

**Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola**

**Antivirális és gyulladáscsökkentő hatóanyagok
veszettség elleni hatásának vizsgálata
sejtkultúrában és egérmodellben**

PhD értekezés

dr. Marosi András

2020

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....

Prof. Dr. Bakonyi Tamás

Állatorvostudományi Egyetem

Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

témavezető

Dr. Gyuranecz Miklós

MTA Agrártudományi Kutatóközpont

Állatorvos-tudományi Intézet

témabizottsági tag

Dr. Hornyák Ákos

Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal

Állategészségügyi Diagnosztikai Intézet

témabizottsági tag

Készült 8 példányban. Ez a(z) sz. példány.

.....

dr. Marosi András

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	3
Rövidítések jegyzéke	5
1. Összefoglalás	7
Summary	8
2. Bevezetés	9
2.1. Célkitűzések	10
3. Irodalmi áttekintés	11
3.1. A veszettség vírusa	11
3.1.1. <i>Taxonómia</i>	11
3.1.2. <i>A virion szerkezete</i>	12
3.1.3. <i>A vírus replikációja</i>	13
3.2. A veszettség kórfejlődése	14
3.3. A veszettség immunológiája	15
3.4. A veszettség klinikai tünetei	19
3.5. Veszettség elleni immunizálás és terápiás próbálkozások	20
3.6. A veszettség jelenlegi helyzete és jövőbeli kilátások	22
3.7. I-es típusú interferonok	24
3.8. Ribavirin	25
3.9. Favipiravir	26
3.10. Sorafenib	26
3.11. Infliximab	27
3.12. Caspase-1 gátló (Ac-YVAD-cmk)	27
4. Anyag és módszer	29
4.1. Vizsgálatok laboratóriumi háttere	29
4.2. Sejt kultúrák és sejtenyésztés	29
4.3. Vírustörzsek	30
4.4. Hatóanyagok	30
4.5. <i>In vitro</i> kísérleti szakasz	31
4.5.1. <i>A kísérleti hatóanyagok citotoxicitásának vizsgálata</i>	31
4.5.2. <i>Posztinfekciós antivirális vizsgálatok</i>	31
4.5.3. <i>Fluoreszcens fókusz módszer</i>	33
4.5.4. <i>Reverz transzkripció real-time PCR (qRT-PCR) vizsgálatok (TaqMan)</i>	33
4.5.5. <i>Adatelemzés</i>	34
4.6. <i>In vivo</i> kísérleti szakasz	35
4.6.1. <i>Állatmodell; az állatkísérletek körülményei</i>	35
4.6.2. <i>Az állatok fertőzése és kezelése; a kísérleti protokoll</i>	36
4.6.3. <i>Reverz transzkripció real-time PCR (qRT-PCR) vizsgálatok (SyBR Green)</i>	38
4.6.4. <i>Kórszöveti és immunhisztokémiai vizsgálatok</i>	39

