőséggel bíró sejtípusok szintjén vizsgáljuk, a fejezet következő részében ezen sejtípusok főbb tulajdonságai, a szöveti átrendeződés folyamatában betöltött szerepük kerül ismertetésre.

### **1.2.1 Epitél sejtek**

Ahogy a gasztrointesztinális rendszer nagy részét, a vékonybél belső, luminális felszínét is egyrétegű epitélium borítja, amelyet számos különböző sejtípus alkot. Legnagyobb mennyiségben az enterociták vannak jelen, amelyek a bélbolyhokat alkotva a bélhám legfontosabb feladatait végzik. Természetes barrierként funkcionálnak a bél lumenében

található antigénekkal, mikroorganizmusokkal szemben, emellett biztosítják az elfogyasztott táplálékból történő víz- és tápanyagfelszívást [117]. Főként a kriptákban találhatóak a kehelysejtek, Paneth-sejtek, endokrin sejtek és M-sejtek, melyek különböző, a bélhámot védő anyagok, mucinok, hormonok kiválasztásában, illetve a bélhám immunválaszának szabályozásában vesznek részt [118].

A bélhám az őt érő mechanikai, biológiai és kémiai ingerek révén folyamatos erózióknak van kitéve, egyes adatok szerint 5 naponta megújul a teljes sejtréteg [116]. A bélhám integritásának fenntartása az epitél sejtek jól szabályozott és koordinált proliferációját, vándorlását, majd apoptózisát igényli [119, 120]. Amennyiben ez nem teljesül, a kontrollálatlan sejthalál a bélhám homeosztázisának felborulásához, integritásának csökkenéséhez, permeabilitásának növekedéséhez vezet [121-123].

A bélnyálkahártya károsodásában kiemelkedő szerepet játszik az oxidatív stressz mértéke és az epitél sejtek antioxidáns védekezőképessége közti egyensúly felborulása [112]. Az oxidatív stresszt első sorban a bélhámra beszűrődő immunsejtek által termelt, az immunogén anyagok mellett az epitél sejteket is károsító oxigén- és hidroxilgyökök okozzák, de bizonyos anyagok, mint például a gliadin, közvetlenül is kiválthatják [124]. A folyamat fontosságát jól mutatja, hogy mind IBD-s, mind cöliákiás betegek bélmintáiban mért antioxidáns kapacitás jól korrelál a betegség progressziójával [125-127].

Stressz, illetve károsodás hatására az epitél sejtekből különböző citokinek, kemokinek pro-inflammatorikus faktorok szabadulnak fel, amelyek közül legismertebb az IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-33, illetve TNF- $\alpha$  [128]. Ezek a molekulák kiemelt szerepet játszanak a lokális immunválaszt elindításában az immunsejtek infiltrációját és aktivációját indukálva.

### **1.2.2 Immunsejtek**

A gyulladás helyén a bélhám szövetébe T-sejtek, makrofágok, neutrofilek infiltrálódnak a véráramból. Az immunsejtek által kibocsátott proinflammatorikus faktorok hatására a sérülés környékén vazodilatáció és fokozott érpermeabilitás figyelhető meg [107, 108]. A monociták, makrofágok, granulociták emésztő enzimeket termelnek, amelyek bontják az epitél sejtek alapját képező bazális membránt, hogy megkönnyítsék az immunválaszban és a regenerációban résztvevő sejtek vándorlását [112]. A felsorolt funkciók mellett a

szövetbe jutó immunsejtek elsődleges feladata a szöveti törmelékek, az elpusztult sejtek, illetve az idegen organizmusok eltávolítása. A gyulladásos fázist követően az immunsejtek által termelt citokinek, kemokinek indítják el a regenerációs folyamatot is, mely célja a funkcióképes szövet helyreállítása [108]. Ezek a gyógyulást segítő faktorok, mint a TGF- $\beta$ , vérlemezke eredetű növekedési faktor B (PDGF-B), epidermális növekedési faktor (EGF), inzulinszerű növekedési faktor (IGF), aktiválják a regenerációban kulcsfontosságú miofibroblasztokat, és az epitél sejtek proliferációjának és vándorlásának fokozása révén segítik az epitélium újraépülését [112, 116]. Az immunsejtek szerepe a szöveti átépülésben azonban kettős. Erős gyulladás esetén az immunválasz túlaktiválódhat, és az immunsejtek által túlzott mértékben termelt proteázok, illetve reaktív gyökök kiterjedt szöveti károsodást okozhatnak [129, 130].

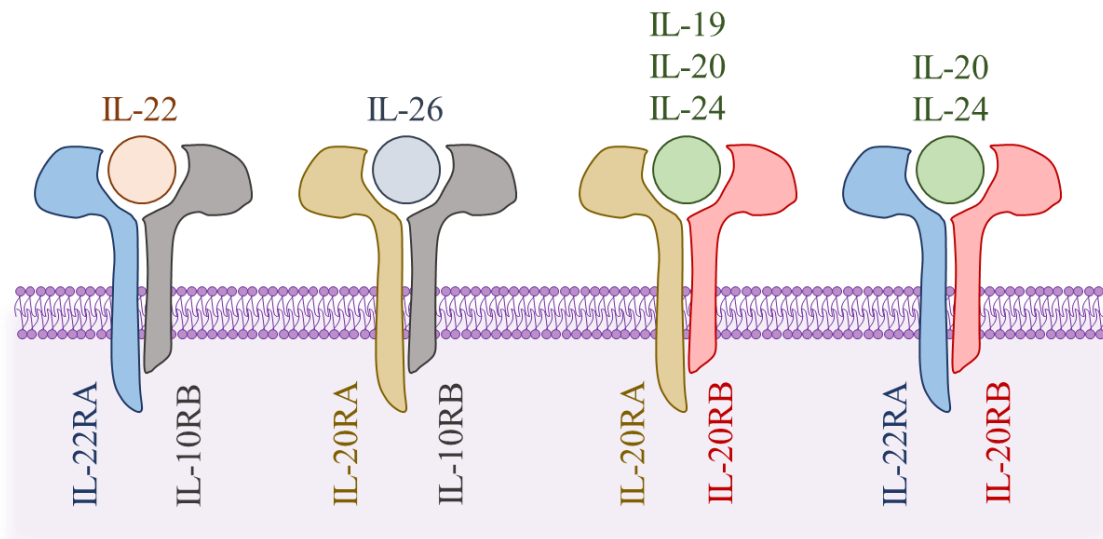
### **1.2.3 Miofibroblasztok**

A miofibroblasztok (MF) a szöveti átrendeződés kulcsfontosságú szereplői. A sejtípus eredetét illetően számos teória létezik [131, 132]. A jelenleg legelfogadottabb elmélet szerint a MF-ok nyugvó állapotú fibroblasztokból differenciálódnak szöveti sérülés hatására, átalakulásukért elsősorban a TGF- $\beta$  és a PDGF felelősek [133-136]. Az egyetlen szerv a bél, amely szövetében a MF-ok fiziológias állapotban is jelen vannak, így biztosítva az állandó erózióknak kitett bélnyálkahártya folyamatos megújulását. A MF-ok fő biomarkere a sejtvázsukat alkotó  $\alpha_{\text{simazom}}$ -aktin ( $\alpha$ -SMA), amelynek köszönhetően az izomsejtekhez hasonló erőteljes kontrakcióra képesek [137, 138]. A MF-ok az extracelluláris mátrix (ECM) komponenseinek (pl. kollagének, fibronektinek, integrinek), illetve a szilárd kötőszöveti struktúra kialakításához szükséges enzimeknek (mátrix metalloproteázok (MMP), illetve ezek szöveti inhibitorai (TIMP)) legfőbb termelői, valamint fokozott proliferációs készséggel bírnak [139]. A különböző immunsejt típusok mellett a MF-ok által termelt MMP-k felelősek a szöveti ECM megbontásáért, megkönnyítve ezzel az immunválaszban és a regenerációban szerepet játszó sejtek infiltrációját a kitágult, fokozott permeabilitással bíró erekből [140]. A funkcióképes szövet visszaépülését a sérülés helyén felszaporodva segítik. Az ECM komponensek, MMP és TIMP enzimek termelésének kényes egyensúlyával alakítják ki azt a kötőszöveti alapot, mely a sérült epitél réteg újjáépülését biztosítja [140]. Azonban a szövetet károsító inger hosszú távú fennmaradása esetén ez az egyensúly a túlzott

sejtproliferáció és kötőszövettermelés irányába tolódva felborulhat, ami a szövet hegesedéséhez vezet [111].

### 1.3 Az IL-20 citokin alcsalád

Az IL-10 család részét képező IL-20 citokin alcsaládba (2. ábra) öt citokin, az IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 és az IL-26 tartozik [141, 142]. Ezek közül is külön csoportot alkot az IL-19, IL-20 és IL-24, melyek közös, heterodimer receptorokon keresztül fejtik ki hatásukat [143]. A közös receptoruk ellenére azonban biológiai funkcióik elkülönülnek [144]. Irodalmi ismereteink alapján a citokin alcsalád tagjait számos sejttípus termelheti, forrásai lehetnek immunsejtek (főként Th2 sejtek), illetve szöveti sejtek, így keratinociták, epitel és endotél sejtek, valamint fibroblasztok [145, 146]. Elsődlegesen a szervezet védekezési rendszerében, immunfolyamatok regulációjában és a szövet homeosztázisának fenntartásában betöltött szerepük ismert [147]. A fejezet a továbbiakban az IL-19, IL-20 és IL-24 citokinek, illetve receptoraik főbb funkcióit ismerteti.



**2. ábra.** Az IL-20 citokin alcsalád tagjai és transzmembrán receptorai. Az IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 és IL-26 az IL-20 citokin alcsaládba tartoznak, biológiai hatásukat heterodimer receptor komplexeikhez kötődve fejtik ki. Az alcsaládon belül külön csoportot képez az IL-19, IL-20 és IL-24, melyek az IL20-RB alegységet tartalmazó receptor típusokhoz kötődhetnek (Saját ábra Rutz és mtsai alapján [147]).

### **1.3.1 IL-19**

Az IL-19 kettős szerepet tölt be az immunsejtek regulációjában. Egyaránt ismert pro- és anti-inflammatorikus hatása, amely a targetként szolgáló T-sejtek, illetve monociták típusától függ [141, 148]. Ezzel összhangban több, krónikus gyulladással járó betegség kapcsán is ellentétes szerepét írták le. Míg a pszoriázis patomechanizmusában a gyulladást segíti [149], addig IBD [150] és reumatoid arthritisz [151] esetén anti-inflammatorikus hatással bír. Emellett az IL-19 kísérletes körülmények között fokozza az érzékelődést és az epitélium újraképződését, így szerepet játszhat a sebgyógyulás mechanizmusában is [152].

### **1.3.2 IL-20**

Az IL-20 citokinnek jobbra betegségek progressziójában betöltött hatásai ismertek [153]. Pro-inflammatorikus szerepét több krónikus gyulladással járó betegség, így reumatoid arthritisz [154], valamint pszoriázis [155, 156] kapcsán is leírták, de ismert, az érlelmeszesedést fokozó hatása is [157]. Emellett serkenti az angiogenezist [158] és a daganatos sejtek proliferációját [159] ezért feltételezik daganatkeltő szerepét. Ezen ismeretekre alapozva több humán klinikai vizsgálat zajlik, amelyekkel anti-IL-20 antitesttel történő kezelések eredményességét igyekeznek bizonyítani pszoriázisos, illetve reumatoid arthritiszes betegekben.

### **1.3.3 IL-24**

Az IL-24 citokint (szemben az IL-20-szal) elsőként tumorszupresszorként azonosították, innen ered a molekula alternatív neve, a melanóma differenciálódással kapcsolatos gén-7 (MDA-7) fehérje is [160]. Az elmúlt években számos daganattípus, így tüdő-, emlő- és vastagbélrák kísérletes modelljében bizonyították daganatellenes hatását [161], melynek hátterében az IL-24 tumoros sejtekre specifikus apoptózis indukáló, illetve (az IL-19 és IL-20 citokinekkal ellentétben) az angiogenezist gátló funkciója áll [162-164].

További vizsgálatok során szerepe több, krónikus gyulladással és szöveti átrendeződéssel járó betegség kapcsán felmerült, emelkedett mennyiségét írták le pszoriázisban [165], reumatoid arthritiszben [166], illetve IBD-ben [167, 168] szenvedő betegek szöveteiben.

Bár Andoh és mtsai eredményeik alapján azt feltételezik, hogy az IL-24 protektív a bél gyulladásával szemben [167], káros hatásairól is több tanulmány született. Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy az IL-24 szerepet játszhat a krónikus vesebetegség patomechanizmusában, az epitél sejteken pro-fibrotikus faktorok termelését fokozva hozzájárul a veseszövet hegesedéséhez [169, 170]. Hasonló hatást tapasztaltunk az IBD *in vitro* és *in vivo* experimentális modelljeiben is, ahol az IL-24 fokozta a vastagbélben található MF-ok aktivációját, illetve az ECM lerakódását [171]. Mindezzel egybevág egy, a közelmúltban megjelent közlemény, melyben leírják, hogy az IL-24 deficiencia protektív tüdőfibrózissal szemben [172].

#### **1.3.4 Az IL-19, -20, -24 citokinek receptorai**

Az IL-19, IL-20 és IL-24 kétféle heterodimer receptoron keresztül fejtheti ki hatását. Mindkét receptorban megtalálható az IL-20RB alegység, amely az IL-20RA vagy az IL-22RA alegységekkel kapcsolódva alkot funkcionális komplexet [143]. A ligandkötődés főként JAK, STAT, valamint SOCS jelátviteli útvonalakat aktiválhat, de a citokineknek ezektől független hatását is leírták már [143, 162, 167]. Bár a citokinek ugyanazon receptorokhoz kötődnek, ahogy az előző alfejezetekben ismertetett adatok is mutatják, az IL-19, IL-20 és IL-24 funkciója egyes betegségek, modellek kapcsán akár teljesen ellentétes is lehet [144].

A receptor antitesttel vagy génkiütéssel történő gátlása immunmoduláns hatással bír [146]. Mérsékli a T-sejtek aktivációját, illetve az immunválasz mértékét a bőrben, valamint segíti a sebgyógyulást a pszoriázis, illetve a kontakt dermatitisz kísérletes modelljében [173-176]. Kutatócsoportunk eredményei alapján az *Il20rb* génkiütött egerekben alacsonyabb a bél dextrán-szódium-szulfát (DSS) indukálta gyulladásának és hegesedésének [171], valamint a vese unilaterális uréter obstrukcióval kiváltott hegesedésének [170] mértéke a vad típusú állatokhoz képest.



## 2 CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során a cöliákia patomechanizmusának pontosabb megértésére törekedtünk, különös tekintettel a gyulladt nyálkahártyában lejátszódó szöveti átrendeződés folyamataira. Vizsgálataink fókuszpontjában az IL-20 citokin alcsalád molekulái álltak. Célkitűzéseink a következők voltak:

- A szöveti átrendeződésre jellemző markerek vizsgálata vékonybél nyálkahártyában.
- Az IL-19, -20, -24 citokinek és receptoruk génexpressziójának, illetve a fehérjetermékek mennyiségének vizsgálata egészséges, illetve cöliákiás gyerekek bélmintáiban.
- Annak megállapítása, hogy mely sejttípusok felelősek az IL-19, -20, -24 citokinek termeléséért a bélben.
- A cöliákia patomechanizmusában igazoltan szerepet játszó gyulladássos citokinek hatásának vizsgálata az IL-19, -20, -24, valamint az IL-20RA, -RB, és IL22RA receptor alegységek expressziójára.
- Az IL-24 szerepének megismerése a bél szöveti átrendeződésének folyamatában, a nyálkahártya epitel sejteire és a duodenális miofibroblasztokra kifejtett hatásának vizsgálata által.

### 3 MÓDSZEREK

#### 3.1 Betegek és biopsziák

Vizsgálatainkat 16 frissen diagnosztizált cöliákiás, valamint 14 kontroll gyermek duodenumából származó biopszián végeztük el, melyeket a Semmelweis Egyetem I. sz. Gyermekgyógyászati Klinikáján gyűjtöttünk a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi, Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának engedélyével (TUKEB 58/2013). A vizsgálatainkban való részvételt minden gyermek szülei beleegyező nyilatkozat aláírásával hagyták jóvá. Az egyes vizsgálati csoportok nemek, valamint életkor szerinti eloszlását az 1. táblázatban tüntettük fel.

A cöliákia diagnózisa az ESPGHAN diagnosztikai kritériumai alapján került felállításra [62, 177]. Minden cöliákiás gyermeknél igazolható volt a boholyatrófia, valamint az emelkedett szöveti transzglutamináz szint. A kontroll csoportba tartozó gyermekeknél krónikus hasmenés, krónikus hasfájás, vagy növekedési elmaradás diagnosztikai algoritmusai miatt került sor felső endoszkópiás mintavételre, azonban esetükben a duodenális nyálkahártya szövettanilag épnek bizonyult.

Mintavételt követően a biopsziákat azonnal lefagyasztottuk, és a további feldolgozásig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

**1. táblázat. Biopsziavizsgálatba bevont csoportok klinikai jellemzői, főbb laboratóriumi paraméterei.** CD: cöliákiás; tTG: szöveti transzglutamináz

	<b>kontroll</b>	<b>CD</b>
Betegek száma	14	16
Nem	10 fiú / 4 lány	7 fiú / 9 lány
Életkor (átlag $\pm$ SD)	12,71 $\pm$ 4,81	6,75 $\pm$ 3,38
Lymphocyta szám	<40%	>40%
Anti tTg IgA (U/ml)	<20	125-291
Anti tTg IgG (U/ml)	<20	6-180

## 3.2 Sejtkultúrák és kezelések

### 3.2.1 Rekombináns fehérjék

Az FHs74Int sejtvonal fenntartása, valamint a különböző sejtes kísérletek során alkalmazott humán rekombináns fehérjékkel kapcsolatos információkat jelen bekezdésben foglaljuk össze.

Az EGF, TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-24, és PDGF-B humán rekombináns fehérjét az R&D Systems-től (Minneapolis, MN, USA), az IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  humán rekombináns fehérjét a Life Technologies-től (Carlsbad, CA, USA) szereztük be. Az EGF, TNF- $\alpha$ , és IL-24 törzsoldatát foszfátpufferelt sóoldattal (PBS), az IL-1 $\beta$  törzsoldatát desztillált vízzel, az IL-17, TGF- $\beta$ , és a PDGF-B törzsoldatát pedig 4 nM HCl oldattal készítettük. A megfelelő kezelési koncentrációk eléréséhez a törzsoldatokat az adott sejtnak megfelelő tápfolyadékkal hígítottuk.

### 3.2.2 FHs74Int vékonybél epitél sejtvonal

Az FHs74Int humán vékonybél epitél sejteket (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA) 30 ng/ml EGF-et, 10% magzati borjú szérumot (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), valamint 1% penicillin-streptomycin oldatot (Life Technologies) tartalmazó Hybri-Care tápfolyadékban (ATCC) tenyésztettük 37°C-on 5% CO<sub>2</sub> tartalom mellett. A tápfolyadékot 2-3 naponta cseréltük, és a sejteket 80-90%-os konfluencia elérésekor tripszin-EDTA oldattal (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) passzáltuk és kb. 1:3 arányban új tenyésztőflaskában vittük tovább. A sejtek *in vitro* mérésekhez történő felhasználása a 2. és 6. passzázs között történt. Az FHs74Int sejteket a kezelések előtt 24 órával az adott kísérlet igényeinek megfelelő lyukszámú sejtenyésztő lemezekre osztottuk és FBS mentes tápoldatban tartottuk őket.

Vizsgálataink során a következő kísérleti elrendezéseket alkalmaztuk:

Az RT-PCR és ELISA módszerrel végzett vizsgálatainkhoz a sejteket 6 (10<sup>5</sup> sejt/lyuk, 6 lyuk kezelési csoportonként), illetve 96 lyukú (10<sup>4</sup> sejt/lyuk, 5 lyuk kezelési csoportonként) sejtenyésztő lemezekre osztottuk. A 6 lyukú lemezekre kitett sejteket 100 ng/mL IL-1 $\beta$ -val, 10 ng/mL TNF- $\alpha$ -val, 0,5 nM TGF- $\beta$ -val, vagy 100 ng/mL IL-17-tel kezeltük 24 órán keresztül, és a kezelések *IL19*, *IL20*, *IL24*, *IL20RA*, *IL20RB*, és *IL22RA* mRNS expresszióra kifejtett hatását, valamint az IL-1 $\beta$ -val kezelt sejtek felülúszójában

az IL-24 fehérje mennyiségét vizsgáltuk. Az epitel sejtek oxidatív károsodását, és a folyamatban az IL-24 szerepét modellezve a 96 lyukú lemezre kitett sejteket 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -dal és 0,1 ng/mL IL-24-gyel kezeltük 24 órán keresztül, és a kezelések *IL1A*, *IL6* és *TNF* gyulladáscitokinek mRNS expressziójára kifejtett hatását vizsgáltuk.

Az MTT és LDH tesztek kivitelezéséhez a sejteket 96 lyukú ( $10^4$  sejt/lyuk,  $n=5$  lyuk kezelési csoportonként) sejtenyésző lemezekre osztottuk és 200, 400, 600, 800, vagy 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -dal és 0,1 ng/mL IL-24-gyel kezeltük 24 órán keresztül.

A sejtapoptózis mértékének Annexin V teszttel történő vizsgálatához a sejteket 6 lyukú sejtenyésző lemezekre osztottuk ( $3 \times 10^5$  sejt/lyuk,  $n=3$  lyuk kezelési csoportonként) és 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -dal és 0,1 ng/mL IL-24-gyel kezeltük 48 órán keresztül.

Minden kísérletben a tápfolyadékkal hígított vívőanyaggal kezelt sejtek szolgáltak kontrollként.

### 3.2.3 *Primer duodenális miofibroblasztok*

Kontroll gyermekek duodenum nyálkahártyájából vett biopsziákból primer miofibroblasztokat (pdMF) izoláltunk. A szöveteket 1 mg/ml kollagenázt (Sigma-Aldrich) tartalmazó PBS-ben homogenizáltuk, majd 37 °C-on 30 percen át emésztettük. Ezután a mintákat centrifugáltuk és PBS-sel mostuk, majd a szuszpendált pelletet 20% FBS tartalmú DMEM tápoldatba helyeztük. A letapadt sejteket  $\alpha$ -SMA festéssel karakterizáltuk. Ezt követően a pdMF-eket 10% FBS-t, valamint 1% penicillin-streptomycin oldatot tartalmazó DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) tenyésztettük 37°C-on 5%  $\text{CO}_2$  tartalom mellett. A sejtek további tenyésztése, illetve a velük végzett kísérletek során az FHs74Int sejteknél leírtakhoz hasonlóan jártunk el.

A pdMF-ekkel végzett vizsgálataink során a következő kísérleti elrendezéseket alkalmaztuk:

Az RT-PCR és ELISA módszerrel végzett vizsgálatainkhoz a sejteket 6 ( $10^5$  sejt/lyuk, 6 lyuk kezelési csoportonként), illetve 96 lyukú ( $10^4$  sejt/lyuk, 5 lyuk kezelési csoportonként) sejtenyésző lemezekre osztottuk. A 6 lyukú lemezekre kitett sejteket az FHs74Int sejteknél leírtakkal megegyező módon kezeltük, és az ott felsorolt génexpressziós változásokat, valamint az IL-1 $\beta$ -val és TNF- $\alpha$ -val kezelt sejtek felülúszójában az IL-24 fehérje mennyiségét vizsgáltuk. Az IL-24 sejtproliferációt

befolyásoló szerepét modellezve a 96 lyukú lemezre kitett sejteket 10 ng/ml PDGF-B-vel és 0,1 ng/mL IL-24-gyel kezeltük 24 órán keresztül, és a kezelések *PCNA*, *KI67*, *CDKN1A* és *TP53* sejtproliferációt szabályozó gének mRNS expressziójára kifejtett hatását vizsgáltuk.

Az MTT és LDH tesztekhez a sejteket 96 lyukú ( $10^4$  sejt/lyuk, n=5 lyuk kezelési csoportonként) sejtenyészti lemezekre osztottuk, és 10 ng/ml PDGF-B-vel és 0,01, 0,1, 1, 10, vagy 100 ng/ml IL-24-gyel kezeltük 24 órán keresztül.

A pdMF-ek  $\alpha$ -SMA immunpozitív stresszrostjainak orientációját vizsgálva a sejteket 4 lyukú tárgylemezekre osztottuk ( $2 \times 10^4$  sejt/lyuk), és 24 órán keresztül 0,5 nM TGF- $\beta$ -val, vagy 0,1 ng/ml IL-24-gyel, valamint 0,5 nM TGF- $\beta$ -val és 0,1 ng/ml IL-24-gyel kezeltük őket.