4.6.5.	<i>Fluoreszcens vírusneutralizációs próba (FAVN)</i>	39
4.6.6.	<i>Adatelemzés</i>	40
5.	Eredmények	41
5.1.	<i>In vitro</i> kísérleti szakasz	41
5.1.1.	<i>Citotoxicitás-vizsgálat</i>	41
5.1.2.	<i>Az I-es típusú interferonok antivirális hatása</i>	42
5.1.3.	<i>A ribavirin és a favipiravir antivirális hatása</i>	44
5.1.4.	<i>A sorafenib antivirális hatása</i>	45
5.1.5.	<i>A hatóanyagok antivirális hatásának összehasonlítása</i>	46
5.1.6.	<i>A kísérleti hatóanyagok kombinációinak antivirális hatása</i>	47
5.2.	<i>In vivo</i> kísérleti szakasz	51
5.2.1.	<i>Első egérkísérlet</i>	51
5.2.1.1.	Kórlefolyás és testtömegváltozások.....	51
5.2.1.2.	Túlélés.....	53
5.2.1.3.	Virális RNS mennyisége idegrendszeri mintákban.....	54
5.2.1.4.	Idegrendszeri minták kórszövettani és immunhisztokémiai vizsgálata.....	55
5.2.1.5.	A túlélő egerek szerológiai vizsgálata.....	57
5.2.2.	<i>Második egérkísérlet</i>	57
5.2.2.1.	Kórlefolyás és testtömegváltozások.....	58
5.2.2.2.	Túlélés.....	58
5.2.2.3.	Virális RNS mennyisége idegrendszeri mintákban.....	60
5.2.3.	<i>Harmadik egérkísérlet</i>	61
5.2.3.1.	Kórlefolyás és testtömegváltozások.....	62
5.2.3.2.	Túlélés.....	63
5.2.3.3.	Virális RNS mennyisége idegrendszeri mintákban.....	63
5.2.3.4.	Idegrendszeri minták kórszövettani és immunhisztokémiai vizsgálata.....	64
6.	Megbeszélés	65
6.1.	<i>In vitro</i> kísérleti szakasz	65
6.2.	<i>In vivo</i> kísérleti szakasz	71
7.	Új tudományos eredmények	77
8.	Irodalomjegyzék	78
9.	Tudományos közlemények	97
9.1.	A doktori értekezés témájában, lektorált és impakt faktorral bíró tudományos folyóiratban megjelent közlemények	97
9.2.	A doktori értekezés témájában tartott előadások tudományos konferenciákon	97
9.3.	A doktori értekezés témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények	98
	Köszönetnyilvánítás	99

Rövidítések jegyzéke

Ac-YVAD-cmk	acetil-Tyr-Val-Ala-Asp- klorometilketon	FITC	fluoreszcein izotiocianát
BHK	hörcsögvese sejtvonal (baby hamster kidney)	G	glükoprotein [veszettségvírus]
BSL	biológiai biztonsági szint (biosafety level)	GTP	guanozin-trifosztát
CASP-1	kaszpáz-1 (caspase-1)	HEPA	nagy hatékonyságú részecskeszűrő (high efficiency particulate filter)
CC₅₀	50% citotoxikus koncentráció	HGPRT	hipoxantin-guanin foszforibozil- transzferáz
CrEL	cremophor EL	HRIG	emberi eredetű veszettség elleni ellenanyag (human rabies immunoglobulin)
C_t	küszöbciklus (treshold cycle)	HRSV	humán légzőszervi óriássejtes vírus (human respiratory syncytial virus)
CVS	fixált veszettségvírus törzs (Challenge Virus Standard)	IC₅₀	50% gátló koncentráció (50% inhibitory concentration)
CXCL	CXCL típusú kemokin (C-X-C Motif Chemokine Ligand)	ICTV	Nemzetközi Vírustaxonómiai Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses)
DMEM	sejttenyésztés tápfolyadéka (Dulbecco's modified Eagle's Medium)	IFN	interferon
DMSO	dimetil-szulfoxid	IFNAR	interferon- α / β -receptor
DS	dendritikus sejt	IFNGR	interferon- γ -receptor
EDTA	etilén-diamin-tetraacetát	IHK	immunhisztokémia
ERIG	ló eredetű veszettség elleni ellenanyag (equine rabies immunoglobulin)	IL	interleukin
FAO	Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Világszervezet (Food and Agriculture Organization)	IMPDH	inozin-monofoszfát dehidrogenáz
FasL	Fas receptor ligandja	iNOS	indukálható nitrogén-oxid szintáz (inducible nitric oxide synthase)
FAVN	fluoreszcens vírusneutralizációs próba (fluorescent antibody virus neutralization test)	IPS-1	interferon- β promoter stimulator-1
FBS	fötális borjúsavó (fetal bovine serum)	IRF-3	type-I interferon regulatory factor-3
FFA	fluoreszcens fókusz módszer (fluorescent focus assay)	IU	nemzetközi egység (international unit)
		KIR	központi idegrendszer
		L	RNS-dependes RNS polimeráz (large protein) [veszettségvírus]