A Sirius Red teszthez a sejteket 96 lyukú ( $10^4$  sejt/lyuk, n=5 lyuk kezelési csoportonként) sejtenyészti lemezekre osztottuk, 0,5 nM TGF- $\beta$ -val és 0,01, 0,1, 1, 10, vagy 100 ng/ml IL-24-gyel kezeltük 48 órán keresztül, és az IL-24 kollagén lerakódást befolyásoló hatását vizsgáltuk.

Minden kísérletben a tápfolyadékkal hígított vivőanyaggal kezelt sejtek szolgáltak kontrollként.

### **3.2.4 Perifériás vérből izolált mononukleáris sejtek (PBMC)**

Glutén mentes diétát tartó cöliákiás (n=8, életkor  $10,9 \pm 3$  év), illetve kontroll (n=8, életkor  $10,3 \pm 4,6$ ) gyermekek frissen vett perifériás vérmintáiból (TUKEB 58/2013) mononukleáris sejteket izoláltunk sűrűség gradiens centrifugálással. A heparinos vérvételi csőbe gyűjtött vért azonos térfogatú PBS-sel hígítottuk, és centrifugacsőbe óvatosan Histopaque-1077 poliszukroz oldatra (Sigma-Aldrich) rétegeztük, majd szobahőmérsékleten centrifugáltuk. A centrifugálás hatására a vér különböző sejtes elemei, valamint a vérplazma sűrűségüknek megfelelően szétvááltak. A legfelső, vérplazmát tartalmazó réteget eltávolítottuk, majd az ez alatt található, opálos, limfocitákból és egyéb mononukleáris sejtekből álló réteget egy tiszta centrifugacsőbe átpipettáztuk. A sejteket 10% BSA-t tartalmazó PBS mosófolyadékkal kétszer mostuk, a mosások között egy centrifugálási lépést alkalmazva. A második mosást követően a sejteket 10% FBS-t, valamint 1% penicillin-streptomycin oldatot tartalmazó RPMI 1640 médiumban (ATCC) szuszpendáltuk. A sejteket 24 lyukú ( $5 \times 10^5$  sejt/lyuk, 6 lyuk kezelési

csoportonként) sejtenyésztő lemezekre osztottuk, és 100 ng/mL IL-1 $\beta$ -val, 10 ng/mL TNF- $\alpha$ -val, 0,5 nM TGF- $\beta$ -val, vagy 100 ng/mL IL-17-tel kezeltük 24 órán keresztül. A kezelések *IL19*, *IL20*, *IL24*, *IL20RA*, *IL20RB*, és *IL22RA* mRNS expresszióra kifejtett hatását RT-PCR módszerrel, az IL-1 $\beta$ -val kezelt sejtek felülúszójában az IL-24 fehérje mennyiségét ELISA módszerrel vizsgáltuk. A kezelések kontrolljaként tápfolyadékkal hígított vivőanyaggal kezelt sejteket alkalmaztunk.

### 3.3 Molekuláris biológiai módszerek

#### 3.3.1 *Immunhisztokémiai festés*

Az IL-24 és IL-20RB szöveti lokalizációjának vizsgálatához a fagyasztott duodenális biopszia mintákat Shandon Cryomatrix gyantába (ThermoElectron Co., Madison, WI, USA) ágyaztuk, majd a beágyazást követően 5  $\mu$ m vastag metszeteket készítettünk belőlük. Metanol és acetone 1:1 arányú elegyével történő fixálást követően a metszeteket szobahőmérsékleten 1 órán keresztül 1:100 hígítású nyúlban termelt anti-humán IL-24 antitesttel (ab182567; Abcam, Cambridge, United Kingdom), IL-20RB antitesttel (ab124332; Abcam), vagy az aktin rostokhoz kötődő Alexa Fluor 546 falloidinnel (A22283; Thermo Fisher Scientific) jelöltük. Többszöri PBS-es mosás után a metszeteket az IL-24 és IL-20RB jelölések esetében az adott primer antitest elleni 1:200 hígítású szekunder Alexa Fluor 568 (Invitrogen) antitesttel inkubáltuk szobahőmérsékleten, sötétben, 30 percen keresztül. A metszeteket desztillált vízzel mostuk, majd a sejtmagokat 1:2000 hígítású Hoechst 33342-vel (Sigma-Aldrich) festettük. Végül a mintákat Vectashield médiummal (Vector Laboratories, Burlingame, Calif., USA) fedtük. A jelölés specificitásának ellenőrzése, illetve az autofluoreszcencia kiküszöbölése végett a festési kontrollként alkalmazott metszetek esetében a primer antitesttel való jelölési lépést kihagytuk. A szövetek festődését Nikon C2 konfokális lézer szkennig mikroszkóppal vizsgáltuk (Nikon, Minato, Tokyo, Japan).

#### 3.3.2 *Immuncitokémiai festés*

Az FHs74Int duodenális epitel sejtekben és a pdMF-ekben az IL-20RB lokalizációjának, valamint az utóbbi sejtek stresszrost hálózatának vizsgálatához a sejteket citokémiai

festésre alkalmas 4 lyukú tárgylemezekre osztottuk és 24 órán át 37°C-on inkubáltuk. Ezt követően a sejteket PBS-sel mostuk, majd Cytotfix/Cytoperm oldattal (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) permeabilizáltuk szobahőmérsékleten 15 percen keresztül. Újabb mosási lépés után a sejteket szobahőmérsékleten 1 órán keresztül 1:100 hígítású nyúlban termelt anti-humán IL-20RB antitesttel (ab124332; Abcam), 1:1000 hígítású egérben termelt anti-humán  $\alpha$ -SMA antitesttel (sc-53015; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), vagy az aktin rostokhoz kötődő Alexa Fluor 546 falloidinnel (A22283; Thermo Fisher Scientific) jelöltük. A jelölési idő letelte után a sejteket WashPerm oldattal (BD Pharmingen) mostuk, majd az IL-20RB jelölés esetén 1:200 hígítású szekunder Alexa Fluor 568 antitesttel,  $\alpha$ -SMA jelölés esetén pedig Alexa Fluor 488 (Invitrogen) antitesttel inkubáltuk szobahőmérsékleten, sötétben, 30 percen keresztül. Desztillált vizes mosást követően a sejtmagokat 1:2000 hígítású Hoechst 33342-vel (Sigma-Aldrich) festettük. A megfestett minták fedését, a festési kontrollok elkészítését, valamint a minták vizsgálatát az *Immunhisztokémiai festés* című fejezetben leírtakkal megegyező módon végeztük.

### 3.3.3 RNS izolálás, reverz transzkripció, polimeráz láncreakció (PCR)

Vizsgálataink során duodenális nyálkahártya szövetből, FHs74Int sejtekből, pdMF-okból és PBMC-kből Geneaid Total RNA Mini Kit-et (Geneaid Biotech Ltd., New Taipei City, Taiwan) alkalmazva izoláltunk RNS-t a gyártó protokolljának megfelelően. A kinyert RNS mennyiségét és minőségét NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (BCM, Huston, TX, USA) határoztuk meg. Mintánként 500 ng mennyiségű RNS-ből komplementer DNS-t 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 az NCBI (National Center for Biotechnology Information) nukleotid adatbázisában található szekvenciákra terveztük, melyeket az Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, Iowa, USA) készített el. A különböző célmolekulák mRNS expresszióját az RPLP0 háztartási gén hányadosaként határoztuk meg az  $x = 2^{-\Delta C_p}$  képlet alapján [178]. A valós idejű RT-PCR reakciók során alkalmazott specifikus primer párokat a 2. táblázatban tüntettük fel.

**2. táblázat. Valós idejű RT-PCR mérések során használt primerek jellemzői.**F: forward primer; R: reverse primer; bp: bázispár; T<sub>a</sub>: optimális anellációs hőmérséklet

Gén	NCBI ref. szekvencia	Primer párok	Termék hossza	T <sub>a</sub>
<i>ACTA2</i> [179]	NM_001141945.2	F: 5'- ACT GAG CGT GGC TAT TCC TCC GTT -3' R: 5'- GCA GTG GCC ATC TCA TTT TCA -3'	111 bp	58 °C
<i>ACTB</i> [179]	NM_0011101.3	F: 5'- ACC GAG CGT GGC TAC AGC TTC ACC -3' R: 5'- AGC ACC CGT GGC CAT CTC TTT CTC G-3'	114 bp	53 °C
<i>CDKN1A</i>	NM_001220777.1	F: 5'- TTG TAC CCT TGT GCC TCG CTC AGG -3' R: 5'- ATC AGC CGG CGT TTG GAG TGG TAG -3'	126 bp	60 °C
<i>COL1A1</i>	NM_000088.3	F: 5'- CTG CCC CGG CGC CGA AGT C -3' R: 5'- CCC TCG ACG CCG GTG GTT TCT TG -3'	96 bp	60 °C
<i>COL3A1</i>	NM_000090.3	F: 5'- GTC CCC TGG CTC AAA TGG CTC AC -3' R: 5'- GGG GCC CCT TGC TCC TAT TAG TCC -3'	113 bp	56 °C
<i>FNI</i>	NM_212482.2	F: 5'- GGC TGC CCA CGA GGA AAT CTG C -3' R: 5'- GTG CCC CTC TTC ATG ACG CTT GTG -3'	229 bp	58 °C
<i>IL1A</i>	NM_000575.4	F: 5'- TCC TCC ATT GAT CAT CTG TCT CTG -3' R: 5'- ACC ACC ATG CTC TCC TTG AA -3'	152 bp	60 °C
<i>IL19</i>	NM_153758.2	F: 5'- CAC CTT CCC AAA TGT CAC TAT-3' R: 5'- ACG CCA GGA GGT TCT TG -3'	95 bp	51 °C
<i>IL20</i>	NM_018724.3	F: 5'- CGC CAA TTC CTT TCT TAC CAT CAA -3' R: 5'- TTC CCC CAA AGC CTT CAC AAC T -3'	157 bp	56 °C
<i>IL20RA</i>	NM_014432.3	F: 5'- CTG CGT ACA CGT GGA GTC CTT-3' R: 5'- CAC GGT AAT AGA TAT GGG CAA AAC-3'	148 bp	55 °C
<i>IL20RB</i>	NM_144717.3	F: 5'- GGT GCC GAG GAA CAT GTC AAA AT -3' R: 5'- AGG GCC AGT ACC AGG GGA ATG-3'	188 bp	58 °C
<i>IL22RA</i>	NM_021258.3	F: 5'- TGC CCC CTA CAT GTG CCG AGT GAA -3' R: 5'- AGG TGC AGG CGG CTT GGT GAC ATA -3'	145 bp	50 °C
<i>IL6</i>	NM_000600.4	F: 5'- AAA GAT GGC TGA AAA AGA TGG AT -3' R: 5'- CTC TGG CTT GTT CCT CAC TAC TCT -3'	146 bp	54 °C
<i>KI67</i>	NM_002417.4	F: 5'- CCC CTA CGG ATT ATA CTC AAC TTA -3' R: 5'- TGT AAT ATT GCC TCC TGC TCA T -3'	217 bp	54 °C
<i>IL24</i>	NM_006850.3	F: 5'- AGG CGG TTT CTG CTA TTC C -3' R: 5'- GAG CTG CTT CTA CGT CCA ACT -3'	55 bp	48 °C
<i>PCNA</i>	NM_002592.2	F: 5'- GCG GTC TGA GGG CTT CGA CAC CTA -3' R: 5'- CCG CGT TAT CTT CGG CCC TTA GTG -3'	134 bp	60 °C
<i>RPLP0</i>	NM_001002.3	F: 5'- GGG GGA ATG TGG GCT TTG TGT T -3' R: 5'- GGT GCC CCT GGA GAT TTT AGT GGT -3'	206 bp	59 °C
<i>SNAI1</i>	NM_005985.3	F: 5'- GCC ATG TCC GGA CCC ACA CTG -3' R: 5'- TCG GGA GAA GGT CCG AGC ACA C -3'	152 bp	60 °C
<i>SNAI2</i>	NM_003068.4	F: 5'- CGC GCT CCT TCC TGG TCA -3' R: 5'- GGC TGT ATG CTC CTG AGC TG -3'	159 bp	60 °C
<i>TP53</i>	NM_001126118.1	F: 5'- TGG TCT GGC CCC TCC TCA GCA TCT -3' R: 5'- TCA GGC GGC TCA TAG GGC ACC AC -3'	114 bp	60 °C
<i>TNF</i>	NM_000594.4	F: 5'- GAG GCG CTC CCC AAG AAG ACA -3' R: 5'- TGG GCC AGA GGG CTG ATT AGA G -3'	182 bp	60 °C
<i>VIM</i>	NM_003380.4	F: 5'- GAG GCT GCC AAC CGG AAC AAT GAC -3' R: 5'- TCC TGC AGG CGG CCA ATA GTG TCT -3'	203 bp	60 °C



### 3.3.4 Fehérje izolálás, Western-blot

A vizsgált duodenális nyálkahártya szövetmintákat lízis pufferben (10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin, 1% Triton-X 100, 0,1 M Tris-HCl (pH=8), 1 mM etilén-glikol-tetraecetsav (EGTA), 5 mM NaF, 1 mM fenil-metil-szulfonil fluorid (PMSF), 10 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)) homogenizáltuk. A felülúszók összfehérje koncentrációját spektrofotometriás módszerrel, Bradford reagenssel határoztuk meg (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A mintákhoz Leammli-féle treatment puffert (30% glicerol, 20% β-merkaptóetanol, 0,7 M SDS, 0,25 M Tris-HCl pH=6,8) adtunk, majd 5 percig 100°C-on denaturáltuk őket. Ezt követően 4-20%-os gradiens nátrium-dodecil-szulfát (SDS)-poliakrilamid gél (Mini-Protean TGX, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) zsebeibe 20 µg összfehérjének megfelelő mintamennyiségeket, illetve molekulasúly markert (Precision Plus Protein™ Dual Color, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) vittünk fel. Az elektroforézist (PowerPac Basic Power Supply, Bio-Rad Laboratories) 200 V feszültség mellett végeztük 25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1% SDS tartalmú futtató pufferben. Ezt követően a szeparált fehérjéket az SDS-poliakrilamid gélről 0,2 µM pórusméretű nitrocellulóz membránra (Trans-Blot Turbo Transfer Pack, Bio-Rad Laboratories) blottoltuk (Trans-Blot Turbo Transfer system, Bio-Rad Laboratories). A fehérjetranszfer sikerességét 1% Ponceau (Sigma Chemical Co., MO, USA) és 25% ecetsav (Reanal, Budapest, Magyarország) tartalmú festékkel ellenőriztük. A blotmembránok aspecifikus kötőhelyeinek gátlására a membránokat szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül, óvatos rázatás mellett blokkoló oldatban (5% zsírmentes tejpor TBS pufferben) inkubáltuk. Blokkolást követően a membránokat az elsődleges humán IL-24 (ab182567; Abcam), α-SMA, fibronectin (FN) (ab2413; Abcam), illetve gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) (sc-47724; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) specifikus ellenanyagokkal jelöltük 4°C-on 24 órán keresztül. A jelöléshez az IL-24 antitest 1:1000-es, α-SMA antitest 1:10000-es, a FN és GAPDH antitestek 1:2000-es hígítását alkalmaztuk, melyeket mosó oldattal készítettünk el (1% zsírmentes tejpor, 0,05% Tween™ 20 detergens, TBS puffer). A mosási lépéseket követően mosóoldatban 1:2000-re hígított tormaperoxidáz-konjugált másodlagos antitesttel (Santa Cruz Biotechnology) 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten inkubáltuk a membránokat. Az immunoreaktív helyek kemilumineszcens szignálját ECL (enhanced chemiluminescence) reagens

(Western Blotting Luminol Reagent, GE Healthcare, Waukesha, WI) hozzáadásával detektáltuk VersaDoc 5000MP képalkotó rendszer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) segítségével. Eredményeinket a Quantity One szoftverrel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) denzitometráltuk és értékeltük. A vizsgált fehérjék relatív mennyiségét a GAPDH belső kontroll hányadosaként, a kontroll szövetben kapott értékre normalizálva adtuk meg.

### **3.3.5 *Enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat (ELISA)***

Az FHs74Int sejtek, pdMF-ek, és PBMC-k IL-24 fehérjetermelésének mérése a *Sejtkultúrák és kezelések* fejezet vonatkozó bekezdésében ismertetett kezeléseket követően 24 órával vett felülészó mintákból történt. A mérést Human DuoSet ELISA Kit (R&D Systems) segítségével végeztük a gyártó protokollja szerint. Speciális felületű, 96 lyukú lemez lyukaiba az IL-24-et felismerő antitestet adagoltunk, amely a 24 órás, sötétben, szobahőmérsékleten való inkubálás alatt a lemez aljához kötődött. Mosást követően a lyukak felületének antitesttel nem borított részeit 1%-os BSA oldattal blokkoltuk. Ezt követően a lyukakba bemértük a kalibrációs sor elemeit, illetve a sejtfelülészó mintákat, és a lemezt szobahőmérsékleten, 2 órán keresztül óvatosan ráztuk. Az inkubációs idő letelte után a standardokat és a mintákat eltávolítottuk, és mosási lépések beiktatásával a lemezt 2 órán keresztül szobahőmérsékleten biotinnal kapcsolt detektáló antitesttel, majd 20 percen át sötétben, szobahőmérsékleten sztreptavidin-torma-peroxidáz oldattal inkubáltuk. Végül minden lyukba tetrametilbenzidin és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tartalmú szubsztrát oldatot adagoltunk. A színreakciót 20 perc elteltével 2N kénsav hozzáadásával állítottuk le. Az egyes lyukak abszorbanciáját 450 nm-en, Hidex Chameleon Microplate Reader (Triathler, Plate Chameleon, 300SL Lablogic Systems, Inc. Brandon, FL, USA) segítségével, MikroWin szoftverrel mértük. A háttér fényelnyelését 570 nm-en határoztuk meg.

### **3.3.6 *MTT sejtproliferációs és viabilitás teszt***

Az FHs74Int sejtek és pdMF-ek proliferációjának és életképességének mérése a *Sejtkultúrák és kezelések* című fejezet vonatkozó bekezdésében ismertetett kezeléseket követően 24 órával történt. A sejtek médiumához (100 µl/lyuk) 1/10 térfogatnyi (10 µl), steril vízben oldott, 5 mg/ml töménységű Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Sigma-

Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) festékoldatot hozzáadva a sejteket további 4 órán át termosztátban inkubáltuk. Ezután eltávolítottuk a médiumot a sejtekről, és a bennük felhalmozódott, a metabolikus aktivitásukkal arányos mennyiségű festéket 100 µl DMSO-etanol 1:1 arányú elegyével eluáltuk. 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.

### **3.3.7 LDH citotoxicitás teszt**

Az FHs74Int sejteket és pdMF-eket a *Sejtkultúrák és kezelések* fejezet vonatkozó bekezdésében leírtak szerint kezeltük és a citotoxikus hatást 24 óra elteltével vizsgáltuk. A sejtek felülúszójához 96 lyukú lemezen azonos térfogatú (40-40 µl) LDH reagenst (109 mM tejsav, 3,3 mM B-nikotinamid-adenin-dinukleotid-hidrát, 2,2 U/ml diaforáz, 3 mM Tris, 30 mM HEPES, 10 mM NaCl, 350 µM Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid; minden reagenst a Sigma Aldrich-től szeretünk be) adagoltunk, és a lemezeket 1 órán át termosztátban inkubáltuk. A citotoxicitás mértékével arányos abszorbanciát, valamint a háttér fényelnyelését az *MTT sejtproliferációs és viabilitás teszt* bekezdésben leírtakkal azonos módon határoztuk meg.

### **3.3.8 Áramlási citometriás Annexin V apoptózis teszt**

Az FHs74Int sejteket a *Sejtkultúrák és kezelések* fejezet vonatkozó bekezdésében leírtak szerint kezeltük és az apoptózis mértékét 24 óra elteltével vizsgáltuk FITC Annexin V apoptózis detektáló Kit I segítségével (BD Pharmingen) a gyártó protokollja szerint. A sejteket PBS-es mosást követően 1X Binding Buffer-ben szuszpendáltuk, majd FITC Annexin V és propídium-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.

### **3.3.9 Kollagén lerakódást kimutató Sirius Red teszt**

A pdMF-ek által termelt kollagén mennyiségének meghatározása Sirius Red teszttel történt. A *Sejtkultúrák és kezelések* fejezet vonatkozó bekezdésében leírtak szerinti 48 óras kezelést követően a sejtekről eltávolítottuk a médiumot, és PBS oldattal óvatosan mostuk. 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.

### **3.3.10 Miofibroblasztok stresszrost orientációjának, morfológiájának vizsgálata grafikus analízissel**

A *Sejtkultúrák és kezelések* fejezet vonatkozó bekezdésében ismertetett kezeléseket követően 24 órával a pdMF-ek  $\alpha$ -SMA pozitív stresszrostjait az *Immunitokémiai festés* fejezetben leírtak szerint festettük, majd a stresszrostok orientációját, illetve a sejtek alakját grafikus módszerrel vizsgáltuk. Kezelési csoportonként 35-40 véletlenszerűen kiválasztott sejtről Olympus IX81 fluoreszcens mikroszkóppal (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) 100x nagyítású olajimmerziós objektívet alkalmazva készítettünk képet. Annak érdekében, hogy az adott sejt teljes stresszrost-hálózatára jellemző információt kapjunk, minden sejtben legalább 20 stresszrostnak a sejt hosszanti tengelyével bezárt szögét határoztuk meg ImageJ 1.48v szoftver segítségével (The National Institutes of Health, Bethesda, MD) [180]. A sejtek stresszrostjainak párhuzamosságát a meghatározott dőlésszögek 95%-os konfidenciaintervallumával jellemeztük.

A sejtek alakját a körkörösségi indexük (circularity index) meghatározása révén jellemeztük. Az egyes sejtek területét és kerületét ImageJ szoftver segítségével kvantifikáltuk. A körkörösségi indexet az alábbi egyenlet alapján számoltuk ki.

$$\text{körkörösségi index} = 4 \times \pi \times \left( \frac{\text{terület}}{\text{kerület}^2} \right)$$

A kapott adatok 0 és 1 közötti értéket eredményeznek. A tökéletes kör körkörösségi indexe 1, egy vonalé 0.

### 3.4 Statisztika

Az adatsorok statisztikai értékelését GraphPad Prism 6.01 szoftverrel (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) végeztük. Az adatok normál eloszlását Kolmogorow Smirnov teszt segítségével vizsgáltuk. Mivel a valós idejű RT-PCR, Western-blot, valamint a pdMF-ek stresszrost orientációját vizsgáló méréseink esetében a normál eloszlás feltétele nem teljesült, adatsoraink további kiértékelése során Mann-Whitney U-tesztet (két csoport esetén), vagy Kruskal-Wallis tesztet (több csoport esetén) használtunk. Az MTT, LDH, Annexin V és Sirius Red tesztekől származó adatsorok összehasonlítását többszörös t-teszt, illetve két-szemponos varianciánálízis (ANOVA) segítségével végeztük el. Többcsoportos analízis esetén a páronkénti összehasonlításhoz Dunnett-féle post-hoc tesztet alkalmaztunk. A betegek biopsziáiban mért relatív génexpresszió és legfőbb klinikai paramétereik közti összefüggéseket Pearson-féle korrelációs analízissel vizsgáltuk. A Pearson-féle koefficiens értékek (r) értelmezését a 3. táblázatban foglaltuk össze. A statisztikailag szignifikáns eltéréseket a  $p < 0,05$  valószínűségi érték teljesülése esetén különböző szimbólumokkal jelöltük. A szemléltető grafikonokon átlag és szórás (SD) látható.

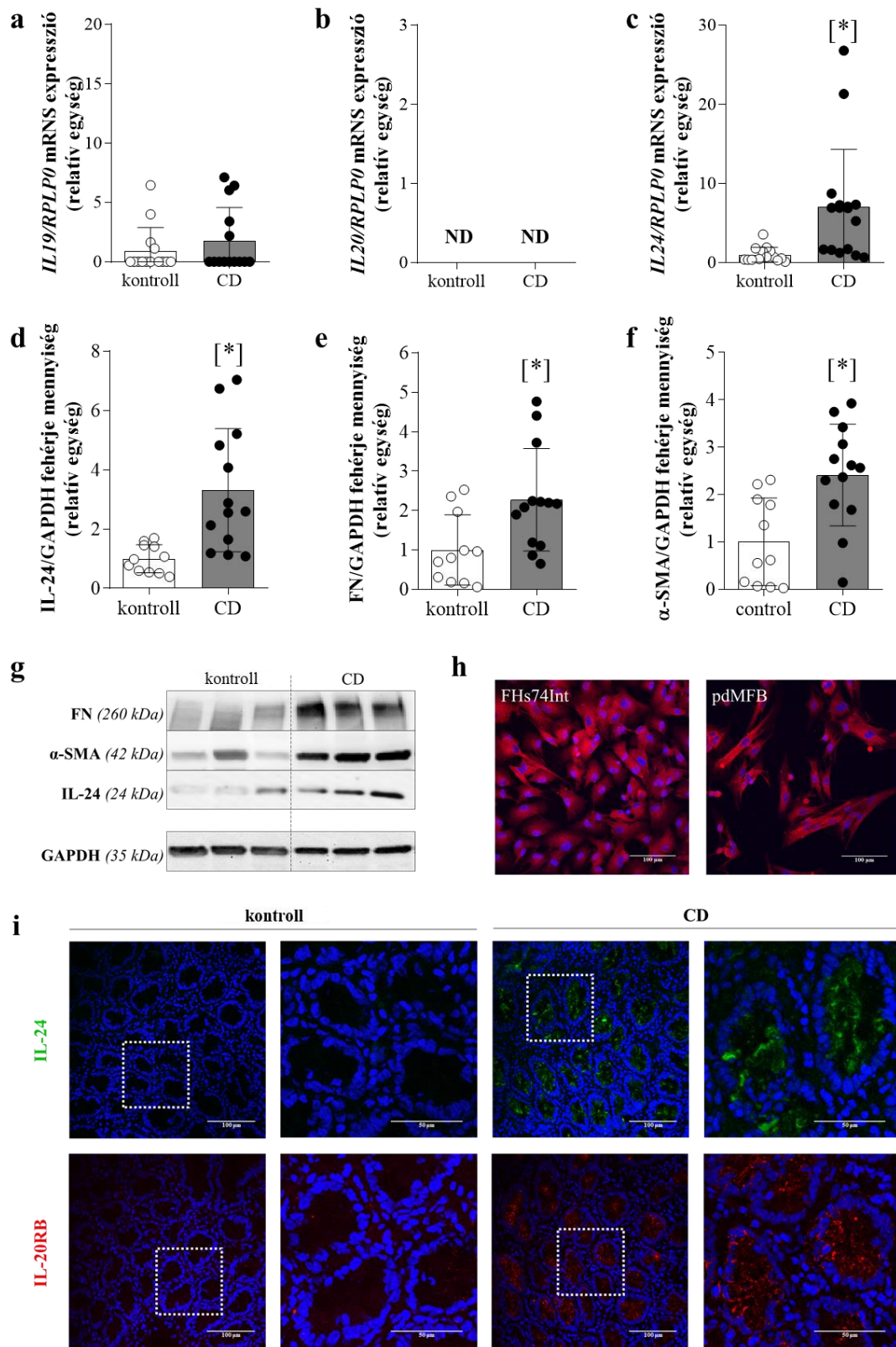
**3. táblázat.** Pearson-féle korrelációs koefficiens értékek ( $r$ ) értelmezése.

<b>Korrelációs koefficiens értékek</b>	<b>Összefüggés mértéke</b>
$0,9 \leq  r  \leq 1$	Nagyon szoros kapcsolat
$0,7 \leq  r  \leq 0,9$	Szoros kapcsolat
$0,5 \leq  r  \leq 0,7$	Közepes kapcsolat
$0,3 \leq  r  \leq 0,5$	Gyenge kapcsolat
$0 \leq  r  \leq 0,3$	Elhanyagolható kapcsolat

## 4 EREDMÉNYEK

### 4.1 Az IL-19, -20, -24, IL-20RB, $\alpha$ -SMA és FN mennyiségének vizsgálata cöliákiás és kontroll gyermekek duodenum nyálkahártyájában

Az IL-19, -20, -24 mRNS expresszióját valós idejű RT-PCR segítségével, az IL-24, FN és  $\alpha$ -SMA fehérjék mennyiségét Western-blot módszerrel határoztuk meg cöliákiás és kontroll gyermekek vékonybél biopsziáiban. Míg a cöliákiában szenvedő gyermekek mintáiban fokozott *IL24* mRNS expressziót detektáltunk a kontroll mintákhoz képest (3. ábra/c), az *IL19* mRNS mennyiségében nem találtunk különbséget a vizsgált csoportok között (3. ábra/a), az *IL20* mRNS jelenlétét pedig egyik csoportban sem tudtuk kimutatni (3. ábra/b). A bélszövetben mért IL-24 mRNS expresszió nagysága nem mutatott korrelációt a betegek klinikai paramétereivel (4. ábra). A beteg populáció szövetmintáit a kontrollokéval összehasonlítva a betegekben magasabb IL-24, FN és  $\alpha$ -SMA fehérjemennyiséget (3. ábra/d-g), illetve főként a kripták epitél sejtjeiben fokozott IL-24 és IL-20RB immunpozitivitást detektáltunk (3. ábra/i).

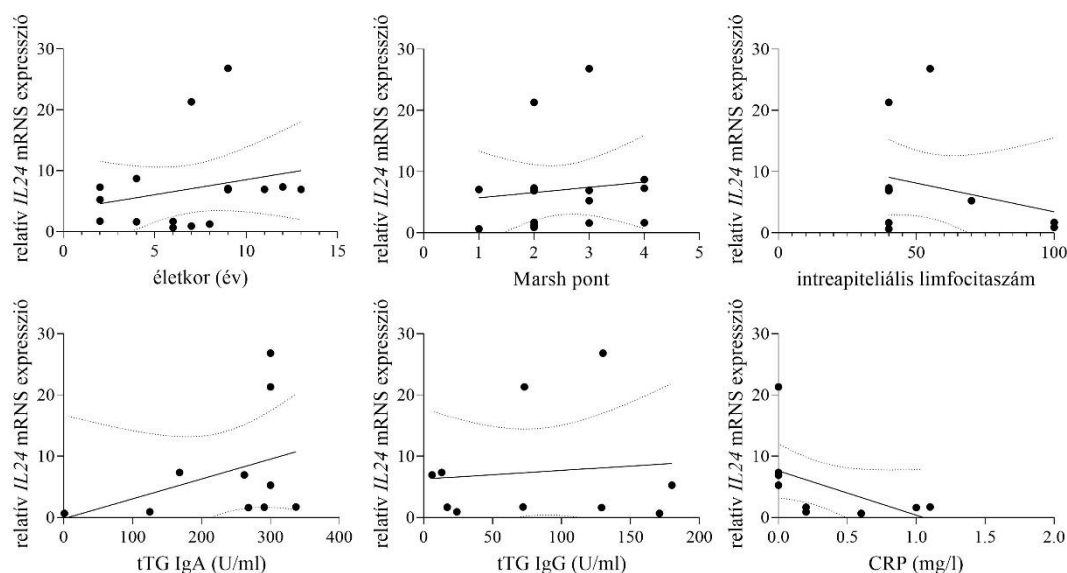


3. ábra. Az IL-19, IL-20, IL-24, IL-20RB,  $\alpha$ -SMA és FN expressziója cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában. Kontroll (n=14) és cöliákiás (CD, n=14)



gyermek duodenum biopsziáinak *IL19* (a), *IL20* (b) és *IL24* (c) mRNS expresszióját valós idejű RT-PCR-rel, az *RPLP0* expresszió hányadosaként határoztuk meg. Kontroll (n=11) és cöliákiás (n=13) gyermek duodenum biopsziáinak IL-24 (d, g), FN (e, g) és  $\alpha$ -SMA (f, g) fehérjemennyiségét Western-blot módszerrel, a GAPDH (g) mennyiségének hányadosaként határoztuk meg. A diagramokon az átlag  $\pm$  SD adatokat tüntettük fel. \* $p < 0,05$  vs. kontroll (Mann-Whitney U-teszt). Az IL-20RB (piros) jelenlétét FHS74Int és pdMF sejteken (h), illetve az IL-24 (zöld) és IL-20RB (piros) lokalizációját kontroll és cöliákiás gyermekekből származó duodenum biopsziás mintákon (i) immunfluoreszcens festéssel határoztuk meg. A sejtmagokat Hoechst 33342 (kék) festékkel tettük láthatóvá. A kinagyított metszeti régiókat fehér négyzettel jelöltük. Skála: 100  $\mu$ m és 50  $\mu$ m.

	életkor	Marsh pont	IEL	tTg IgA	tTg IgG	CRP
<i>r</i>	0,237	0,114	-0,270	0,370	0,105	-0,517
<i>p</i>	0,376	0,675	0,394	0,292	0,777	0,104



**4. ábra.** A cöliákiás betegek bélsvövetében mért *IL24* expressziója és a főbb klinikai paraméterek között végzett korrelációs vizsgálat eredménye. A cöliákiás betegek duodenális biopsziájában valós idejű RT-PCR segítségével meghatározott relatív *IL24* mRNS expresszió mértékét a betegek életkorával, a szövettani vizsgálat során

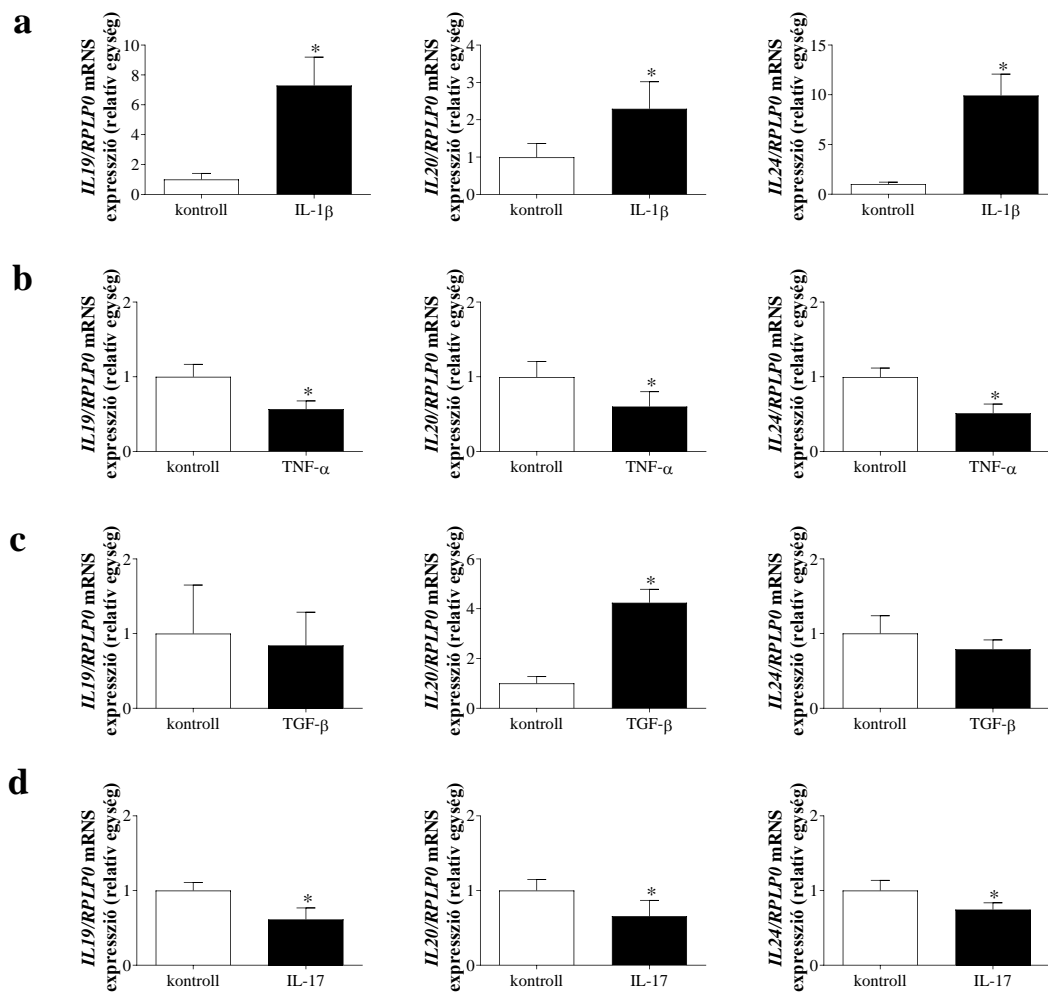
meghatározott Marsh pontszámmal, intraepiteliális limfocitaszámmal (IEL), a szérumban mért szöveti transzglutamináz ellenes (tTG) IgA és IgG mennyiséggel, illetve C-reaktív protein (CRP) szinttel hasonlítottuk össze. A paraméterek közti összefüggést Pearson-féle korrelációs analízissel vizsgáltuk.  $r$ : Pearson-féle korrelációs együttható

## **4.2 Az IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ és IL-17 kezelések hatása az IL-19, -20, -24, valamint az IL-20RA, IL-20RB és IL-22RA receptor alegységek expressziójára**

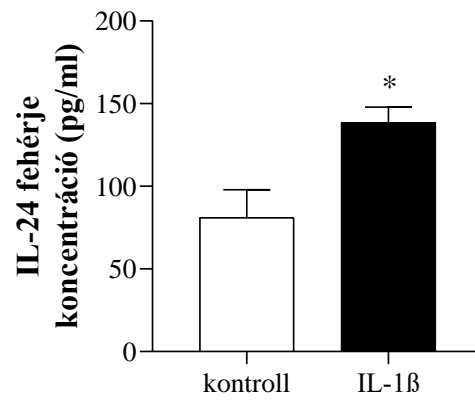
### **4.2.1 FHs74Int vékonybél epitel sejtek**

Az IL-20 citokin alcsalád tagjainak (5. ábra), illetve receptor alegységeinek (7. ábra) mRNA expresszióját valós idejű RT-PCR segítségével vizsgáltuk különböző, a cöliákiához köthető faktorokkal történő kezeléseket követően. Az IL-24-et mRNA szinten upreguláló citokinek hatásának fehérje szintű vizsgálatához ELISA módszert alkalmaztunk.

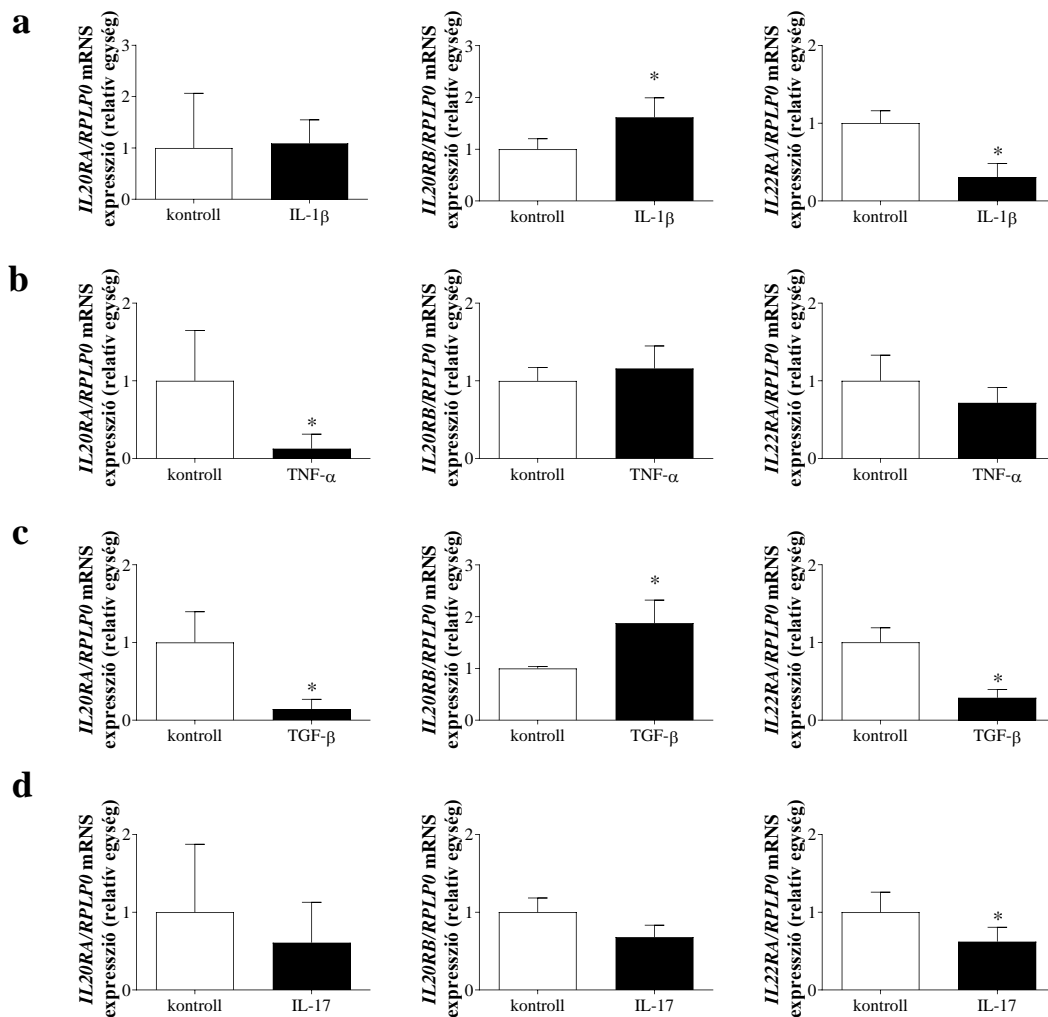
Míg az IL-1 $\beta$  kezelés (5. ábra/a) fokozta, addig a TNF- $\alpha$  (5. ábra/b) és az IL-17 kezelés (5. ábra/d) csökkentette az FHs74Int sejtek *IL19*, *IL20* és *IL24* mRNA expresszióját. A TGF- $\beta$  kezelés fokozta az *IL20* expresszióját (5. ábra/c). Összhangban az RT-PCR eredményekkel, az IL-1 $\beta$  kezelés fokozta az IL-24 fehérje mennyiségét a sejtek felülúszójában (6. ábra). A kezeléseknél a receptor alegységek mRNA expressziójára kifejtett hatása jóval heterogénebbnek bizonyult. Az IL-1 $\beta$  fokozta az *IL20RB*, és csökkentette az *IL22RA* expresszióját (7. ábra/a), a TNF- $\alpha$  kezelés pedig csökkentette az *IL20RA* mRNA expressziót (7. ábra/b). A TGF- $\beta$  csökkentette az *IL20RA* és *IL22RA* expresszióját, viszont fokozta az *IL20RB* mRNA mennyiségét (7. ábra/c). Az IL-17 kezelés csak az *IL22RA* mRNA expresszióját csökkentette (7. ábra/d).



**5. ábra.** Az IL-1β (a), TNF-α (b), TGF-β (c) és IL-17 (d) kezelések hatása az FHs74Int sejtek *IL19*, *IL20* és *IL24* mRNA expressziójára. A sejtek *IL19*, *IL20* és *IL24* mRNA expresszióját a különböző kezeléseket követően valós idejű RT-PCR-rel, az *RPLP0* expresszió hányadosaként határoztuk meg. A diagramokon átlag + SD adatokat tüntettünk fel (n=6). \*p<0,05 vs. kontroll (Mann-Whitney U-teszt).



**6. ábra.** Az IL-1 $\beta$  kezelés hatása az FHs74Int sejtek IL-24 termelésére. Az IL-24 fehérje mennyiségét a sejtek felülcszójában ELISA módszerrel határoztuk meg. A diagramokon átlag + SD adatokat tüntettünk fel (n=6). \*p<0,05 vs. kontroll (Mann-Whitney U-teszt).

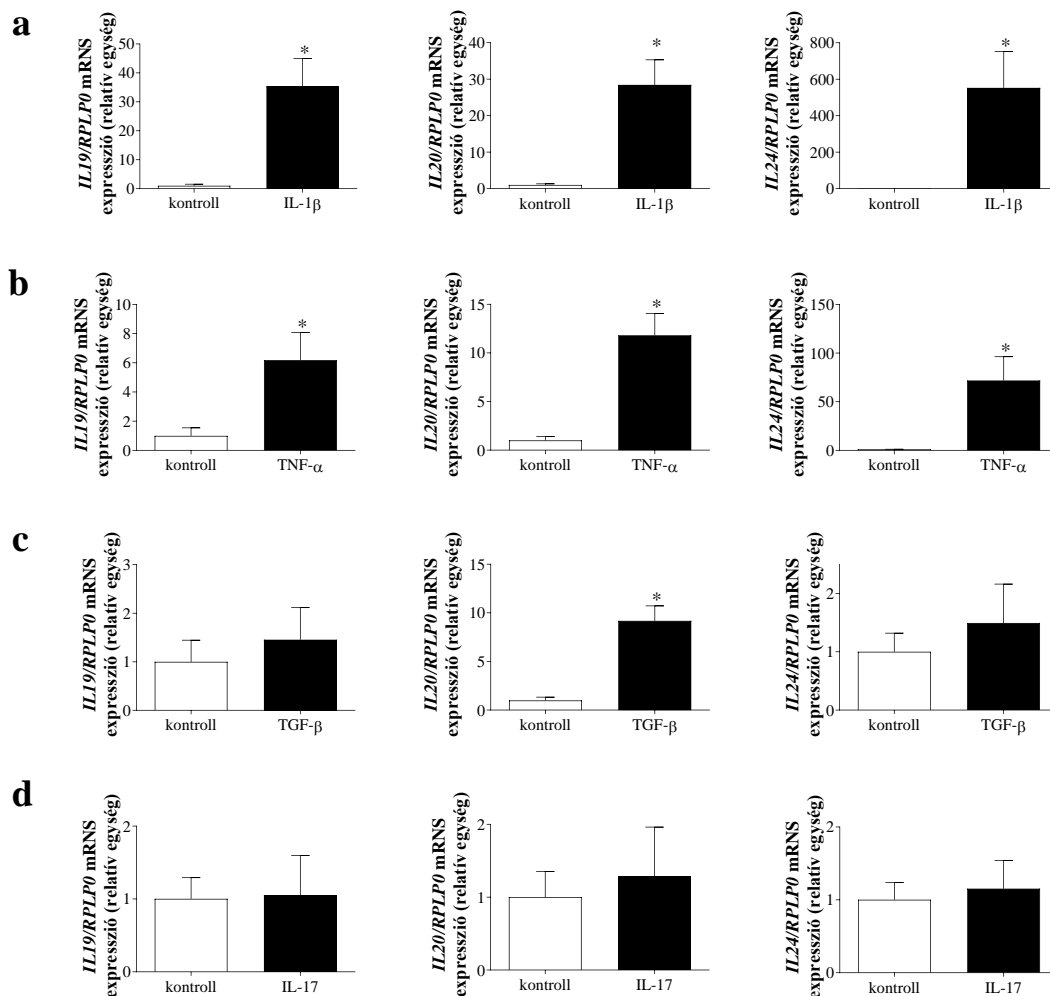


**7. ábra.** Az IL-1 $\beta$  (a), TNF- $\alpha$  (b), TGF- $\beta$  (c) és IL-17 (d) kezelések hatása az FHs74Int sejtek *IL20RA*, *IL20RB* és *IL22RA* mRNS expressziójára. A sejtek *IL20RA*, *IL20RB* és *IL22RA* mRNS expresszióját a különböző kezeléseket követően valós idejű RT-PCR-rel, az *RPLP0* expresszió hányadosaként határoztuk meg. A diagramokon átlag + SD adatokat tüntettünk fel (n=6). \*p<0,05 vs. kontroll (Mann-Whitney U-teszt).

#### 4.2.2 Primer duodenális miofibroblasztok

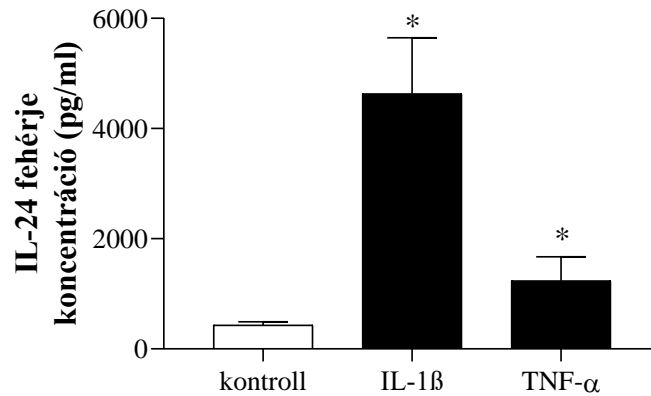
Az IL-20 citokin alcsalád tagjainak (8. ábra), illetve receptor alegységeinek (10. ábra) mRNS expresszióját valós idejű RT-PCR segítségével vizsgáltuk különböző, cöliákiához köthető faktorokkal történő kezeléseket követően. Az IL-24-et mRNS szinten upreguláló citokinek hatásának fehérje szintű vizsgálatához ELISA módszert alkalmaztunk.