LD₅₀	50% halálos dózis (lethal dose 50)	RABV	veszettségvírus (rabies virus)
M	mátrixprotein [veszettségvírus]	RdRp	RNS-dependes RNS polimeráz
MAPK	mitogén-aktivált protein-kináz (mitogen activated protein kinase)	RIG-1	retinsav-indukált gén-1 (retinoic acid inducible gene-1)
MERS	Közép-keleti légzőszervi szindróma (Middle-East respiratory syndrome)	RNP	ribonukleoprotein
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex (major histocompatibility complex)	RNS	ribonukleinsav
MOI	a sejtszámhoz viszonyított vírudózis (multiplicity of infection)	SARS	súlyos akut légzőszervi szindróma (severe acute respiratory syndrome)
Mph	makrofág	SD	szórás (standard deviation)
N	nukleoprotein [veszettségvírus]	SEM	az átlag standard hibája (standard error of mean)
N2a	egér neuroblastoma sejtvonal (Neuro-2a)	SHBRV	őszes denevérből izolált veszettségvírus (silver-haired bat rabies virus)
nAChR	nikotinos acetilkolin receptor	SPF	meghatározott kórokozótól mentes (specified pathogen free)
NCAM	idegsejt adhéziós molekula (neuronal cell adhesion molecule)	STAT	jelátvivő és transzkripciót aktiváló molekula (signal transducer and activator of transcription)
NF-κB	nuclear factor kappa B	Tc	citotoxikus T sejt
NK	természetes ölősejt (natural killer cell)	TCID₅₀	50% sejtenyészetet fertőző dózis (tissue culture infectious dose 50)
OIE	Nemzetközi Állatjárványügyi Hivatal (World Organisation for Animal Health)	Th	helper T sejt
P	foszfoprotein [veszettségvírus]	TLR	toll-like receptor
p75NTR	p75 neurotropin receptor	TNF	tumor nekrosis faktor
PBS	foszfáttal pufferelt sóoldat (phosphate-buffered saline)	VEGFR	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor (vascular endothelial growth factor receptor)
PDGFR	vérlemezké eredetű növekedési faktor receptor (platelet-derived growth factor receptor)	VSV	fertőző hólyagos szájgyulladás vírusa (vesicular stomatitis virus)
PEP	posztexpozíciós profilaxis	WHO	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)
PrEP	pre-expozíciós profilaxis	wt	vad-típusú [vírus] (wild-type)
qRT-PCR	kvantitatív reverz transzkripció (real-time) polimeráz láncreakció		

1. Összefoglalás

A veszettség vírusa okozta halálos agy- és gerincvelőgyulladás vakcinázással megelőzhető állatokban és emberben egyaránt. A zoonotikus betegség egyedülálló kórfejlődése, és a vírus bejutását követő hosszú lappangási idő azt is lehetővé teszi, hogy a megfertőződött személyek időben elkezdett posztexpozíciós immunizálásával megelőzhető legyen a tünetek kialakulása. A veszettség klinikai manifesztációja esetén azonban jelenleg nem ismerünk olyan terápiás eljárást, amely a halálos kimenetelt elkerülhetővé teszi. Bár Földünk több régiója mentes a humán esetek nagy többségéért felelős urbánus veszettségtől, számos endémiás terület van (főként a szubszaharai Afrika és Dél-Ázsia területén), ahol évente több tízezer emberi áldozatot követel a betegség. Nemzetközi együttműködésben megvalósult kutatómunkánk célja ezért a veszettség okozta agyvelőgyulladás gyógykezelésében használható új lehetőségek keresése és vizsgálata volt. Sejtenyészeten és állatkísérletekben elemeztük különböző hatóanyagok és kombinációs kezelések hatását a vírusreplikációra, illetve a betegség kórlefolására és a túlélésre.

Kísérleteink első szakaszában egér neuroblastoma sejteket fertőzünk veszettségvírussal, majd többféle antivirális szer (I-es típusú interferonok, ribavirin, favipiravir, sorafenib) és azok kombinációinak vírusszaporodásra gyakorolt hatását vizsgáltuk a sejtek fertőzöttségi arányának, a kibocsájtott utódvirionok mennyiségének és a vírusspecifikus nukleinsavak kópiaszámának mérésével. Kimutattuk, hogy mindegyik vizsgált hatóanyag koncentrációfüggő módon gátolja a vírus replikációját. A sorafenib és az IFN- β vírusellenes aktivitása bizonyult a legerősebbnek, amelyet a ribavirin, az IFN- α és a favipiravir gátlóhatása követett. Az IFN- β kombinációja sorafenibbel, ribavirinnel vagy favipiravirral fokozta az antivirális hatást, míg a ribavirin, favipiravir és sorafenib egymás közötti kombinációi antagonizmust mutattak.