Az IL-1 $\beta$  és a TNF- $\alpha$  kezelés (8. ábra/a, b) fokozta az *IL19*, *IL20* és *IL24* mRNS expresszióját. TGF- $\beta$  kezelést követően fokozott *IL20* expressziót detektáltunk. Az IL-17 kezelés egyik citokin expresszióját sem befolyásolta. Összhangban az mRNS szintű eredményekkel, az IL-1 $\beta$  és a TNF- $\alpha$  kezelés fokozta az IL-24 fehérje mennyiségét a sejtek felülészójában (9. ábra). A receptor alegységekre kifejtett hatásokat vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy míg az IL-1 $\beta$  (10. ábra/a), TNF- $\alpha$  (10. ábra/b) és TGF- $\beta$  (10. ábra/c) kezeléseket követően csökkent, vagy nem változott az *IL20RA* és *IL22RA* mRNS expressziója, addig mindhárom kezelés fokozta az *IL20RB* mennyiségét. Az IL-17 kezelés fokozta a pdMF sejtek *IL22RA* expresszióját (10. ábra/d).

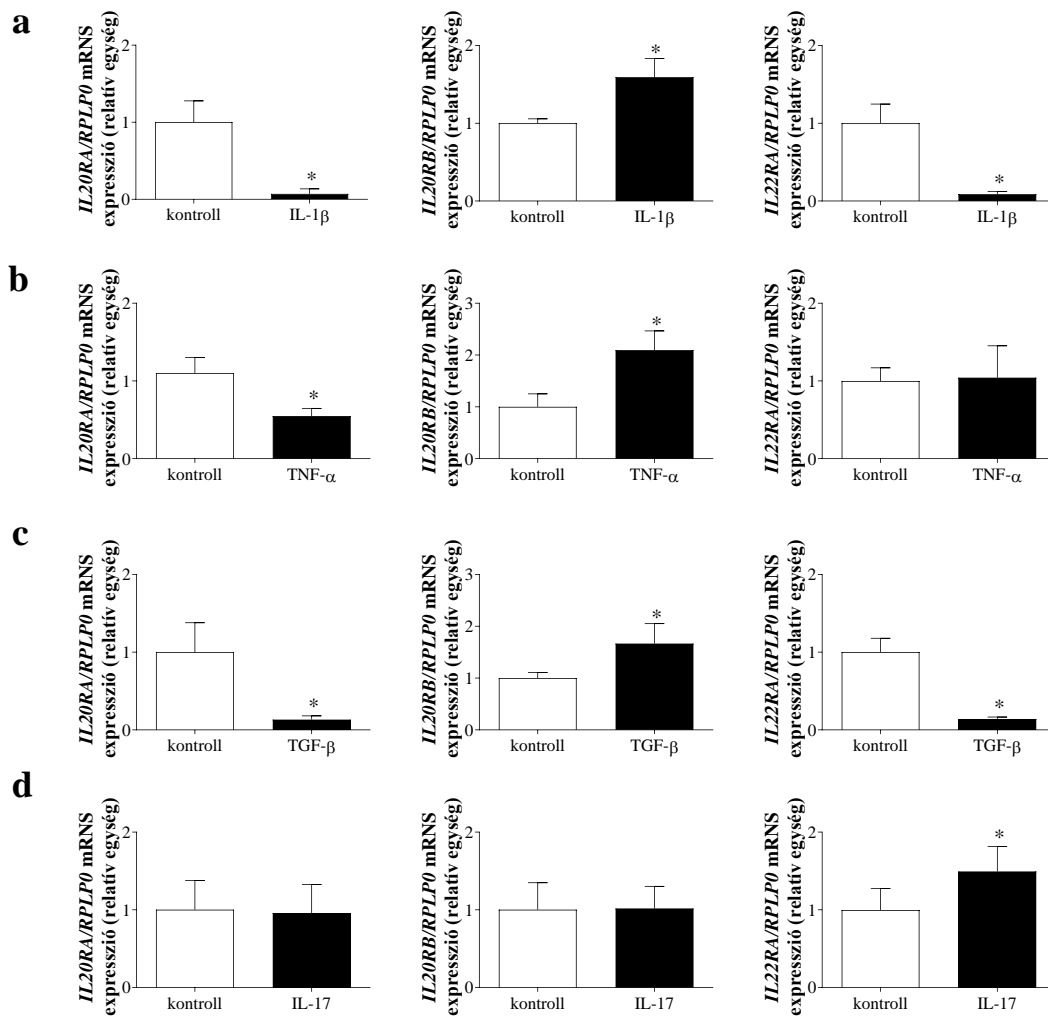


**8. ábra.** Az IL-1 $\beta$  (a), TNF- $\alpha$  (b), TGF- $\beta$  (c) és IL-17 (d) kezelések hatása a pdMF sejtek *IL19*, *IL20* és *IL24* mRNS expressziójára. A sejtek *IL19*, *IL20* és *IL24* mRNS expresszióját a különböző kezeléseket követően valós idejű RT-PCR-rel, az *RPLP0*

expresszió hányadosaként határoztuk meg. A diagramokon átlag + SD adatokat tüntettünk fel (n=6). \*p<0,05 vs. kontroll (Mann-Whitney U-teszt).



**9. ábra.** Az IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$  kezelés hatása a pdMF-ek IL-24 termelésére. Az IL-24 fehérje mennyiségét a sejtek felülűszójában ELISA módszerrel határoztuk meg. A diagramokon átlag + SD adatokat tüntettünk fel (n=6). \*p<0,05 vs. kontroll (Mann-Whitney U-teszt).



**10. ábra.** Az IL-1 $\beta$  (a), TNF- $\alpha$  (b), TGF- $\beta$  (c) és IL-17 (d) kezelések hatása a pdMF sejtek *IL20RA*, *IL20RB* és *IL22RA* mRNS expressziójára. A sejtek *IL20RA*, *IL20RB* és *IL22RA* mRNS expresszióját a különböző kezeléseket követően valós idejű RT-PCR-rel, az *RPLP0* expresszió hányadosaként határoztuk meg. A diagramokon átlag + SD adatokat tüntettünk fel (n=6). \*p<0,05 vs. kontroll (Mann-Whitney U-teszt).

#### 4.2.3 Perifériás vérből izolált mononukleáris sejtek

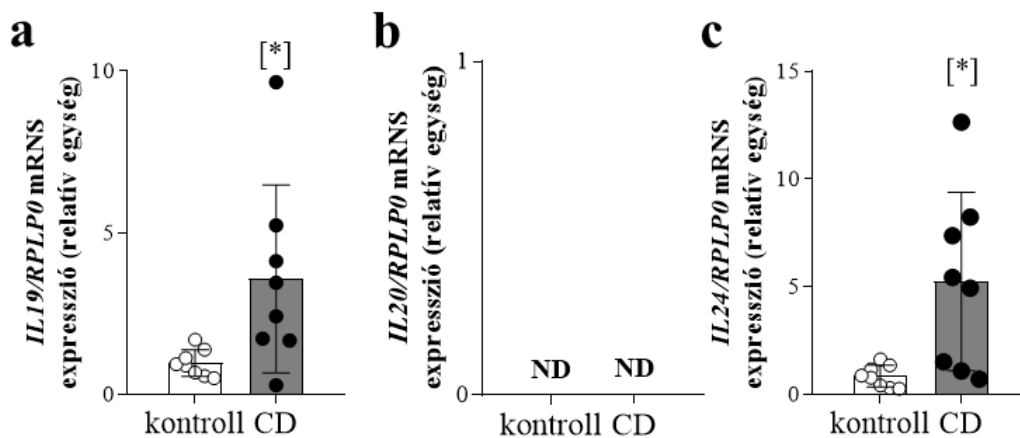
Az *IL-19*, *-20* és *-24* mRNS expresszióját valós idejű RT-PCR segítségével hasonlítottuk össze kontroll és GFD-t tartó cöliákiás gyerekek PBMC-iben (11. ábra), valamint a diétát tartó betegekből származó PBMC-kben cöliákiához köthető faktorokkal történő



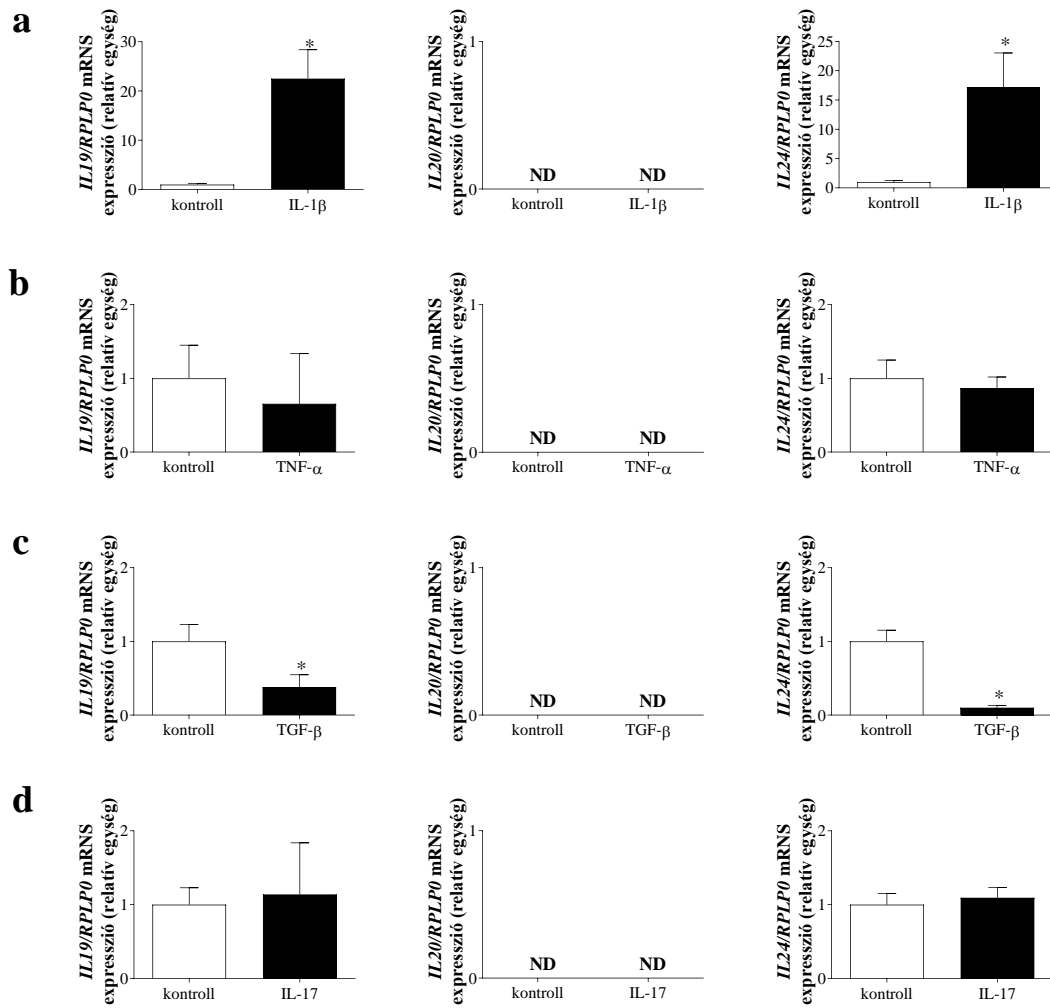
kezeléseket követően. Az IL-24-et mRNS szinten upreguláló citokinek hatásának fehérje szintű vizsgálatához ELISA módszert alkalmaztunk.

Vizsgálataink során a cöliákiás betegekből származó PBMC-k fokozott *IL19* (11. ábra/a) és *IL24* (11. ábra) mRNS expresszióját tapasztaltuk a kontroll csoporthoz képest. *IL20* mRNS expressziót egyik populáció mintáiban sem tudtunk kimutatni (11. ábra/b).

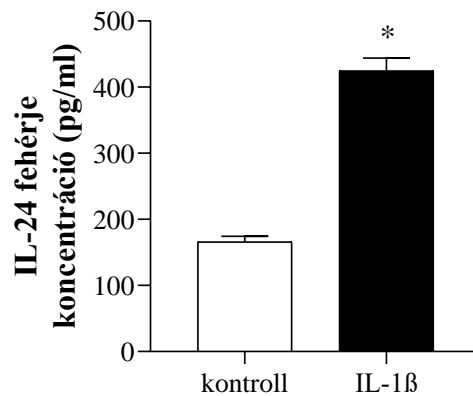
A beteg gyermekekből származó PBMC-k esetében az IL-1 $\beta$  kezelés fokozta (12. ábra/a), a TGF- $\beta$  kezelés pedig csökkentette (12. ábra/c) az *IL19* és *IL24* mRNS expresszióját. *IL20* mRNS expressziót egyik kezelést követően sem tudtunk kimutatni (12. ábra/a-d). Az IL-1 $\beta$  kezelés fokozta az IL-24 fehérje mennyiségét a sejtek felülcszójában (13. ábra).



**11. ábra. Az *IL19*, *IL20* és *IL24* mRNS expressziója kontroll, valamint GFD-t tartó cöliákiás gyermekek (CD) PBMC sejtjeiben.** A sejtek *IL19*, *IL20* és *IL24* mRNS expresszióját valós idejű RT-PCR-rel, az *RPLP0* expresszió hányadosaként határoztuk meg. A diagramokon átlag  $\pm$  SD adatokat tüntettünk fel (n=8). ND: nem detektálható. \*p<0,05 vs. kontroll (Mann-Whitney U-teszt).



**12. ábra.** Az IL-1 $\beta$  (a), TNF- $\alpha$  (b), TGF- $\beta$  (c) és IL-17 (d) kezelések hatása a GFD-t tartó cöliákiai gyermekekből származó PBMC-k *IL19*, *IL20* és *IL24* mRNS expressziójára. A sejtek *IL19*, *IL20* és *IL24* mRNS expresszióját a különböző kezeléseket követően valós idejű RT-PCR-rel, az *RPLP0* expresszió hányadosaként határoztuk meg. A diagramokon átlag + SD adatokat tüntettünk fel (n=6). ND: nem detektálható \*p<0,05 vs. kontroll (Mann-Whitney U-teszt).



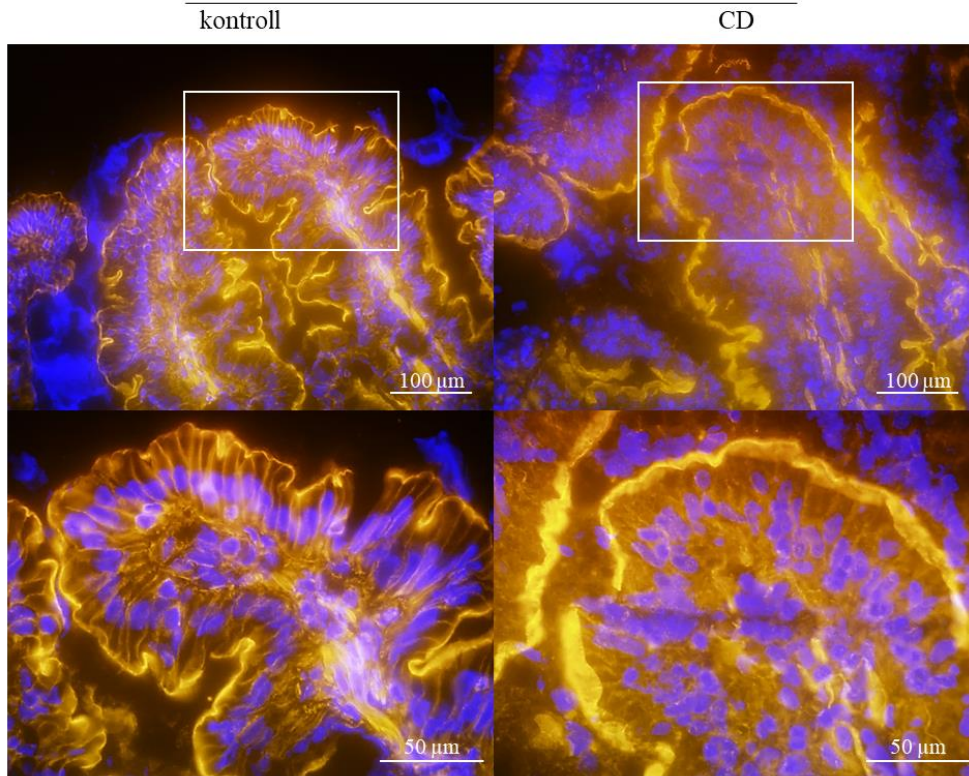
**13. ábra.** Az IL-1 $\beta$  kezelés hatása cöliákiás gyermekből származó PBMC-k IL-24 termelésére. Az IL-24 fehérje mennyiségét a sejtek felülúszójában ELISA módszerrel határoztuk meg. A diagramokon átlag + SD adatokat tüntettünk fel (n=6). \*p<0,05 vs. kontroll (Mann-Whitney U-teszt).

#### 4.3 Az oxidatív stressz hatása a vékonybél epitél sejtjeire

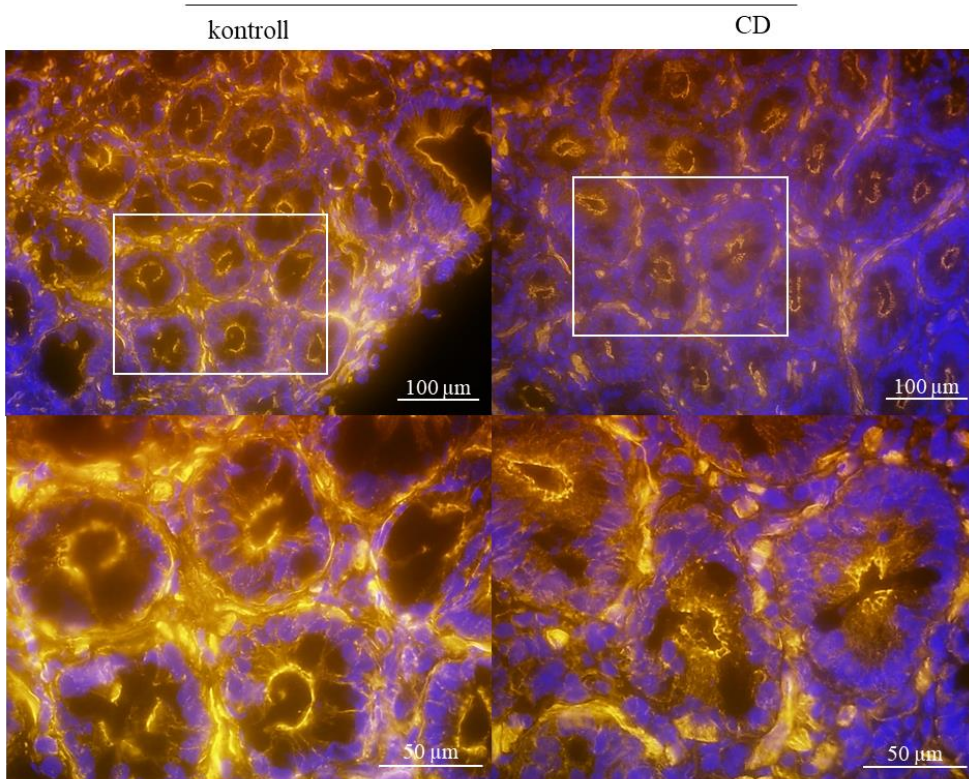
A bélnyálkahártya epitél sejtjeinek vázrendszerét a filamentáris aktinhoz kötődő falloidinnel jelöltük, majd fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizualizáltuk.

Az egészséges bélnyálkahártya esetében az epitél sejtek erőteljes, apikális, bazális, illetve laterális festődését tapasztaltuk mind a bélbolyhok, mind a kripták enterocitáinak körvonalának megfelelően. A cöliákiás betegekből származó mintákat vizsgálva azonban az epitél sejtek kontrasztos festődése helyett szemcsés jelet figyeltünk meg a sejtek citoplazmájában, a laterális fluoreszcens szignál szinte teljesen eltűnt (14. ábra).

bélbolyhok



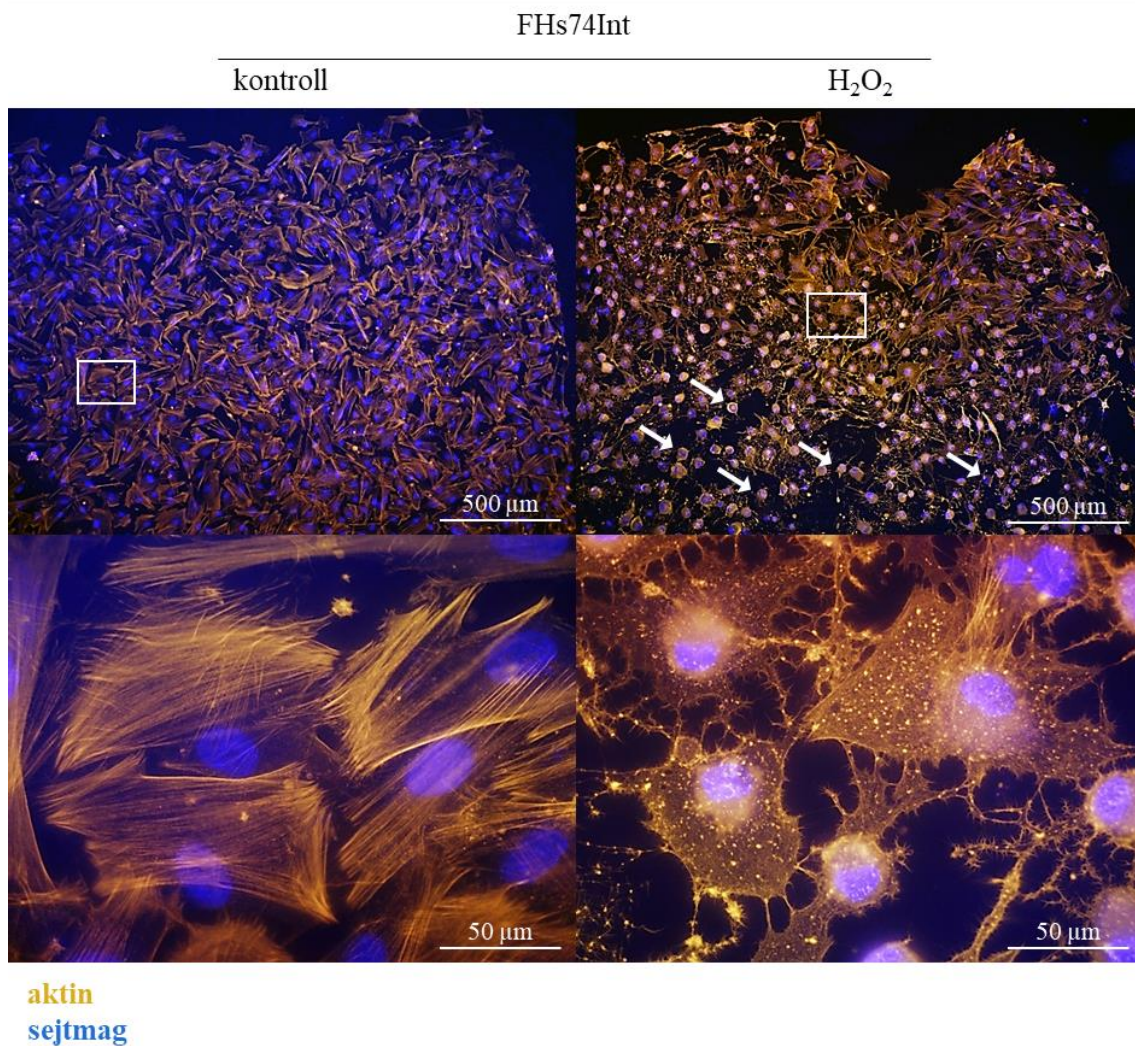
Lieberkühn-kripták



aktin  
sejtmag

**14. ábra. Duodenális epitél sejtek sejtvázkárosodása cöliákiás betegből (CD) származó biopsziás mintában.** Az aktin sejtváza állapotát falloidin festést követően (narancs), fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizualizáltuk kontroll és cöliákiás gyermekekből származó vékonybél biopsziamintákon. A sejtmagokat Hoechst 33342 (kék) festéssel tettük láthatóvá. A kinagyított metszeti régiókat fehér négyzettel jelöltük. Skála: 100  $\mu\text{m}$  és 50  $\mu\text{m}$ .

Hasonló változást figyeltünk meg az FHS74Int duodenális epitél sejtek oxidatív károsodását vizsgálva (15. ábra). A kezeletlen sejtek sejtváza ép, amit az aktin rostszerű hálózata jelez. Ezzel szemben  $\text{H}_2\text{O}_2$  kezelés hatására az addig filamentáris aktin pontszerű aggregátumokat képez, valamint jól megfigyelhető az oxidatív stressz indukálta citotoxicitás is, amelyre az ábrán fehér nyilakkal jelölt, elhalt sejtek maradványai utalnak.

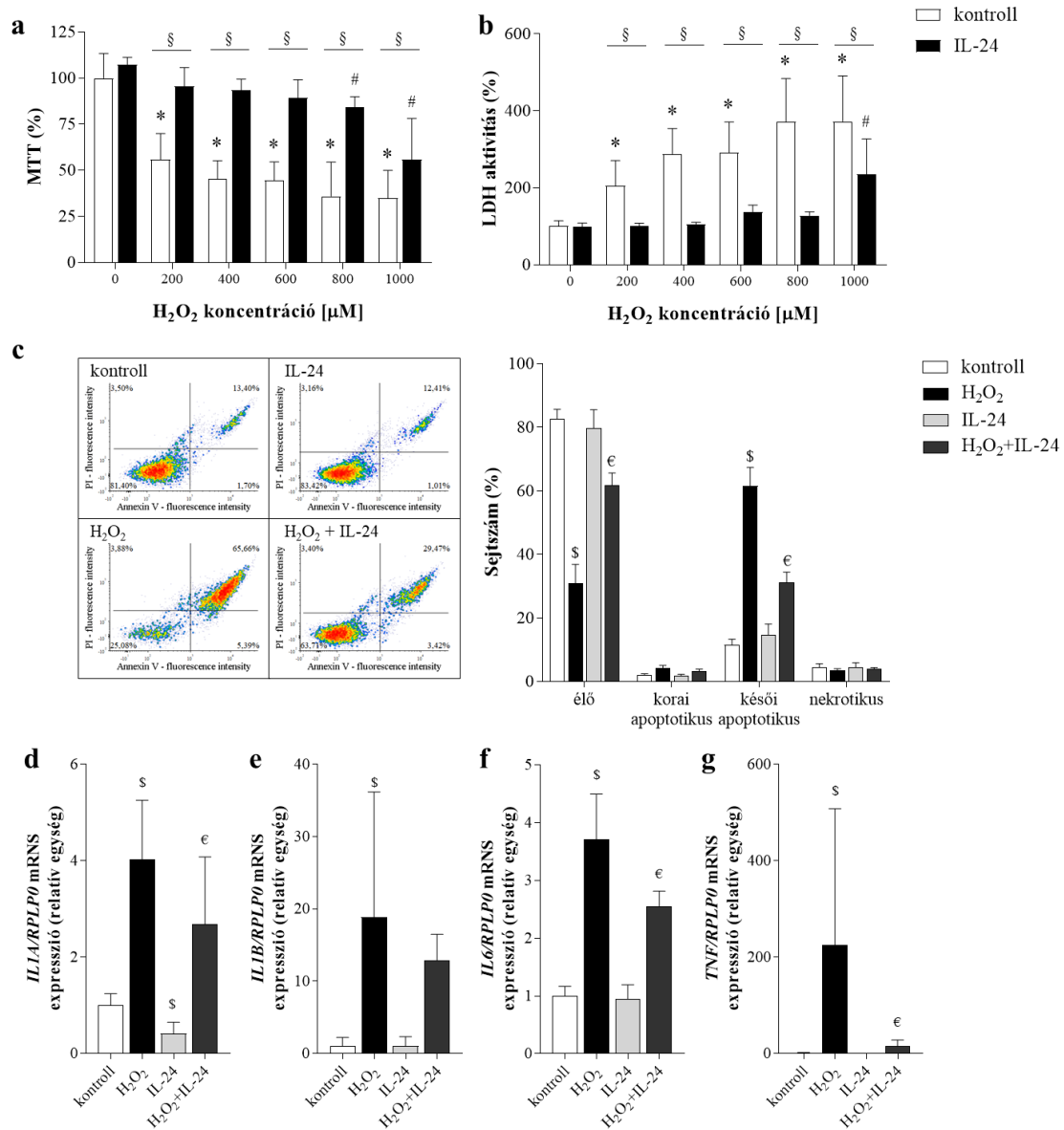


**15. ábra. FHs74Int duodenális epítél sejtek sejtvázkárosodása oxidatív stressz hatására.** Az aktin sejtváz állapotát falloidin festést követően (narancs), fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizualizáltuk FHs74Int sejteken 1000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelést követően. A sejtmagokat Hoechst 33342 (kék) festékkel tettük láthatóvá. A fehér nyilak elhalt sejtek maradványaira mutatnak. A kinagyított metszeti régiókat fehér négyzettel jelöltük. Skála: 500 µm és 50 µm.

#### 4.4 Az IL-24 kezelés hatása a vékonybél epítél sejtekre

Az IL-24 epítél sejtekre kifejtett hatásának vizsgálata előtt igazoltuk, hogy a modellként alkalmazott FHs74Int duodenális epítél sejteken megtalálható a citokin két heterodimer receptorának közös, IL-20RB alegysége (3. ábra/h). Ezt követően az IL-24-nek az epítél

sejtek oxidatív károsodására gyakorolt hatását  $H_2O_2$ -dal kezelt sejteken vizsgáltuk (16. ábra). Ahogy az MTT (16. ábra/a), LDH (16. ábra/b), valamint Annexin V apoptózis (16. ábra/c) mérések eredményei mutatták, a  $H_2O_2$  nagyfokú sejtelhalást eredményezett, amelyet az IL-24 kezelés mérsékelte. Génexpressziós méréseink alapján az IL-24 csökkentette az oxidatív stressz által indukált *IL1A*, *IL6*, valamint *TNF* gyulladós citokinek mRNA expresszióját (16. ábra/d-g).



**16. ábra.** Az IL-24 kezelés hatása az FHs74Int sejtek életképességére  $H_2O_2$  kezelést követően. A sejtek túlélését a  $H_2O_2$ -dal való indukciót követően MTT viabilitás- (a), LDH citotoxicitás- (b) és Annexin V apoptózis tesztek (c) segítségével vizsgáltuk. Az

MTT és LDH tesztek eredményeit a kezeletlen csoport (0  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  kontroll) átlagértékéhez viszonyítva, az Annexin V apoptózis teszt eredményét pedig a teljes sejtpopulációhoz viszonyított százalékos értékeként ábrázoltuk. A sejtek *IL1A* (d), *IL1B* (e), *IL6* (f) és *TNF* (g) mRNS expresszióját valós idejű RT-PCR-rel, az *RPLP0* expresszió hányadosaként határoztuk meg. A diagramokon átlag + SD adatokat tüntettünk fel (a, b, d: n=5, c: n=9). \* $p < 0,05$  vs. 0  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  kontroll (két-szemponos ANOVA, Dunnett-féle post-hoc teszt); # $p < 0,05$  vs. *IL-24* + 0  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (két-szemponos ANOVA, Dunnett-féle post-hoc teszt); § $p < 0,05$  kontroll vs. *IL-24* az adott  $\text{H}_2\text{O}_2$  koncentráció mellett (többszörös t-teszt, Dunnett-féle post-hoc teszt); \$ $p < 0,05$  vs. kontroll (két-szemponos ANOVA Dunnett-féle post-hoc teszt); € $p < 0,05$  vs.  $\text{H}_2\text{O}_2$  (két-szemponos ANOVA, Dunnett-féle post-hoc teszt)

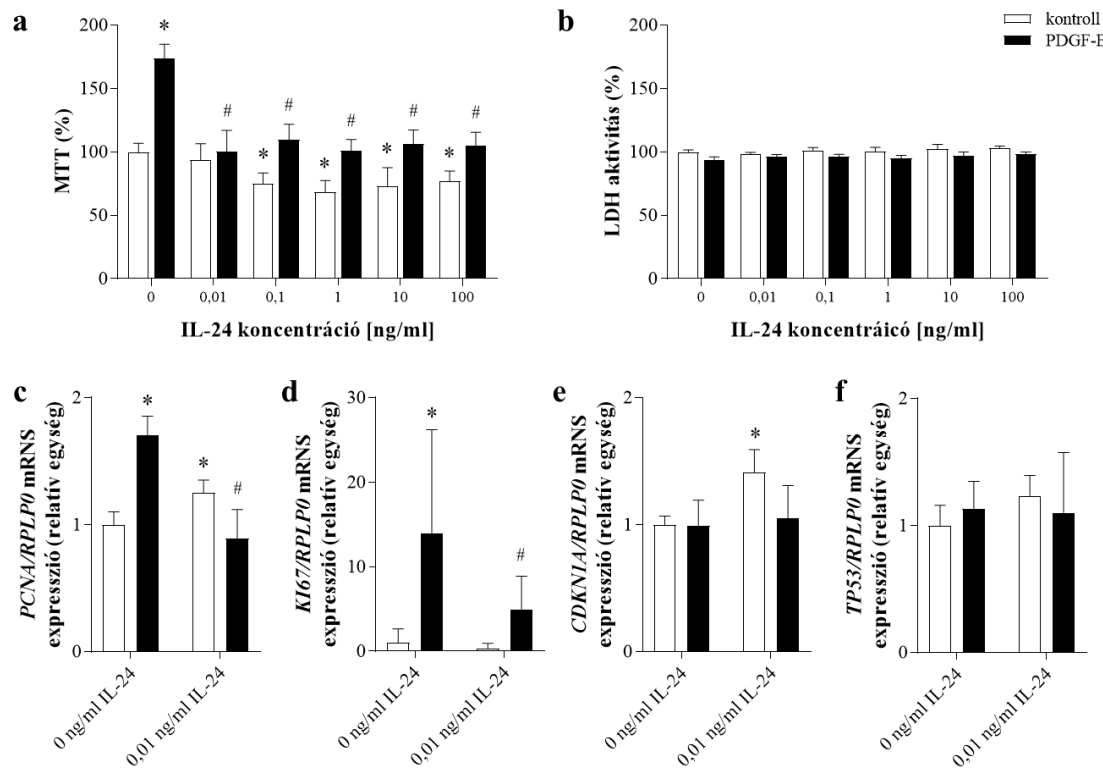
#### 4.5 Az IL-24 kezelés hatása a duodenális miofibroblasztokra

Az IL-24 duodenális miofibroblasztokra kifejtett hatásának vizsgálata előtt igazoltuk, hogy a modellként alkalmazott pdMF-eken megtalálható a citokin két heterodimer receptorának közös, IL-20RB alegysége (3. ábra/h).

##### 4.5.1 Az IL-24 kezelés hatása a duodenális miofibroblasztok proliferációjára

Az IL-24 citokin hatását a miofibroblasztok proliferációjára PDGF-B-vel kezelt pdMF-eken vizsgáltuk (17. ábra). Az MTT teszt (17. ábra/a) eredménye szerint az IL-24 mérsékelte az endogén, illetve a PDGF-B által kiváltott sejtproliferációt, az LDH teszt (17. ábra/b) alapján a sejtek életképességét viszont nem befolyásolta. Génexpressziós méréseink alapján az IL-24 csökkentette a PDGF-B kezelés által indukált *PCNA* és *KI67* proliferációs markerek mRNS expresszióját, de nem befolyásolta a *CDKN1A* és *TP53* apoptotikus markerek szintjét (17. ábra/c-f).



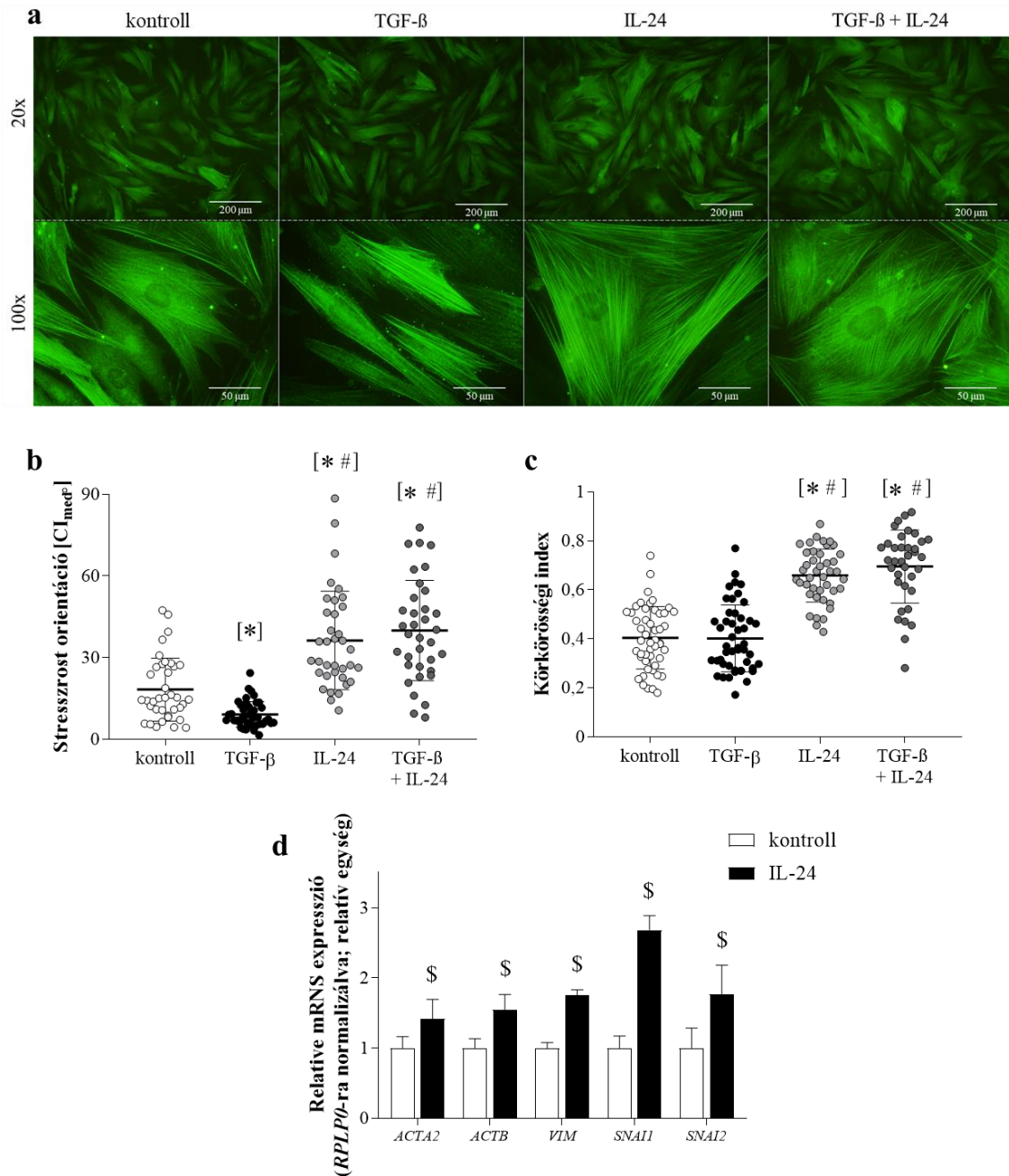


**17. ábra.** Az IL-24 kezelés hatása a pdMF sejtek proliferációjára PDGF-B kezelést követően. A sejtek proliferációját és a cytotoxicitás mértékét MTT (a) és LDH (b) tesztek segítségével vizsgáltuk. Az MTT és LDH tesztek eredményeit a kezeletlen csoport (0 ng/ml IL-24 kontroll) átlagértékéhez viszonyítva ábrázoltuk. A sejtek *PCNA* (c), *KI67* (d), *CDKN1A* (e), és *TP53* (f) mRNS expresszióját valós idejű RT-PCR-rel, az *RPLP0* expresszió hányadosaként határoztuk meg. A diagramokon átlag + SD adatokat tüntettünk fel (n=5). \*p<0,05 vs. 0 ng/mL IL-24 kontroll (két-szemponos ANOVA Dunnett-féle post-hoc teszt); #p<0,05 vs. PDGF-B + 0 ng/mL IL-24 (két-szemponos ANOVA, Dunnett-féle post-hoc teszt).

#### 4.5.2 Az IL-24 kezelés hatása a duodenális miofibroblasztok stresszrost hálózatára

Az IL-24 miofibroblasztok morfológiájára gyakorolt hatását TGF- $\beta$ -val kezelt pdMF-eken vizsgáltuk (18. ábra). Míg az  $\alpha$ -SMA immunfluoreszcens festés alapján a kontroll és TGF- $\beta$  kezelt pdMF-ek stresszrost hálózata nagyfokú párhuzamosságot mutatott, IL-24 kezelés hatására az addig hosszúkás sejtek lepedőszerűvé váltak, és a stresszrostok

egymással bezárt szöge nagymértékben megnőtt (18. ábra/a-c). Génexpressziós méréseink szerint az IL-24 fokozta az *ACTA2*, *ACTB*, *VIM*, *SNAI1* és *SNAI2* sejtvezázkotó fehérjéket kódoló, és sejtalak szabályzó gének mRNS expresszióját (18. ábra/d).

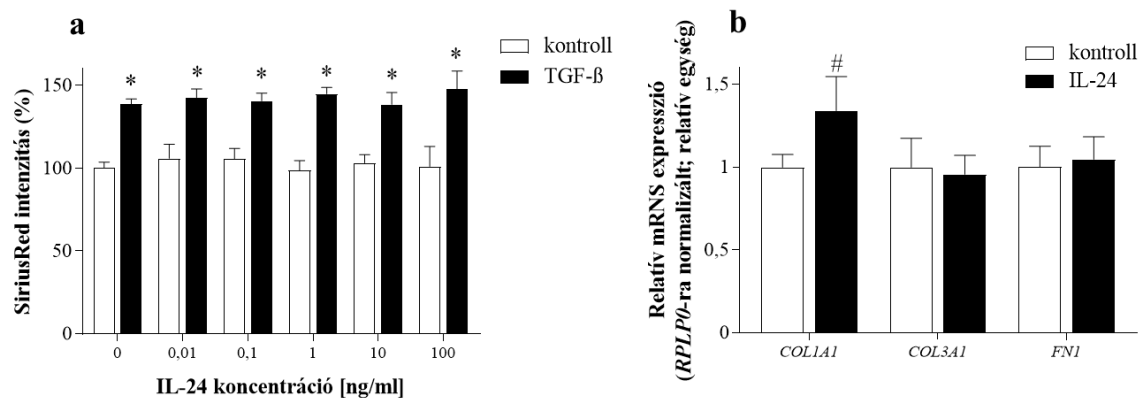


**18. ábra.** Az IL-24 kezelés hatása a pdMF-ek stresszrost orientációjára. A sejtek stresszrost hálózatát  $\alpha$ -SMA immunfestést követően (zöld) fluoreszcens mikroszkóp segítségével tettük láthatóvá (a). Skála: 200  $\mu$ m és 50  $\mu$ m. A stresszrostok orientációjának (b), illetve a sejtek morfológiájának (c) grafikai elemzését ImageJ szoftver segítségével

végeztük el. A diagramon látható pontok az egy sejtben található stresszrostok sejt tengelyével bezárt szögeinek 95%-os konfidencia intervallumait (b), illetve az individuális sejtek körkörösségi indexét (c), a vízszintes vonalak a csoportok átlag  $\pm$  SD értékeit ábrázolják (n=35-40). A sejtek *ACTA2*, *ACTB*, *VIM*, *SNAI1* és *SNAI2* (d) mRNS expresszióját valós idejű RT-PCR-rel, az *RPLP0* expresszió hányadosaként határoztuk meg. A diagramokon átlag  $\pm$  SD adatokat tüntettünk fel (n=5). \*p<0,05 vs. kontroll (Kruskal-Wallis teszt, Dunnett-féle post-hoc teszt), #p<0,05 vs. TGF- $\beta$  (Kruskal-Wallis teszt, Dunnett-féle post-hoc teszt). \$p<0,05 vs. kontroll (Mann-Whitney U-teszt).

#### 4.5.3 Az IL-24 kezelés hatása a duodenális miofibroblasztok kötőszövet termelésére

Az IL-24 miofibroblasztok kötőszövet termelésére gyakorolt hatását TGF- $\beta$ -val kezelt pdMF-eken vizsgáltuk (19. ábra). A SiriusRed teszt (19. ábra/a) eredménye szerint az IL-24 nem befolyásolta az endogén, illetve a TGF- $\beta$  kezelés által kiváltott kollagén termelést. Génexpressziós méréseink alapján az IL-24 nem, vagy alig hatott a pdMF-ek kötőszöveti elem termelésére, ugyanis csak kismértékben fokozta a *COL1A1* mRNS expressziót, és nem befolyásolta a *COL3A1*, valamint a *FNI* szintjét (19. ábra/b).



**19. ábra. Az IL-24 kezelés hatása a pdMF sejtek kötőszövet termelésére.** A sejtek kollagén termelését SiriusRed teszt (a) segítségével vizsgáltuk, eredményeit a kezeletlen csoport (0 ng/ml IL-24 kontroll) átlagértékéhez viszonyítva ábrázoltuk. A sejtek *COL1A1*, *COL3A1* és *FNI* mRNS expresszióját valós idejű RT-PCR-rel, az *RPLP0* expresszió hányadosaként határoztuk meg (b). A diagramokon átlag  $\pm$  SD adatokat tüntettünk fel

(n=5). \* $p < 0,05$  vs.  $0 \text{ ng/mL IL-24 kontroll}$  (két-szemponos ANOVA, Dunnett-féle post-hoc teszt); # $p < 0,05$  vs. kontroll (Mann-Whitney U-teszt)

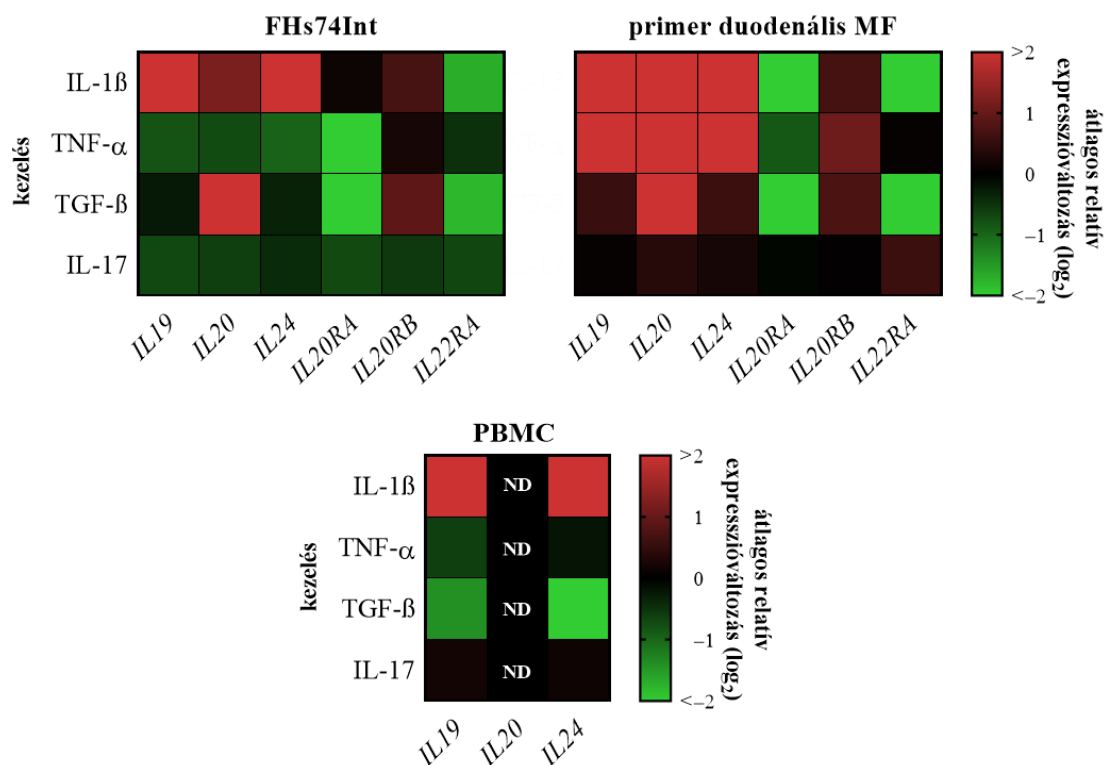
## 5 MEGBESZÉLÉS

A vékonybél egészséges szöveti felépítésének fenntartása a degradációs és regenerációs folyamatok precíz egyensúlyát igényli. A béllumen folyamatos mechanikai, biológiai és kémiai ingereinek kitett bélbolyhok csúcsi epitél sejtjei sérülnek és elhalnak. Pótlásuk érdekében a kripták mélyebb régióiban található őssejtekből új enterociták differenciálódnak, és a szubepiteliális MF-ok által kialakított ECM alapon, a bazális membránon a bélbolyhok csúcsi része felé vándorolnak [114, 181]. Cöliákia esetén a krónikus gyulladás hatására ez a jól szabályozott mechanizmus károsodást szenved, ami a cöliákiára jellemző szövettani képhez, boholyatrófiához és kripta hiperpláziához vezet.

Korábban az IL-19, IL-20 és IL-24 fokozott expresszióját mutatták ki IBD-ben szenvedő betegek mintáiban, és feltételezték a bélnyálkahártya integritásának fenntartásában játszott szerepüket [167, 168, 182, 183]. A cöliákia patomechanizmusában betöltött funkciójukat azonban eddig még nem vizsgálták. Ezért kutatásaink az IL-19, IL-20 és IL-24 citokinek cöliákiában betöltött szerepének megismerésére irányultak. Mivel a cöliákiás betegekből származó bélszövet minták szövettani képe, emelkedett  $\alpha$ -SMA expressziója (az aktív MF-ok elsődleges biomarkere), és az ECM komponens fibronectin fokozott jelenléte aktív szöveti átrendeződést igazolt (3. ábra/e-g) [112], különös figyelmet fordítottunk a citokinek ezen folyamatra gyakorolt hatásainak vizsgálatára.

Tanulmányunk első vizsgálatait kontroll és cöliákiás gyermekek bélszövetmintáin, valamint perifériás vérből izolált mononukleáris sejtjein végeztük. Kísérleteink során a frissen diagnosztizált cöliákiás gyermekek duodenális biopszia mintáiban fokozott IL-24 fehérje- és mRNS expressziót detektáltunk a kontrollokhöz képest (3. ábra/c, d, g). A cöliákiás szövetminták IL-24 mennyisége nem mutatott összefüggést a betegek klinikai paramétereivel (4. ábra). A biopsziák immunfluoreszcens festése alapján a cöliákiás betegek fokozott IL-24 expressziójáért a bélhám epitél-, valamint a lamina propria sejtjei felelősek (3. ábra/i). A kontroll és GFD-t tartó cöliákiás gyermekek vérből izolált PBMC-eket vizsgálva azok *IL19* és *IL24* mRNS expressziója is magasabbnak bizonyult a betegek esetében (11. ábra/a, c). Az IL-20 citokin alcsalád tagjai közti számos hasonlóság ellenére az *IL20* jelenlétét sem bélszövet, sem PBMC mintákban nem tudtuk kimutatni (3. ábra/b, 11. ábra/b). Mindezen eredmények megalapozottá tették feltevésünket,

miszerint az IL-20 citokin alcsalád tagjai szerepet játszanak a cöliákia patomechanizmusában, további vizsgálatok elvégzésére ösztönözve minket.



**20. ábra.** Összefoglaló ábra az IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  és IL-17 kezelések hatásáról az FHs74Int, pdMF és PBMC sejtek IL-19, -20, -24, valamint IL-20RA, -20RB és IL-22RA expressziójára. A sejtek *IL19*, *IL20*, *IL24*, *IL20RA*, *IL20RB* és *IL22RA* mRNS expresszióját a különböző kezeléseket követően valós idejű RT-PCR-rel, az *RPLP0* expresszió hányadosaként határoztuk meg. A hőterképek a különböző kezelések által kiváltott átlagos expresszióváltozás mértékét ábrázolják. Az eredeti diagramok az 5., 7., 8., 10., illetve 12. ábrán találhatóak. ND: nem detektálható

Kísérletsorozatunkat *in vitro* vizsgálatokkal folytattuk. Megvizsgáltuk, hogy mely, a bélhám immunválaszának regulációjában szerepet játszó gyulladáscitokinek [113] szabályozzák az IL-20 citokin alcsalád tagjainak termelődését, és lehetnek felelősek az IL-19, -20, és -24 biopsziás mintákban tapasztalt expressziós mintázatáért (20. ábra). Mivel mind az irodalmi adatok [147], mind a biopszia minták immunfluoreszcens festése alapján (3. ábra/i) az említett citokinek fő forrásai a bélhám epitél-, valamint a lamina

propria sejtjei, vizsgálatainkat FHs74Int duodenális eredetű epitel sejteken (5. ábra), primer duodenális miofibroblasztokon (8. ábra), valamint GFD-t tartó cöliákiás gyermekekből származó PBMC-ken (12. ábra) végeztük. A sejteket IL-1 $\beta$ -val, TNF- $\alpha$ -val, TGF- $\beta$ -val, illetve IL-17-tel kezeltük, és megvizsgáltuk a sejtek IL-19, IL-20, illetve IL-24 termelését. Az alkalmazott faktorok közül kiemelkedőnek bizonyult az IL-1 $\beta$  hatása, ugyanis a kezelés mindhárom sejt típuson nagymértékben fokozta a citokinek expresszióját (5., 6., 8., 9., 12., 13. ábra). Ez alól kivételt csak a PBMC sejtek *IL20* mRNS expressziója jelentett, ami nem csak az IL-1 $\beta$ , hanem bármely más kezelés ellenére is detektálhatatlan maradt (12. ábra). Eredményeink összhangban állnak Andoh és mtsai megfigyeléseivel, amelyek szerint az IL-1 $\beta$  az IL-24 fő induktora vastagbél eredetű MF sejtekben [167]. Az epitel típusú sejtek tekintetében ugyanakkor eredményeink eltérnek az említett tanulmányban leírtaktól. Míg Andoh és mtsai HT-29, Caco-2 és SW 480 vastagbél eredetű epitel sejteket IL-1 $\beta$ -val kezelve nem tapasztaltak változást az *IL24* expresszió mértékében, addig mi az FHs74Int duodenális epitel sejteken erőteljes IL-24 indukciót detektáltunk IL-1 $\beta$  kezelést követően. Ezen ellentmondás azonban magyarázható az alkalmazott sejt vonalak különböző eredetével. Míg az FHs74Int sejt vonal egészséges vékonybél szövetből származik, az Andoh és mtsai által használt sejt vonalak mindegyike vastagbél daganat eredetű.

A TNF- $\alpha$  kezelés hatása sejt típus függőnek bizonyult. Míg pdMF-eken fokozta a vizsgált citokinek expresszióját (8. ábra/b, 9. ábra), addig az FHs74Int sejteken csökkentette azt (5. ábra/b), a PBMC-ken pedig nem volt hatása (12. ábra/b). A TNF- $\alpha$  sejtspecifikus hatása ismert, leírták már gyulladás, sejt homeosztázis, proliferáció, illetve életképesség szabályozása kapcsán [184]. Lee és mtsai kimutatták, hogy TNF- $\alpha$  kezelés hatására erőteljes és tartós IL-6 expresszió figyelhető meg szinoviális fibroblasztokban, makrofágokon viszont csak átmeneti IL-6 indukciót tapasztaltak [185]. A jelenség hátterében a makrofág sejtekben megfigyelhető ABIN3, IRAK-M, SOCS3, illetve ATF3, ismert citokin expresszió-gátló útvonalak TNF- $\alpha$  kezelés általi aktiválódása áll. Ez a gátló mechanizmus, amely megakadályozza a kontrollálatlan gyulladásos válasz kialakulását, nem csak immunsejtekben, hanem az immunogén anyagokkal szintén gyakran találkozó epitel sejtekben is jelen van [186]. Úgy gondoljuk, hogy a TNF- $\alpha$  általunk tapasztalt hatásának hátterében hasonló folyamat állhat.

Ezen eredményeink összességében amellet, hogy képet alkotnak az IL-19, -20, és -24 expresszióját szabályozó faktorok hatásairól, arra utalnak, hogy a cöliákia során megemelkedő IL-24 a bélhám epitél, MF és PBMC sejtjeinek gyulladásra adott válaszának eredménye.

Az IL-19, IL-20 és IL-24 citokinek biológiai hatásait kétféle heterodimer receptoron, az IL-20RA/IL-20RB, valamint az IL-22RA/IL-20RB komplexeken keresztül fejtik ki [143]. Irodalmi adatok alapján az epitél és fibroblaszt sejtek lehetnek az IL-20 citokin alcsalád potenciális célpontjai [147]. Ezzel összhangban a cöliakiás biopsziákon végzett immunfluoreszcens festés a bélnyálkahártya epitél sejtjein, illetve a lamina propria egyes sejtjein mutatta ki a közös receptor alegység, az IL-20RB jelenlétét (3. ábra/i). Hasonlóképpen, erőteljes IL-20RB immunpozitivitást detektáltunk FHS74Int duodenális epitél sejtjein, illetve pdMF-eken is (3. ábra/h). Ezek ismeretében megvizsgáltuk, hogy a fentebb bemutatott kísérletsorozatunkban is alkalmazott gyulladásszerű faktorok milyen hatást fejtenek ki az IL-20 citokin alcsalád receptor alegységeinek expressziójára (20. ábra). Eredményeink szerint az IL-1 $\beta$ , a TNF- $\alpha$  és a TGF- $\beta$  fokozta az *IL20RB* expresszióját, azonban csökkentette a másik két alegység, az *IL20RA* és *IL22RA* mRNS-ének mennyiségét az FHS74Int sejtjein (7. ábra) és a pdMF-eken (10. ábra) egyaránt. Mivel a funkcionális receptor dimerek képződéséhez szükség van az IL-20RB mellett a kiegészítő alegységek jelenlétére is, eredményeink alapján felvetődik, hogy a vizsgált gyulladásszerű citokinek gátolják az IL-20 alcsalád funkcióját a bélszövetben. Azonban korábbi tanulmányok kimutatták, hogy az IL-24 képes a monomer formában levő IL-20RB alegységhez is kötődni [144]. Ez az interakció elősegíti az IL-20RB dimerizációját az IL-20RA, illetve IL-22RA alegységekkel, ami pedig tovább fokozza a receptor komplex-ligand kötődési affinitását [187]. Mindez, kiegészítve a gyulladt bélnyálkahártyában tapasztalt fokozott IL-24 expresszióval, az IL-20 alcsalád citokinjei közül az IL-24 cöliákia patomechanizmusában betöltött kiemelt szerepét veti fel.

Eredményeinkre alapozva a továbbiakban az IL-24 lehetséges biológiai funkcióját vizsgáltuk a cöliakiához kapcsolódó szöveti átrendeződés folyamatában. *In vitro* kísérleteink során a bélhám homeosztázisában kulcsszerepet játszó epitél sejtjeit, illetve miofibroblasztokat kezeltünk IL-24-gyel, és többféle módszerrel vizsgáltuk a citokin sejtjeire kifejtett hatásait.



A cöliákiára jellemző bélhám károsodásban központi szerepet játszik az oxidatív stressz [112]. A táplálékkal a béllumenbe kerülő gliadin direkt módon, valamint krónikus gyulladás kiváltása által reaktív oxigén-, illetve hidroxilgyökök nagymértékű képződését indukálja, ami a bélnyálkahártya epitél sejtjeinek oxidatív károsodását okozza [124]. Kísérleteink során a duodenális oxidatív stresszt FHs74Int vékonybél epitél sejtek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal történő kezelésével modelleztük.

A duodenális biopsziákból készült metszetek, valamint az FHs74Int epitél sejtjeinek állapotát aktin rosthálózatuk fluoreszcens jelölésével tettük láthatóvá. A duodenális szövetmintákat vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a betegek esetében az epitél sejtek vázrendszere súlyosan károsodott. Míg az egészséges mintákon az aktin festés megtarott struktúrát mutatott az epitél sejtek felszínén, kontúr-szerűen jelölve azok határait, addig a gyulladt szövetből származó minták diffúz, szemcsés festődést mutattak (14. ábra). Hasonlóan hatott az oxidatív stressz az FHs74Int sejtek vázrendszerére is. A kétdimenziós sejt kultúrán az egészséges sejt vázat a jellegzetes, szálasan festődő aktin rosthálózat jellemzi, azonban H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés hatására a rostok szétesnek, és intracelluláris aggregátumokat képeznek (15. ábra).

Az FHs74Int sejtek oxidatív károsodásának mértékét többféle módszerrel is megvizsgáltuk. Az élő sejtek arányát MTT teszt (16. ábra/a), az elpusztult sejtekből kiáramló enzimek mennyiségét LDH teszt (16. ábra/b), az apoptotizáló sejtek arányát Annexin V teszt (16. ábra/c) segítségével határoztuk meg. A tesztek alapján a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés erőteljes sejt pusztulást okozott, melyet azonban az IL-24 nagymértékben csökkentett. Ezzel párhuzamosan az IL-24 mérsékelte az oxidatív stressz által indukált *IL1A* (16. ábra/d), *IL6* (16. ábra/f), illetve *TNF* (16. ábra/g) mRNS expressziót, melyek az epitél sejtek által termelt legfőbb pro-inflammatorikus citokinek [128]. Eredményeink összhangban állnak az irodalmi adatokkal, amelyek az IL-10 család, valamint az ebbe tartozó IL-20 alcsalád gyulladásgátló hatásairól számolnak be [147]. Mindezek alapján azt feltételezzük, hogy az IL-24 az epitél sejtek oxidatív stresszel szembeni védekezésben, a gyulladt bélhám integritásának fenntartásában játszhat szerepet (21. ábra).

A bélnyálkahártya hámrétegének megújulásában központi szerepet játszik az epitél sejtek alapjául szolgáló bazális membrán, melynek fő összetevői a kollagén, fibronectin, laminin, illetve egyéb ECM fehérjék [112, 116]. Mivel a vékonybélben e kötőszöveti elemek termeléséért az epitél réteg alatt elhelyezkedő miofibroblasztok felelősek [181,

188, 189], ezek a sejtek kulcsfontosságúak a cöliákiás betegek bélhámjának regenerációjában. Kísérleteink folytatásaként az IL-24-nek a miofibroblasztok legfőbb funkcióit biztosító tulajdonságaira, így a sejtalakra, proliferációra, kötőszövettermelésre gyakorolt hatását vizsgáltuk.

A miofibroblasztok összehúzódásában, így a környezetükben lévő kötőszövet kontrahálásában, illetve a sejtek helyváltoztatásában fontos szerepet játszik a főként  $\alpha$ -SMA fehérjéből felépülő stresszrost rendszerük [133, 137]. Kísérleteink, melyek során immunfluoreszcens festés segítségével vizualizáltuk az  $\alpha$ -SMA rostokat rávilágítottak, hogy az IL-24 hatással van a pdMF-ok alakjára (18. ábra). Míg kezeletlen, valamint TGF- $\beta$ -val kezelt sejtekben a stresszrostok egymással, illetve a megnyúlt sejt tengelyével párhuzamosan helyezkednek el, az IL-24-gyel kezelt pdMF-ok lepedőszerű alakot vettek fel, stresszrostjaik átrendeződtek, körszerűen orientálódtak (18. ábra/a-c). Ezzel összhangban állnak génexpressziós méréseink eredményei, amelyek szerint az IL-24 kezelés fokozta a sejt alakját meghatározó faktorok, így a sejtváz szerkezetet alkotó komponensek (az *ACTA2* gén által kódolt  $\alpha$ -SMA, *ACTB* által kódolt  $\beta$ -aktin, *VIM* által kódolt vimentin), valamint a legismertebb, sejt morfológiát szabályzó transzkripció faktorok (*SNAI1* által kódolt Snail, *SNAI2* által kódolt Slug) expresszióját (18. ábra/d).

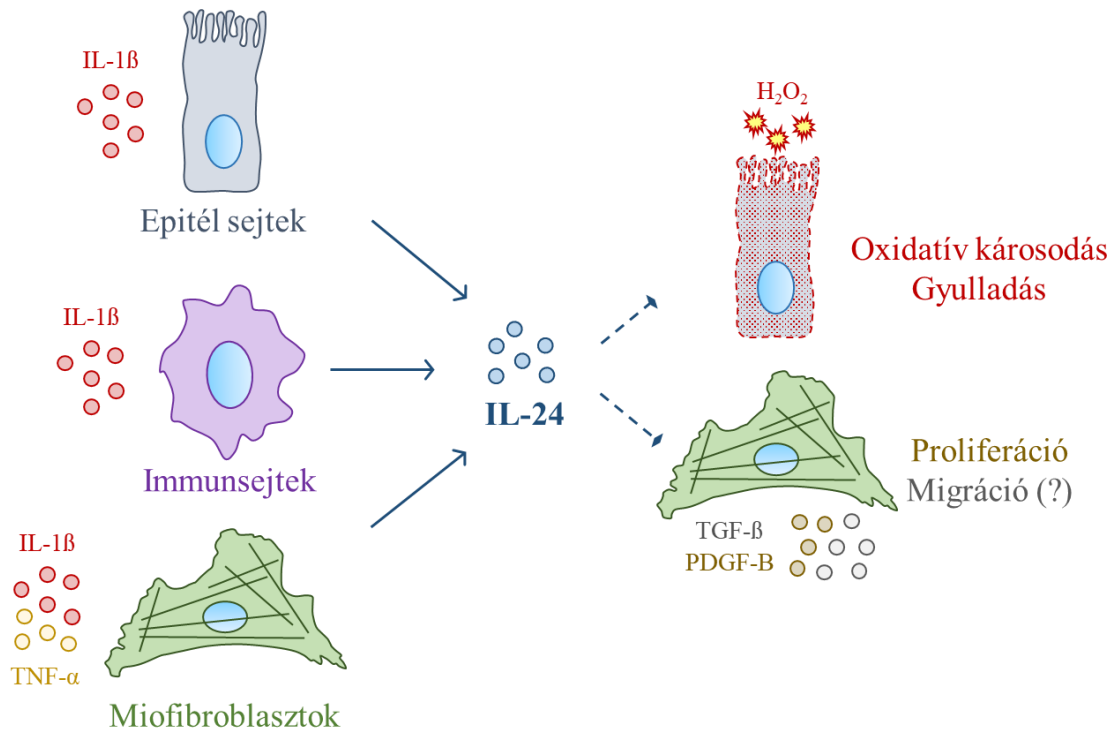
Roncoroni és mtsai kontroll, valamint cöliákiás betegek vékonybeléből izolált primer miofibroblasztok jellemző tulajdonságait hasonlították össze egymással [114, 115]. Megfigyeléseik szerint a betegekből származó sejtek az általunk IL-24 kezelés hatására tapasztalhatóhoz hasonló fenotípust mutattak. Emellett kimutatták azt is, hogy a cöliákiás biopsziából izolált, lepedőszerű sejtek csökkent motilitással, migrációs kapacitással bírnak az egészséges vékonybélből származó, elnyúlt alakú miofibroblasztokhoz képest. Feltételezésük szerint a megfigyelt morfológiai, illetve a mozgási képességben való eltérés hozzájárulhat a cöliákia progressziójához, hiszen az egészséges bélnyálkahártya újjáépülésének, a sebgyógyulásnak a feltétele a miofibroblasztok sérülés helyére történő vándorlása. A stresszrost orientáció és a betegség progressziójának kapcsolata azonban nem ennyire egyértelmű. Korábban kimutatták, hogy a miofibroblasztok aktin-miozin rostrendszer határozza meg a sejt összehúzódási képességét, mely nagymértékben fokozódik az  $\alpha$ -SMA stresszrostok beépülésének köszönhetően [137, 188-190]. Az is bizonyított, hogy a miofibroblasztok összehúzódási képessége jóval nagyobb, mint ami a sejtvándorláshoz szükséges, és inkább a sejt környezetében levő kötőszöveti elemek,

ECM molekulák összehúzódását biztosítja [190-192]. Mivel a bélszövetben -ellentétben például a veseszövettel- az epitel sejtréteg alatt egészséges és gyulladt állapotban is nagy mennyiségben jelen vannak a miofibroblasztok [193], feltételezhetjük, hogy az IL-24 hatására fokozódó *ACTA2* expresszió és a sejtalak megváltozása a sejtváándorlás helyett a miofibroblasztok összehúzódási képességének fokozása révén segíti a sebgyógyulást.

Az IL-24 miofibroblasztokra gyakorolt biológiai hatását további modellekben is megvizsgáltuk. Az IL-24 mérsékelte a pdMF-ek endogén, illetve PDGF-B kezelés által kiváltott proliferációját (17. ábra/a), miközben nem befolyásolta a sejtek életképességét egyik kezelési csoportban sem (17. ábra/b), azaz az MTT teszt során tapasztalt sejtszámcsökkenést nem kísérte a citotoxicitásra utaló LDH mennyiségének növekedése. Ezzel összhangban állt az IL-24 kezelés sejtciklusszabályzó gének expressziójára kifejtett hatása. Az IL-24 csökkentette a proliferációs markereket kódoló *PCNA* és *KI67* mRNS expresszióját a PDGF-B kezelt csoportban (17. ábra/c-d) [194, 195], de az apoptózis indukciójához köthető p21 és p53 fehérjéket kódoló *CDKN1A* és *TP53* gének kifejeződését nem befolyásolta érdemben (17. ábra/e-f) [196-198]. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy az IL-24 specifikus anti-proliferációs hatással bír a pdMF sejteken. Megfigyeléseink összhangban állnak Liang és mtsai eredményeivel, akik tanulmányukban kimutatták, hogy az IL-24 gátolja a bőr eredetű keloid fibroblasztok proliferációját [199].

Utolsó lépésként megvizsgáltuk a pdMF-ok kötőszövettermelését is IL-24 kezelést követően (19. ábra). Bár génexpressziós méréseink szerint az IL-24 hatására kis mértékben fokozódott a kötőszövet legfőbb alkotójának, az I típusú kollagént kódoló *COL1A1* génnek mRNS expressziója, a kezelés más vizsgált ECM alkotó mennyiségét nem befolyásolta (19. ábra/b), és nem változott sem az endogén, sem a TGF- $\beta$  által kiváltott kollagén depozíció mértéke sem (19. ábra/a). Bár a miofibroblasztok és az általuk termelt ECM komponensek nélkülözhetetlen szerepet játszanak a szöveti regeneráció mechanizmusában, a túlzott sejtproliferáció és kötőszövettermelés a szövet hegesedéséhez, fibrózishoz vezethet [112].

Összefoglalva a pdMF-eken végzett kísérleteink során tapasztaltakat, az IL-24 citokin a miofibroblasztokra kifejtett biológiai hatása révén a bélhám regenerációjában, a szöveti újjáépülés egyensúlyának megőrzésében játszhat szerepet (21. ábra).



**21. ábra.** Az IL-24 cöliákia során megfigyelhető bélhám szöveti átrendeződésben betöltött szerepének általunk feltételezett mechanizmusa. Eredményeink alapján a gyulladt vékonybél-szövetben IL-1 $\beta$ , illetve TNF- $\alpha$  hatására fokozódik a bélhám epitél sejtek, a miofibroblasztok, illetve az immunsejtek IL-24 termelése. Az IL-24 hozzájárul az epitél sejtek oxidatív károsodással szembeni védekezéséhez, valamint gátolja a miofibroblasztok proliferációját, és csökkent migrációs képességre utaló sejtvázszerkezetet eredményez. (Saját ábra)

## 6 KÖVETKEZTETÉSEK

Munkánk során a cöliákia patomechanizmusának pontosabb megismerése érdekében az IL-20 citokin alcsalád tagjainak a betegségben betöltött szerepét vizsgáltuk. Megfogalmazott kérdéseinkre humán szövetmintákon végzett vizsgálatok, és *in vitro* kísérletek segítségével kerestük a választ. Eredményeink alapján az alábbi következtetéseket vonhatjuk le:

- A vékonybél biopsziák vizsgálata során a cöliákiás mintákban tapasztalt emelkedett  $\alpha$ -SMA és FN mennyiség a nyálkahártya szöveti struktúrájának aktív átrendeződésére utal.
- Az IL-24 mennyisége magasabb cöliákiás bélszövetben, valamint a betegekből izolált PBMC-kben a kontroll mintákban mért értékekhez képest.
- *In vitro* kísérleteink alapján az epitél sejtek, a miofibroblasztok, valamint az immunsejtek egyaránt felelősek lehetnek az IL-19, -20, és -24 expressziójáért a bélben.
- *In vitro* igazoltuk, hogy az IL-19, -20, és -24, valamint receptoraik expresszióját erőteljesen befolyásolják a bél gyulladásos folyamataiban szerepet játszó citokinek, amelyek közül különösen az IL-1 $\beta$  hatása jelentős.
- Az IL-24 *in vitro* csökkenti a vékonybél epitél sejtek esetében az oxidatív stressz által kiváltott sejthalálozás mértékét, valamint mérsékli az oxidatív stressz indukálta gyulladásos citokinek termelését.
- *In vitro* körülmények között az IL-24 csökkenti a miofibroblasztok endogén, illetve PDGF-indukált proliferációját.
- Az IL-24 *in vitro* körülmények között a miofibroblasztok aktin stresszrost hálózatának átrendeződését, a sejtek morfológiai változását okozza.

## 7 ÖSSZEFOGLALÁS

A cöliákia a népesség kb. 1%-át érinti világszerte, és előfordulása folyamatosan növekvő tendenciát mutat. Jelenleg egyetlen igazán hatékony terápiája az élethosszig tartó szigorú gluténmentes diéta. Azonban mind a GFD-hez való nehéz alkalmazkodás, mind a terápiára nem reagáló esetek nagy száma újabb, a GFD-t helyettesítő vagy kiegészítő terápiás megoldások bevezetését sürgeti, ami a cöliákia patomechanizmusának pontos, részletes megismerését teszi szükségessé.

Az IL-20 citokin alcsalád szerepét számos, krónikus gyulladással és szöveti átrendeződéssel járó kórképben leírták, a cöliákia kapcsán azonban idáig még nem vizsgálták őket. Mindezek alapján munkánk célja az IL-19, -20, és -24 cöliákiában betöltött szerepének vizsgálata volt. Kísérleteinket humán bélszövetmintákon és *in vitro* sejtes modelleken végeztük.

Vizsgálataink jelentőségét fokozza a tény, hogy az ESPGHAN által 2020-ban kiadott új, a cöliákia diagnózisával kapcsolatos ajánlás [62] már nem tartalmazza a vékonybélből származó biopszia vételét. Ebből adódóan a következő években egyre kevesebb lehetőség nyílik a bélhámiban zajló folyamatok lokális vizsgálatára. Így nem csak hazai, de nemzetközi szinten is tanulmányunk lehet az egyik utolsó, mely az értékes szövetminta vizsgálatán alapszik.

Vizsgálataink során cöliákiás gyermekek vékonybél nyálkahártyájában aktív szöveti átrendeződést, valamint emelkedett IL-24 szintet mutattunk ki.

*In vitro* kísérleteinkben a vékonybél epitél sejtek, a miofibroblasztok, és az immunsejtek egyaránt képesek voltak az IL-19, -20, és -24 expressziójára. Sejtes modelljeinkben a citokinek és receptoraik expresszióját jelentősen befolyásolták a bél gyulladással járó folyamataiban szerepet játszó mediátorok, melyek közül az IL-1 $\beta$  hatása bizonyult a legmeghatározóbbnak.

A cöliákiás bélre jellemző epitéliális oxidatív károsodást modellező sejtes rendszerben végzett vizsgálataink alapján az IL-24 a bélepitélium oxidatív stressz elleni védekezésében játszhat szerepet, mivel csökkentette az oxidatív stressz által kiváltott sejthalál mértékét, valamint a stresszindukált citokinek termelését. Ugyancsak *in vitro* körülmények között az IL-24 csökkentette a miofibroblasztok endogén, illetve

PDGF-indukált proliferációját, valamint a sejtek aktin stresszrost hálózatának átrendeződését, morfológiai változását okozta, ami az IL-24 szöveti átrendeződésben játszott szerepét támasztja alá.

## 8 SUMMARY

Coeliac disease affects approximately 1% of the population worldwide and its prevalence is increasing. Currently, the therapy of CD is limited to the strict life-long gluten free diet (GFD). However, the high number of patients with non-responsive CD and also the significant therapeutic burden of GFD urge the development of new therapeutic approaches, which necessitate the better understanding the pathomechanism of the disease. Recently, involvement of IL-19, IL-20 and IL-24 has been reported in inflammatory diseases associated with tissue remodeling. However, their impact on the pathomechanism of CD is still completely unknown. In this study, we aimed to investigate the involvement of IL-19, -20, and -24 in CD. Our experiments were performed on human tissue samples, and on *in vitro* cellular models.

As according to 2020 ESPHGAN guidelines, diagnosis of CD can be established without upper endoscopy, our study could be one of the last ones using duodenal biopsies.

We found intensive mucosal remodeling and elevated IL-24 level in the duodenal mucosa of children with CD.

Based on our *in vitro* results, cellular sources of IL-19, -20, and -24 are small intestinal epithelial cells, myofibroblast, and also immune cells. The expression of the investigated cytokines and their receptors was strongly influenced by intestinal inflammatory mediators. Amongst these, effect of IL-1 $\beta$  proved to be the most significant. In the experimental model of intestinal oxidative damage, IL-24 reduced the degree of apoptosis and the expression of cytokines induced by oxidative stress, suggesting its protective effect on the intestinal mucosa. IL-24 decreased the endogenous and also PDGF-induced proliferation of myofibroblasts, and altered their morphology by influencing the arrangement of actin fiber system, supporting the role of IL-24 in tissue remodeling.



## 9 IRODALOMJEGYZÉK

1. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PH, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Kelly CP, Leonard JN. (2013) The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*, 62: 43-52
2. Lindfors K, Ciacci C, Kurppa K, Lundin KE, Makharia GK, Mearin ML, Murray JA, Verdu EF, Kaukinen K. (2019) Coeliac disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 5: 1-18
3. Catassi C, Gatti S, Fasano A. (2014) The new epidemiology of celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 59 Suppl 1: S7-9
4. Shewry PR, Halford NG, Belton PS, Tatham AS. (2002) The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 357: 133-142
5. Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, Khosla C. (2002) Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*, 297: 2275-2279
6. Sollid LM. (2002) Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nature Reviews Immunology*, 2: 647-655
7. Singh P, Arora S, Lal S, Strand TA, Makharia GK. (2015) Risk of celiac disease in the first-and second-degree relatives of patients with celiac disease: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Gastroenterology*, 110: 1539-1548
8. Karell K, Louka AS, Moodie SJ, Ascher H, Clot F, Greco L, Ciclitira PJ, Sollid LM, Partanen J, Disease EGCoC. (2003) HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1\* 05-DQB1\* 02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Human immunology*, 64: 469-477
9. Sollid LM. (2017) The roles of MHC class II genes and post-translational modification in celiac disease. *Immunogenetics*, 69: 605-616

10. Dubois PC, Trynka G, Franke L, Hunt KA, Romanos J, Curtotti A, Zhernakova A, Heap GA, Ádány R, Aromaa A. (2010) Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nature genetics*, 42: 295
11. Hunt KA, Zhernakova A, Turner G, Heap GA, Franke L, Bruinenberg M, Romanos J, Dinesen LC, Ryan AW, Panesar D. (2008) Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response. *Nature genetics*, 40: 395
12. Kondrashova A, Mustalahti K, Kaukinen K, Viskari H, Volodicheva V, Haapala AM, Ilonen J, Knip M, Mäki M, Hyöty H. (2008) Lower economic status and inferior hygienic environment may protect against celiac disease. *Annals of medicine*, 40: 223-231
13. Ivarsson A, Hernell O, Stenlund H, Persson LÅ. (2002) Breast-feeding protects against celiac disease. *The American journal of clinical nutrition*, 75: 914-921
14. Norris JM, Barriga K, Hoffenberg EJ, Taki I, Miao D, Haas JE, Emery LM, Sokol RJ, Erlich HA, Eisenbarth GS. (2005) Risk of celiac disease autoimmunity and timing of gluten introduction in the diet of infants at increased risk of disease. *Jama*, 293: 2343-2351
15. Aronsson CA, Lee H-S, Koletzko S, Uusitalo U, Yang J, Virtanen SM, Liu E, Lernmark Å, Norris JM, Agardh D. (2016) Effects of gluten intake on risk of celiac disease: a case-control study on a Swedish birth cohort. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 14: 403-409. e403
16. Ivarsson A, Hernell O, Nyström L, Persson LÅ. (2003) Children born in the summer have increased risk for coeliac disease. *Journal of Epidemiology & Community Health*, 57: 36-39
17. Mårild K, Kahrs CR, Tapia G, Stene LC, Størdal K. (2015) Infections and risk of celiac disease in childhood: a prospective nationwide cohort study. *American Journal of Gastroenterology*, 110: 1475-1484
18. Kempainen KM, Lynch KF, Liu E, Lönnrot M, Simell V, Briese T, Koletzko S, Hagopian W, Rewers M, She J-X. (2017) Factors that increase risk of celiac

- disease autoimmunity after a gastrointestinal infection in early life. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 15: 694-702. e695
19. Stene LC, Honeyman MC, Hoffenberg EJ, Haas JE, Sokol RJ, Emery L, Taki I, Norris JM, Erlich HA, Eisenbarth GS. (2006) Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *American Journal of Gastroenterology*, 101: 2333-2340
  20. Lebowitz B, Spechler SJ, Wang TC, Green PH, Ludvigsson JF. (2014) Use of proton pump inhibitors and subsequent risk of celiac disease. *Digestive and Liver Disease*, 46: 36-40
  21. Kemppainen KM, Vehik K, Lynch KF, Larsson HE, Canepa RJ, Simell V, Koletzko S, Liu E, Simell OG, Toppari J. (2017) Association between early-life antibiotic use and the risk of islet or celiac disease autoimmunity. *JAMA pediatrics*, 171: 1217-1225
  22. Forsberg G, Fahlgren A, Hörstedt P, Hammarström S, Hernell O, Hammarström M-L. (2004) Presence of bacteria and innate immunity of intestinal epithelium in childhood celiac disease. *American Journal of Gastroenterology*, 99: 894-904
  23. Verdu EF, Galipeau HJ, Jabri B. (2015) Novel players in coeliac disease pathogenesis: role of the gut microbiota. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 12: 497
  24. Ou G, Hedberg M, Hörstedt P, Baranov V, Forsberg G, Drobni M, Sandström O, Wai SN, Johansson I, Hammarström M-L. (2009) Proximal small intestinal microbiota and identification of rod-shaped bacteria associated with childhood celiac disease. *American Journal of Gastroenterology*, 104: 3058-3067
  25. Sánchez E, Donat E, Ribes-Koninckx C, Fernández-Murga ML, Sanz Y. (2013) Duodenal-mucosal bacteria associated with celiac disease in children. *Applied and environmental microbiology*, 79: 5472-5479
  26. Pozo-Rubio T, Olivares M, Nova E, De Palma G, Mujico JR, Ferrer MD, Marcos A, Sanz Y. (2012) Immune development and intestinal microbiota in celiac disease. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012:

27. Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B. (2011) Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annual review of immunology*, 29: 493-525
28. Molberg Ø, Mcadam SN, Körner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, Fugger L, Scott H, Norén O, Roepstorff P. (1998) Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med*, 4: 713-717
29. Lundin K, Scott H, Hansen T, Paulsen G, Halstensen T, Fausa O, Thorsby E, Sollid L. (1993) Gliadin-specific, HLA-DQ (alpha 1\* 0501, beta 1\* 0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *The Journal of experimental medicine*, 178: 187-196
30. Van De Wal Y, Kooy YM, Van Veelen PA, Peña SA, Mearin LM, Molberg Ø, Lundin KE, Sollid LM, Mutis T, Benckhuijsen WE. (1998) Small intestinal T cells of celiac disease patients recognize a natural pepsin fragment of gliadin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 10050-10054
31. Bodd M, Raki M, Tollefsen S, Fallang L-E, Bergseng E, Lundin K, Sollid L. (2010) HLA-DQ2-restricted gluten-reactive T cells produce IL-21 but not IL-17 or IL-22. *Mucosal immunology*, 3: 594-601
32. Rauhavirta T, Hietikko M, Salmi T, Lindfors K. (2019) Transglutaminase 2 and transglutaminase 2 autoantibodies in celiac disease: a review. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 57: 23-38
33. Bouziat R, Hinterleitner R, Brown JJ, Stencel-Baerenwald JE, Ikizler M, Mayassi T, Meisel M, Kim SM, Discepolo V, Pruijssers AJ. (2017) Reovirus infection triggers inflammatory responses to dietary antigens and development of celiac disease. *Science*, 356: 44-50
34. Malamut G, El Machhour R, Montcuquet N, Martin-Lannerée S, Dusanter-Fourt I, Verkarre V, Mention J-J, Rahmi G, Kiyono H, Butz EA. (2010) IL-15 triggers an antiapoptotic pathway in human intraepithelial lymphocytes that is a potential new target in celiac disease-associated inflammation and lymphomagenesis. *J Clin Invest*, 120: 2131-2143

35. Salvati V, MacDonald T, Bajaj-Elliott M, Borrelli M, Staiano A, Auricchio S, Troncone R, Monteleone G. (2002) Interleukin 18 and associated markers of T helper cell type 1 activity in coeliac disease. *Gut*, 50: 186-190
36. Hüe S, Mention J-J, Monteiro RC, Zhang S, Cellier C, Schmitz J, Verkarre V, Fodil N, Bahram S, Cerf-Bensussan N. (2004) A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity*, 21: 367-377
37. Luciani A, Vilella VR, Vasaturo A, Giardino I, Pettoello-Mantovani M, Guido S, Cexus ON, Peake N, Londei M, Quarantino S. (2010) Lysosomal accumulation of gliadin p31–43 peptide induces oxidative stress and tissue transglutaminase-mediated PPAR $\gamma$  downregulation in intestinal epithelial cells and coeliac mucosa. *Gut*, 59: 311-319
38. Schuppan D, Junker Y, Barisani D. (2009) Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology*, 137: 1912-1933
39. Kutlu T, Brousse N, Rambaud C, Le Deist F, Schmitz J, Cerf-Bensussan N. (1993) Numbers of T cell receptor (TCR) alpha beta+ but not of TcR gamma delta+ intraepithelial lymphocytes correlate with the grade of villous atrophy in coeliac patients on a long term normal diet. *Gut*, 34: 208-214
40. Maiuri L, Ciacci C, Raia V, Vacca L, Ricciardelli I, Raimondi F, Auricchio S, Quarantino S, Londei M. (2001) FAS engagement drives apoptosis of enterocytes of coeliac patients. *Gut*, 48: 418-424
41. Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, Tretiakova M, Bhagat G, Krausz TN, Raulet DH, Lanier LL, Groh V, Spies T. (2004) Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity*, 21: 357-366
42. Oberhuber G, Vogelsang H, Stolte M, Muthenthaler S, Kummer AJ, Radaszkiewicz T. (1996) Evidence that intestinal intraepithelial lymphocytes are activated cytotoxic T cells in celiac disease but not in giardiasis. *The American journal of pathology*, 148: 1351
43. Terrazzano G, Sica M, Gianfrani C, Mazzarella G, Maurano F, De Giulio B, de Saint-Mezard S, Zanzi D, Maiuri L, Londei M. (2007) Gliadin regulates the NK-

- dendritic cell cross-talk by HLA-E surface stabilization. *The Journal of Immunology*, 179: 372-381
44. Jabri B, De Serre NPM, Cellier C, Evans K, Gache C, Carvalho C, Mougnot JF, Allez M, Jian R, Desreumaux P. (2000) Selective expansion of intraepithelial lymphocytes expressing the HLA-E-specific natural killer receptor CD94 in celiac disease. *Gastroenterology*, 118: 867-879
  45. Meresse B, Curran SA, Ciszewski C, Orbelyan G, Setty M, Bhagat G, Lee L, Tretiakova M, Semrad C, Kistner E. (2006) Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease. *The Journal of experimental medicine*, 203: 1343-1355
  46. Fasano A. (2005) Clinical presentation of celiac disease in the pediatric population. *Gastroenterology*, 128: S68-S73
  47. Jones S, D'Souza C, Haboubi NY. (2006) Patterns of clinical presentation of adult coeliac disease in a rural setting. *Nutrition Journal*, 5: 24
  48. Sher K, Jayanthi V, Probert C, Stewart C, Mayberry J. (1994) Infertility, obstetric and gynaecological problems in coeliac sprue. *Digestive Diseases*, 12: 186-190
  49. Sher KS, Mayberry JF. (1994) Female fertility, obstetric and gynaecological history in coeliac disease. *Digestion*, 55: 243-246
  50. Cicarelli G, Della Rocca G, Amboni M, Ciacci C, Mazzacca G, Filla A, Barone P. (2003) Clinical and neurological abnormalities in adult celiac disease. *Neurological Sciences*, 24: 311-317
  51. Ciaccio EJ, Lewis SK, Biviano AB, Iyer V, Garan H, Green PH. (2017) Cardiovascular involvement in celiac disease. *World journal of cardiology*, 9: 652
  52. Collin P, Salmi TT, Hervonen K, Kaukinen K, Reunala T. (2017) Dermatitis herpetiformis: a cutaneous manifestation of coeliac disease. *Annals of medicine*, 49: 23-31
  53. Ravikumara M, Nootigattu V, Sandhu B. (2007) Ninety percent of celiac disease is being missed. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 45: 497-499

54. Duggan JM. (2004) Coeliac disease: the great imitator. *Medical journal of Australia*, 180: 524-526
55. Arato A, Körner A, Veres G, Dezsöfi A, Ujpál I, Madácsy L. (2003) Frequency of coeliac disease in Hungarian children with type 1 diabetes mellitus. *European journal of pediatrics*, 162: 1-5
56. Guariso G, Conte S, Presotto F, Basso D, Brotto F, POZZA LVD, Pedini B, Betterle C. (2007) Clinical, subclinical and potential autoimmune diseases in an Italian population of children with coeliac disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 26: 1409-1417
57. George E, Mearin M, Bouquet J, Von Blomberg B, Stapel S, Van Elburg R, De Graaf E, ten Cate RH, van Suijlekom-Smit L, Reeser H. (1996) Screening for coeliac disease in Dutch children with associated diseases. *Acta Paediatrica*, 85: 52-53
58. Collin P, Syrjänen J, Partanen J, Pasternack A, Kaukinen K, Mustonen J. (2002) Celiac disease and HLA DQ in patients with IgA nephropathy. *The American journal of gastroenterology*, 97: 2572-2576
59. Cataldo F, Marino V, Ventura A, Bottaro G, Corazza G. (1998) Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease: an Italian multicentre study. *Gut*, 42: 362-365
60. Cellier C, Delabesse E, Helmer C, Patey N, Matuchansky C, Jabri B, Macintyre E, Cerf-Bensussan N, Brousse N, Group FCDS. (2000) Refractory sprue, coeliac disease, and enteropathy-associated T-cell lymphoma. *The Lancet*, 356: 203-208
61. Elfström P, Granath F, Ye W, Ludvigsson JF. (2012) Low risk of gastrointestinal cancer among patients with celiac disease, inflammation, or latent celiac disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 10: 30-36
62. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabo I, Kurppa K, Mearin ML, Ribes-Koninckx C, Shamir R, Troncone R, Auricchio R, Castillejo G, Christensen R, Dolinsek J, Gillett P, Hrobjartsson A, Koltai T, Maki M, Nielsen SM, Popp A, Bucharest, Stordal K, Werkstetter K, Wessels M. (2019) European Society Paediatric

- Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guidelines for Diagnosing Coeliac Disease 2020. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*,
63. Hill ID, Dirks MH, Liptak GS, Colletti RB, Fasano A, Guandalini S, Hoffenberg EJ, Horvath K, Murray JA, Pivor M. (2005) Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 40: 1-19
  64. Meijer JW, Wahab PJ, Mulder CJ. (2003) Small intestinal biopsies in celiac disease: duodenal or jejunal? *Virchows Archiv*, 442: 124-128
  65. Stoven S, Murray JA, Marietta EV. (2013) Latest in vitro and in vivo models of celiac disease. *Expert opinion on drug discovery*, 8: 445-457
  66. Nanayakkara M, Lania G, Maglio M, Auricchio R, De Musis C, Discepolo V, Miele E, Jabri B, Troncone R, Auricchio S. (2018) P31–43, an undigested gliadin peptide, mimics and enhances the innate immune response to viruses and interferes with endocytic trafficking: a role in celiac disease. *Scientific reports*, 8: 1-12
  67. Caputo I, Barone MV, Lepretti M, Martucciello S, Nista I, Troncone R, Auricchio S, Sblattero D, Esposito C. (2010) Celiac anti-tissue transglutaminase antibodies interfere with the uptake of alpha gliadin peptide 31–43 but not of peptide 57–68 by epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1802: 717-727
  68. Sakly W, Thomas V, Quash G, El Alaoui S. (2006) A role for tissue transglutaminase in  $\alpha$ -gliadin peptide cytotoxicity. *Clinical & Experimental Immunology*, 146: 550-558
  69. Lindfors K, Rauhavirta T, Stenman S, Mäki M, Kaukinen K. (2012) In vitro models for gluten toxicity: relevance for celiac disease pathogenesis and development of novel treatment options. *Experimental Biology and Medicine*, 237: 119-125



70. Jelínková L, Tučková L, Cinová J, Flegelová Z, Tlaskalová-Hogenová H. (2004) Gliadin stimulates human monocytes to production of IL-8 and TNF- $\alpha$  through a mechanism involving NF- $\kappa$ B. *FEBS letters*, 571: 81-85
71. Palová-Jelínková L, Rožková D, Pecharová B, Bártová J, Šedivá A, Tlaskalová-Hogenová H, Spíšek R, Tučková L. (2005) Gliadin fragments induce phenotypic and functional maturation of human dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 175: 7038-7045
72. Palová-Jelínková L, Dáňová K, Drašarová H, Dvořák M, Funda DP, Fundová P, Kotrbová-Kozak A, Černá M, Kamanová J, Martin SF. (2013) Pepsin digest of wheat gliadin fraction increases production of IL-1 $\beta$  via TLR4/MyD88/TRIF/MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway and an NLRP3 inflammasome activation. *PLoS One*, 8: e62426
73. Anderson R, Van Heel D, Tye-Din J, Barnardo M, Salio M, Jewell D, Hill A. (2005) T cells in peripheral blood after gluten challenge in coeliac disease. *Gut*, 54: 1217-1223
74. Freire R, Ingano L, Serena G, Cetinbas M, Anselmo A, Sapone A, Sadreyev RI, Fasano A, Senger S. (2019) Human gut derived-organoids provide model to study gluten response and effects of microbiota-derived molecules in celiac disease. *Scientific reports*, 9: 7029
75. Picarelli A, Maiuri L, Frate A, Greco M, Auricchio S, Londei M. (1996) Production of antiendomysial antibodies after in-vitro gliadin challenge of small intestine biopsy samples from patients with coeliac disease. *The Lancet*, 348: 1065-1067
76. Tortora R, Russo I, De Palma GD, Luciani A, Rispo A, Zingone F, Iovino P, Capone P, Ciacci C. (2012) In Vitro Gliadin Challenge: Diagnostic Accuracy and Utility for the Difficult Diagnosis of Celiac Disease. *American Journal of Gastroenterology*, 107: 111-117
77. Marietta E, David C, Murray JA. (2011) Important lessons derived from animal models of celiac disease. *International reviews of immunology*, 30: 197-206

78. Van der Kolk J, Van Putten L, Mulder C, Grinwis G, Reijm M, Butler C, von Blomberg B. (2012) Gluten-dependent antibodies in horses with inflammatory small bowel disease (ISBD). *Veterinary Quarterly*, 32: 3-11
79. Bethune MT, Borda JT, Ribka E, Liu M-X, Phillippi-Falkenstein K, Jandacek RJ, Doxiadis GG, Gray GM, Khosla C, Sestak K. (2008) A non-human primate model for gluten sensitivity. *PLoS One*, 3: e1614
80. German A, Hall E, Day M. (2003) Chronic intestinal inflammation and intestinal disease in dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, 17: 8-20
81. Vandamme TF. (2014) Use of rodents as models of human diseases. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 6: 2
82. Korneychuk N, Meresse B, Cerf-Bensussan N. (2015) Lessons from rodent models in celiac disease. *Mucosal immunology*, 8: 18-28
83. Štěpánková R, Kofronová O, Tucková L, Kozáková H, Cebra JJ, Tlaskalová-Hogenová H. (2003) Experimentally induced gluten enteropathy and protective effect of epidermal growth factor in artificially fed neonatal rats. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 36: 96-104
84. Papista C, Gerakopoulos V, Kourelis A, Sounidaki M, Kontana A, Berthelot L, Moura IC, Monteiro RC, Yiangou M. (2012) Gluten induces coeliac-like disease in sensitised mice involving IgA, CD71 and transglutaminase 2 interactions that are prevented by probiotics. *Laboratory investigation*, 92: 625-635
85. Costes LM, Meresse B, Cerf-Bensussan N, Samsom JN. (2015) The role of animal models in unravelling therapeutic targets in coeliac disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 29: 437-450
86. Kaukinen K, Lindfors K, Mäki M. (2014) Advances in the treatment of coeliac disease: an immunopathogenic perspective. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11: 36-44
87. Niewinski MM. (2008) Advances in celiac disease and gluten-free diet. *Journal of the American Dietetic Association*, 108: 661-672

88. Lohiniemi S. (2001) Tricky to find, hard to treat, impossible to cure. *The Lancet*, 358: S14
89. Ryan BM, Kelleher D. (2000) Refractory celiac disease. *Gastroenterology*, 119: 243-251
90. Veeraraghavan G, Leffler DA, Kaswala DH, Mukherjee R. (2015) Celiac disease 2015 update: new therapies. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 9: 913-927
91. Alhassan E, Yadav A, Kelly CP, Mukherjee R. (2019) Novel nondietary therapies for celiac disease. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 8: 335-345
92. Abu-Zaid A, Alhaddab NT, Alnujaidi RA, Alharbi HA, Alangri F, Alyahyawi N, Kamal A, Altowairqi AK, Alhabeeb H, Almustanyir S. (2020) Larazotide Acetate for Treatment of Celiac Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *medRxiv*,
93. Yoosuf S, Makharia GK. (2019) Evolving therapy for celiac disease. *Frontiers in pediatrics*, 7: 193
94. Béres N, Sziksz E, Vannay Á, Szabó D, Pap D, Veres-Székely A, Arató A, Szabó A, Veres G. (2014) Role of the microbiome in celiac disease. *International Journal of Celiac Disease*, 2: 150-153
95. Cristofori F, Indrio F, Miniello VL, De Angelis M, Francavilla R. (2018) Probiotics in celiac disease. *Nutrients*, 10: 1824
96. Norouzbeigi S, Vahid-Dastjerdi L, Yekta R, Sohrabvandi S, Zendeboodi F, Mortazavian AM. (2020) Celiac therapy by administration of probiotics in food products: a review. *Current Opinion in Food Science*, 32: 58-66
97. Francavilla R, Piccolo M, Francavilla A, Polimeno L, Semeraro F, Cristofori F, Castellaneta S, Barone M, Indrio F, Gobetti M. (2019) Clinical and microbiological effect of a multispecies probiotic supplementation in celiac patients with persistent IBS-type symptoms: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Journal of clinical gastroenterology*, 53: e117

98. Truitt KE, Daveson AJM, Ee HC, Goel G, MacDougall J, Neff K, Anderson RP. (2019) Randomised clinical trial: a placebo-controlled study of subcutaneous or intradermal NEXVAX2, an investigational immunomodulatory peptide therapy for coeliac disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 50: 547-555
99. ImmusanT. (2019) ImmusanT Discontinues Phase 2 Clinical Trial for Nexvax2® in Patients With Celiac Disease. *Globe Newswire*
100. Giacomini P, Zakrzewski M, Jenkins TP, Su X, Al-Hallaf R, Croese J, De Vries S, Grant A, Mitreva M, Loukas A. (2016) Changes in duodenal tissue-associated microbiota following hookworm infection and consecutive gluten challenges in humans with coeliac disease. *Scientific reports*, 6: 1-10
101. Wauters L, Vanuytsel T, Hiele M. (2020) Celiac Disease Remission With Tofacitinib: A Case Report. *Annals of Internal Medicine*, 173: 585
102. Vicari AP, Schoepfer AM, Meresse B, Goffin L, Léger O, Josserand S, Guégan N, Yousefi S, Straumann A, Cerf-Bensussan N. (2017) Discovery and characterization of a novel humanized anti-IL-15 antibody and its relevance for the treatment of refractory celiac disease and eosinophilic esophagitis. In *MAbs* Vol. 9 pp. 927-944, Taylor & Francis
103. Costantino G, Della Torre A, Presti ML, Caruso R, Mazzon E, Fries W. (2008) Treatment of life-threatening type I refractory coeliac disease with long-term infliximab. *Digestive and Liver Disease*, 40: 74-77
104. Siegel M, Bethune MT, Gass J, Ehren J, Xia J, Johannsen A, Stuge TB, Gray GM, Lee PP, Khosla C. (2006) Rational design of combination enzyme therapy for celiac sprue. *Chemistry & biology*, 13: 649-658
105. Kapoerchan VV, Wiesner M, Hillaert U, Drijfhout JW, Overhand M, Alard P, van der Marel GA, Overkleeft HS, Koning F. (2010) Design, synthesis and evaluation of high-affinity binders for the celiac disease associated HLA-DQ2 molecule. *Molecular immunology*, 47: 1091-1097
106. Lorand L, Iismaa SE. (2019) Transglutaminase diseases: from biochemistry to the bedside. *The FASEB Journal*, 33: 3-12

107. Pinet K, McLaughlin KA. (2019) Mechanisms of physiological tissue remodeling in animals: Manipulating tissue, organ, and organism morphology. *Developmental biology*,
108. Wynn TA. (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*, 214: 199-210
109. Wynn TA. (2007) Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest*, 117: 524-529
110. Sziksz E, Veres-Székely A, Pap D, Fekete A, Veres G, Tulassay T, Szabó A, Vannay Á. (2014) Mucosal architectural rearrangement in coeliac disease. *International Journal of Celiac Disease*, 2: 89-92
111. Cox TR, Erler JT. (2011) Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech*, 4: 165-178
112. Rieder F, Brenmoehl J, Leeb S, Scholmerich J, Rogler G. (2007) Wound healing and fibrosis in intestinal disease. *Gut*, 56: 130-139
113. Lawrance IC, Rogler G, Bamias G, Breynaert C, Florholmen J, Pellino G, Reif S, Specia S, Latella G. (2017) Cellular and Molecular Mediators of Intestinal Fibrosis. *J Crohns Colitis*, 11: 1491-1503
114. Roncoroni L, Elli L, Bardella MT, Perrucci G, Ciulla M, Lombardo V, Tomba C, Conte D, Doneda L. (2013) Extracellular matrix proteins and displacement of cultured fibroblasts from duodenal biopsies in celiac patients and controls. In *J Transl Med* Vol. 11 p. 91
115. Roncoroni L, Elli L, Doneda L, Piodi L, Ciulla MM, Paliotti R, Bardella MT. (2009) Isolation and culture of fibroblasts from endoscopic duodenal biopsies of celiac patients. *J Transl Med*, 7: 40
116. Iizuka M, Konno S. (2011) Wound healing of intestinal epithelial cells. *World J Gastroenterol*, 17: 2161-2171
117. de Santa Barbara P, Van Den Brink GR, Roberts DJ. (2003) Development and differentiation of the intestinal epithelium. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60: 1322-1332

118. Allaire JM, Crowley SM, Law HT, Chang S-Y, Ko H-J, Vallance BA. (2018) The intestinal epithelium: central coordinator of mucosal immunity. *Trends in immunology*, 39: 677-696
119. Günther C, Neumann H, Neurath MF, Becker C. (2013) Apoptosis, necrosis and necroptosis: cell death regulation in the intestinal epithelium. *Gut*, 62: 1062-1071
120. Blander JM. (2018) On cell death in the intestinal epithelium and its impact on gut homeostasis. *Current opinion in gastroenterology*, 34: 413
121. Ramachandran A, Madesh M, Balasubramanian KA. (2000) Apoptosis in the intestinal epithelium: its relevance in normal and pathophysiological conditions. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 15: 109-120
122. Schumann M, Siegmund B, Schulzke JD, Fromm M. (2017) Celiac disease: role of the epithelial barrier. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 3: 150-162
123. Ivanov AI, Parkos CA, Nusrat A. (2010) Cytoskeletal regulation of epithelial barrier function during inflammation. *The American journal of pathology*, 177: 512-524
124. Ferretti G, Bacchetti T, Masciangelo S, Saturni L. (2012) Celiac Disease, Inflammation and Oxidative Damage: A Nutrigenetic Approach. In *Nutrients* Vol. 4 pp. 243-257
125. Moretti S, Mrakic-Sposta S, Roncoroni L, Vezzoli A, Dellanoce C, Monguzzi E, Branchi F, Ferretti F, Lombardo V, Doneda L. (2018) Oxidative stress as a biomarker for monitoring treated celiac disease. *Clinical and translational gastroenterology*, 9:
126. Guan G, Lan S. (2018) Implications of antioxidant systems in inflammatory bowel disease. *BioMed research international*, 2018:
127. Koutroubakis IE, Malliaraki N, Dimoulios PD, Karmiris K, Castanas E, Kouroumalis EA. (2004) Decreased total and corrected antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Digestive diseases and sciences*, 49: 1433-1437

128. Kany S, Vollrath JT, Relja B. (2019) Cytokines in inflammatory disease. *International journal of molecular sciences*, 20: 6008
129. Kruidenier La, Verspaget H. (2002) oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease—radicals or ridiculous? *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 16: 1997-2015
130. Vaday GG, Lider O. (2000) Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behavior and inflammation. *Journal of leukocyte biology*, 67: 149-159
131. 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
132. Lemoinne S, Cadoret A, El Mourabit H, Thabut D, Housset C. (2013) Origins and functions of liver myofibroblasts. *Biochim Biophys Acta*, 1832: 948-954
133. Hinz B. (2007) Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol*, 127: 526-537
134. Jun J-I, Lau LF. (2018) Resolution of organ fibrosis. *J Clin Invest*, 128: 97-107
135. Moore-Morris T, Guimarães-Camboa N, Banerjee I, Zambon AC, Kisseleva T, Velayoudon A, Stallcup WB, Gu Y, Dalton ND, Cedenilla M. (2014) Resident fibroblast lineages mediate pressure overload–induced cardiac fibrosis. *J Clin Invest*, 124: 2921-2934
136. Sato Y, Yanagita M. (2017) Resident fibroblasts in the kidney: a major driver of fibrosis and inflammation. *Inflammation and regeneration*, 37: 17
137. Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. (2001) Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell*, 12: 2730-2741
138. Hinz B, Dugina V, Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Chaponnier C. (2003) Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts. *Mol Biol Cell*, 14: 2508-2519

139. McDougall S, Dallon J, Sherratt J, Maini P. (2006) Fibroblast migration and collagen deposition during dermal wound healing: mathematical modelling and clinical implications. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 364: 1385-1405
140. Freitas-Rodriguez S, Folgueras AR, Lopez-Otin C. (2017) The role of matrix metalloproteinases in aging: Tissue remodeling and beyond. Elsevier
141. Wei H, Li B, Sun A, Guo F. (2019) Interleukin-10 Family Cytokines Immunobiology and Structure. In *Structural Immunology* pp. 79-96, Springer
142. Kotenko SV. (2002) The family of IL-10-related cytokines and their receptors: related, but to what extent? *Cytokine Growth Factor Rev*, 13: 223-240
143. Logsdon NJ, Deshpande A, Harris BD, Rajashankar KR, Walter MR. (2012) Structural basis for receptor sharing and activation by interleukin-20 receptor-2 (IL-20R2) binding cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 12704-12709
144. Parrish-Novak J, Xu W, Brender T, Yao L, Jones C, West J, Brandt C, Jelinek L, Madden K, McKernan PA, Foster DC, Jaspers S, Chandrasekher YA. (2002) Interleukins 19, 20, and 24 signal through two distinct receptor complexes. Differences in receptor-ligand interactions mediate unique biological functions. *J Biol Chem*, 277: 47517-47523
145. 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
146. Chen J, Caspi RR, Chong WP. (2018) IL-20 receptor cytokines in autoimmune diseases. *Journal of leukocyte biology*, 104: 953-959
147. 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
148. Leigh T, Scalia RG, Autieri MV. (2020) Resolution of inflammation in immune and nonimmune cells by interleukin-19. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 319: C457-C464
149. Witte E, Kokolakis G, Witte K, Philipp S, Doecke W-D, Babel N, Wittig BM, Warszawska K, Kurek A, Erdmann-Keding M. (2014) IL-19 is a component of



- the pathogenetic IL-23/IL-17 cascade in psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 134: 2757-2767
150. Steinert A, Linas I, Kaya B, Ibrahim M, Schlitzer A, Hruz P, Radulovic K, Terracciano L, Macpherson AJ, Niess JH. (2017) The Stimulation of Macrophages with TLR Ligands Supports Increased IL-19 Expression in Inflammatory Bowel Disease Patients and in Colitis Models. *J Immunol*, 199: 2570-2584
  151. Kragstrup TW, Andersen T, Heftdal LD, Hvid M, Gerwien J, Sivakumar P, Taylor PC, Senolt L, Deleuran B. (2018) The IL-20 cytokine family in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. *Frontiers in immunology*, 9: 2226
  152. Sun D-P, Yeh C-H, So E, Wang L-Y, Wei T-S, Chang M-S, Hsing C-H. (2013) Interleukin (IL)-19 promoted skin wound healing by increasing fibroblast keratinocyte growth factor expression. *Cytokine*, 62: 360-368
  153. Wei C-C, Hsu Y-H, Li H-H, Wang Y-C, Hsieh M-Y, Chen W-Y, Hsing C-H, Chang M-S. (2006) IL-20: biological functions and clinical implications. *Journal of biomedical science*, 13: 601-612
  154. Hsu YH, Li HH, Hsieh MY, Liu MF, Huang KY, Chin LS, Chen PC, Cheng HH, Chang MS. (2006) Function of interleukin-20 as a proinflammatory molecule in rheumatoid and experimental arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 54: 2722-2733
  155. Stenderup K, Rosada C, Worsaae A, Clausen JT, NORMAN DAM T. (2007) Interleukin-20 as a target in psoriasis treatment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1110: 368-381
  156. Stenderup K, Rosada C, Worsaae A, Dagnaes-Hansen F, Steiniche T, Hasselager E, Iversen L, Zahn S, Wöldike H, Lindgreen Holmberg H. (2009) Interleukin-20 plays a critical role in maintenance and development of psoriasis in the human xenograft transplantation model. *British Journal of Dermatology*, 160: 284-296
  157. Chen W-Y, Cheng B-C, Jiang M-J, Hsieh M-Y, Chang M-S. (2006) IL-20 is expressed in atherosclerosis plaques and promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 26: 2090-2095

158. Hsieh M-Y, Chen W-Y, Jiang M-J, Cheng B-C, Huang T-Y, Chang M-S. (2006) Interleukin-20 promotes angiogenesis in a direct and indirect manner. *Genes & Immunity*, 7: 234-242
159. Hsu Y-H, Hsing C-H, Li C-F, Chan C-H, Chang M-C, Yan J-J, Chang M-S. (2012) Anti-IL-20 monoclonal antibody suppresses breast cancer progression and bone osteolysis in murine models. *The Journal of Immunology*, 188: 1981-1991
160. Jiang H, Lin JJ, Su Z, Goldstein N, Fisher P. (1995) Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression. *Oncogene*, 11: 2477
161. Whitaker EL, Filippov VA, Duerksen-Hughes PJ. (2012) Interleukin 24: mechanisms and therapeutic potential of an anti-cancer gene. *Cytokine & growth factor reviews*, 23: 323-331
162. Persaud L, De Jesus D, Brannigan O, Richiez-Paredes M, Huaman J, Alvarado G, Riker L, Mendez G, Dejoie J, Sauane M. (2016) Mechanism of action and applications of interleukin 24 in immunotherapy. *International journal of molecular sciences*, 17: 869
163. Persaud L, Mighty J, Zhong X, Francis A, Mendez M, Muharam H, Redenti SM, Das D, Aktas BH, Sauane M. (2018) IL-24 promotes apoptosis through cAMP-dependent PKA pathways in human breast cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19: 3561
164. Liu H, Chen J, Jiang X, Wang T, Xie X, Hu H, Yu F, Wang X, Fan H. (2016) Apoptotic signal pathways and regulatory mechanisms of cancer cells induced by IL-24. *Wuhan University Journal of Natural Sciences*, 21: 519-530
165. Koks S, Kingo K, Vabrit K, Rätsep R, Karelson M, Silm H, Vasar E. (2005) Possible relations between the polymorphisms of the cytokines IL-19, IL-20 and IL-24 and plaque-type psoriasis. *Genes & Immunity*, 6: 407-415
166. 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

167. 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
168. 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
169. Pap D, Sziksz E, Kiss Z, Rokonay 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
170. 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
171. 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
172. Rao L-Z, Wang Y, Zhang L, Wu G, Zhang L, Wang F-X, Chen L-M, Sun F, Jia S, Zhang S. (2020) IL-24 deficiency protects mice against bleomycin-induced pulmonary fibrosis by repressing IL-4-induced M2 program in macrophages. *Cell Death & Differentiation*, 1-14
173. Chan JR, Blumenschein W, Murphy E, Diveu C, Wiekowski M, Abbondanzo S, Lucian L, Geissler R, Brodie S, Kimball AB. (2006) IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis. *The Journal of experimental medicine*, 203: 2577-2587
174. Wahl C, Müller W, Leithäuser F, Adler G, Oswald F, Reimann J, Schirmbeck R, Seier A, Weiss JM, Prochnow B. (2009) IL-20 receptor 2 signaling down-

- regulates antigen-specific T cell responses. *The Journal of Immunology*, 182: 802-810
175. Myles IA, Fontecilla NM, Valdez PA, Vithayathil PJ, Naik S, Belkaid Y, Ouyang W, Datta SK. (2013) Signaling via the IL-20 receptor inhibits cutaneous production of IL-1 $\beta$  and IL-17A to promote infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature immunology*, 14: 804-811
  176. Kolumam G, Wu X, Lee WP, Hackney JA, Zavala-Solorio J, Gandham V, Danilenko DM, Arora P, Wang X, Ouyang W. (2017) IL-22R ligands IL-20, IL-22, and IL-24 promote wound healing in diabetic db/db mice. *PloS one*, 12: e0170639
  177. Fasano A, Araya M, Bhatnagar S, Cameron D, Catassi C, Dirks M, Mearin M, Ortigosa L, Phillips A. (2008) Federation of International Societies of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition consensus report on celiac disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 47: 214-219
  178. Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25: 402-408
  179. Veres-Székely A, Pap D, Sziksz E, Jávorszky E, Rokony R, Lippai R, Tory K, Fekete A, Tulassay T, Szabó AJ, Vannay Á. (2017) Selective measurement of  $\alpha$  smooth muscle actin: why  $\beta$ -actin can not be used as a housekeeping gene when tissue fibrosis occurs. *BMC Mol Biol*, 18: 12-12
  180. ImageJ - Image Processing and Analysis in Java. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. (2018.01.22)
  181. Verbeke S, Gotteland M, Fernandez M, Bremer J, Rios G, Brunser O. (2002) Basement membrane and connective tissue proteins in intestinal mucosa of patients with coeliac disease. *J Clin Pathol*, 55: 440-445
  182. Azuma YT, Matsuo Y, Nakajima H, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Karow M, Takeuchi T. (2011) Interleukin-19 is a negative regulator of innate immunity and critical for colonic protection. *J Pharmacol Sci*, 115: 105-111

183. Fonseca-Camarillo G, Furuzawa-Carballeda J, Llorente L, Yamamoto-Furusho JK. (2013) IL-10-- and IL-20--expressing epithelial and inflammatory cells are increased in patients with ulcerative colitis. *J Clin Immunol*, 33: 640-648
184. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. (2016) TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol*, 12: 49-62
185. Lee A, Qiao Y, Grigoriev G, Chen J, Park-Min KH, Park SH, Ivashkiv LB, Kalliolias GD. (2013) Tumor necrosis factor alpha induces sustained signaling and a prolonged and unremitting inflammatory response in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*, 65: 928-938
186. Hamilton KE, Simmons JG, Ding S, Van Landeghem L, Lund PK. (2011) Cytokine induction of tumor necrosis factor receptor 2 is mediated by STAT3 in colon cancer cells. *Mol Cancer Res*, 9: 1718-1731
187. Wang M, Tan Z, Zhang R, Kotenko SV, Liang P. (2002) Interleukin 24 (MDA-7/MOB-5) signals through two heterodimeric receptors, IL-22R1/IL-20R2 and IL-20R1/IL-20R2. *J Biol Chem*, 277: 7341-7347
188. Teller IC, Auclair J, Herring E, Gauthier R, Menard D, Beaulieu JF. (2007) Laminins in the developing and adult human small intestine: relation with the functional absorptive unit. *Dev Dyn*, 236: 1980-1990
189. Vachon PH, Durand J, Beaulieu JF. (1993) Basement membrane formation and re-distribution of the beta 1 integrins in a human intestinal co-culture system. *Anat Rec*, 235: 567-576
190. Harris AK, Stopak D, Wild P. (1981) Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature*, 290: 249-251
191. Valerius NH, Stendahl O, Hartwig JH, Stossel TP. (1981) Distribution of actin-binding protein and myosin in polymorphonuclear leukocytes during locomotion and phagocytosis. *Cell*, 24: 195-202
192. Castella LF, Buscemi L, Godbout C, Meister JJ, Hinz B. (2010) A new lock-step mechanism of matrix remodelling based on subcellular contractile events. *J Cell Sci*, 123: 1751-1760

193. Senger S, Sapone A, Fiorentino MR, Mazzearella G, Lauwers GY, Fasano A. (2015) Celiac Disease Histopathology Recapitulates Hedgehog Downregulation, Consistent with Wound Healing Processes Activation. *PLoS One*, 10: e0144634
194. Maga G, Hubscher U. (2003) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci*, 116: 3051-3060
195. Scholzen T, Gerdes J. (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology*, 182: 311-322
196. Bensaad K, Vousden KH. (2007) p53: new roles in metabolism. *Trends in cell biology*, 17: 286-291
197. Liu D, Xu Y. (2011) p53, oxidative stress, and aging. *Antioxidants & redox signaling*, 15: 1669-1678
198. Wei C-L, Wu Q, Vega VB, Chiu KP, Ng P, Zhang T, Shahab A, Yong HC, Fu Y, Weng Z. (2006) A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell*, 124: 207-219
199. 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

## 10 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények

- **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 (*IF*: 5,531)
- Veres-Székely A, Bernáth M, Pap D, **Rokonay R**, Szebeni B, Takács IM, Lippai R, Cseh Á, Szabó AJ, Vannay Á. (2020) PARK7 Diminishes Oxidative Stress-Induced Mucosal Damage in Celiac Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (*IF*: 6,543)

### Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent közlemények

- Szűcs D, Béres NJ, **Rokonay R**, Boros K, Borka K, Kiss Z, Arató A, Szabó AJ, Vannay Á, Sziksz E. (2016) Increased duodenal expression of miR-146a and-155 in pediatric Crohn's disease. *World journal of gastroenterology*, 22: 6027 (*IF*: 3,365)
- Pap D, Sziksz E, Kiss Z, **Rokonay R**, Veres-Székely A, Lippai R, Takács IM, Kis É, Fekete A, Reusz G. (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 and Blood Pressure Research*, 42: 16-32 (*IF*: 3,000)
- Veres-Székely A, Pap D, Sziksz E, Jávorszky E, **Rokonay R**, Lippai R, Tory K, Fekete A, Tulassay T, Szabó AJ. (2017) Selective measurement of  $\alpha$  smooth muscle actin: why  $\beta$ -actin can not be used as a housekeeping gene when tissue fibrosis occurs. *BMC molecular biology*, 18: 1-15 (*IF*: 2,795)
- Pap D, Veres-Székely A, Szebeni B, **Rokonay R**, Ónody A, Lippai R, Takács IM, Tislér A, Kardos M, Oswald F. (2020) Characterization of IL-19, -20, and-24 in acute and chronic kidney diseases reveals a pro-fibrotic role of IL-24. *Journal of translational medicine*, 18: 1-15 (*IF*: 5,531)
- 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 (*IF*: 5,531)
- Lippai R, Veres-Székely A, Sziksz E, Iwakura Y, Pap D, **Rokonay R**, Szebeni B, Lotz G, Béres NJ, Cseh Á. (2021) Immunomodulatory role of Parkinson's disease 7 in inflammatory bowel disease. *Scientific Reports*, 11: 1-14 (*IF*: 4,379)
  - **Rokonay R**, Sziksz E, Lippai R, Pap D, Veres-Székely A, Reusz G, Szabó A, Vannay Á. (2014) A vesefibrózisban szerepet játszó szignalizációs útvonalak. *HYPERTONIA ÉS NEPHROLOGIA* 18: 72-75
  - Pap D, Sziksz E, **Rokonay R**, Ács OD, Szabó A. (2014) D-vitamin szerepe a vesefibrosis patomechanizmusában. *GYERMEKGYÓGYÁSZAT*, 65: 137-139
  - Lippai R, Sziksz E, **Rokonay R**, Pap D, Veres-Székely A, Fekete A, Szabó A, Vannay Á. (2015) Célzott géncsendesítés siRNS interferenciával. *GYERMEKGYÓGYÁSZAT*, 66: 350-351
  - Takács IM, **Rokonay R**, Lippai R, Sziksz E, Szabó A, Vannay Á. (2016) Rekombináns fehérjék előállítására szolgáló expressziós rendszerek. *GYERMEKGYÓGYÁSZAT*, 67: 198-199
  - Takács IM, **Rokonay R**, Pap D, Lippai R, Sziksz E, Fekete A, Szabó A, Vannay Á. (2016) Klinikumban és kutatásban alkalmazott antitestek előállítása. *GYERMEKGYÓGYÁSZAT*, 67: 345-346



## 11 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ennek a munkának az elkészüléséhez vezető hosszú út során számos ember támogatása segített. Nekik szeretném hálámat kifejezni.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Vannay Ádámnak, akinek támogató segítségére, szakmai tanácsaira nem csak Ph.D. hallgatóként eltöltött éveim alatt, de az azt követő évek közös munkája során is mindig számíthattam.

Köszönöm Dr. Szabó Attila professzor úrnak, hogy munkámat az I. számú Gyermekgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumában végezhettem.

Köszönöm kollégáimnak, Dr. Lippai Ritának, Dr. Pap Domonkosnak, Dr. Sziksz Ernának, és Bernáth Máriának, valamint a Kutatólaboratórium összes dolgozójának segítségét és támogatását.

Mérhetetlen hálával tartozom Dr. Veres-Székely Apornak, aki kezdetben kollégaként, barátként, majd idővel férjemként egyengette a doktori fokozatszerzéshez vezető utamat. Az ő segítése, türelme, biztatása nélkül ez a munka nem készülhetett volna el.

Végül, de nem utolsó sorban köszönetet szeretnék mondani családomnak a munkámhoz szükséges támogató háttér biztosításáért.