A gyulladáshoz vezető folyamatok szerepe a veszettség kórfejlődésében rendkívül összetett, azonban bizonyított, hogy a túlzott gyulladáshoz vezető válasz – főleg a tömeges agyi vírusszaporodás idején – hozzájárul a betegség progressziójához. Állatkísérleteinkben egyes gyulladáshoz vezető utakat (mitogén-aktivált protein kináz, caspase-1) és citokineket (tumor nekrosis faktor- α) gátló hatóanyagok kombinációjával növeltük veszettségvírussal fertőzött egerek túlélési arányát. Eredményeinket szakirodalmi adatokkal összevetve arra a következtetésre jutottunk, hogy a fokozott túlélés hátterében a központi idegrendszerben fellépő késői gyulladáshoz vezető hullám enyhítése állhat. A gyulladáscsökkentő terápiát veszettség-specifikus ellenanyagokkal kombinálva még kifejezettebb védőhatást értünk el, ami felülmúlta az ellenanyagok önálló hatását. Vizsgálataink rámutatnak, hogy a veszettség terápiaiban jó megközelítés a gyulladáscsökkentő kombinációs kezelés, és eredményeink értékes adatokkal szolgálhatnak humán esetekben használható jövőbeli terápiás módszerek kidolgozásához.

Summary

Rabies encephalomyelitis can be prevented via vaccines both in animals and humans. This zoonotic disease has a unique pathogenesis and long incubation time between the exposure to the virus and the onset of clinical signs, which provides opportunity to prevent the development of an overt disease via post-exposure vaccination. Nevertheless, there is no therapeutic method available to avoid lethal consequences of clinical rabies. Although urban rabies that is responsible for the vast majority of human cases is absent from certain regions of the globe, there are numerous (mainly African and Asian) endemic countries with tens of thousands of annual casualties due to rabies. The aim of our international collaborative research program was to identify and analyse novel targets and options that can contribute to treatment of human rabies encephalitis. *In vitro* studies in cell culture and *in vivo* studies in murine model were conducted to reveal the effect of various compounds and combination treatments on viral replication, as well as on the pathogenesis of the disease and survival.

In the first phase of experiments mouse neuroblastoma cell cultures were infected with rabies virus strain CVS-11 followed by treatment with antivirals (type-I interferons, ribavirin, favipiravir, sorafenib) and their respective combinations. The effect of the compounds and combinations on viral replication was assessed by determining the ratio of infected cells, the quantity of progeny virions and viral RNA loads. All tested compounds inhibited the multiplication of rabies virus in a concentration-dependent manner. The greatest reduction of viral replication was caused by sorafenib and IFN- β , followed by ribavirin, IFN- α and favipiravir. The combination of IFN- β with sorafenib, ribavirin or favipiravir enhanced the antiviral effect, but any pairwise combination of ribavirin, favipiravir and sorafenib showed clear antagonism.

While the role of inflammation in rabies pathogenesis is highly complex, it is obvious that excessive inflammatory response to the rapid spreading of the virus in the central nervous system has a detrimental impact on the course of the disease. In our *in vivo* studies, survival of rabies-infected mice was enhanced using the combination of inhibitors of pro-inflammatory signalling pathways (mitogen-activated protein kinase, caspase 1) and cytokines (tumour necrosis factor- α). In the context of literature data, our results suggest that the increase in survival function was achieved by the mitigation of late inflammatory response in the central nervous system. Combining the anti-inflammatory therapy with rabies-specific antibodies provided further protection against mortality, which outmatched the effect of monotherapy with antibodies. The results highlight that combination treatment with anti-inflammatory agents is a promising approach in the therapy of rabies. Furthermore, our studies provide valuable data about therapeutic intervention in rabies and thus might contribute to the development of a successful future human treatment regimen.

2. Bevezetés

A veszettség vírus okozta, halálos agy- és gerincvelőgyulladásal járó betegség. Első leírásai az ókorból maradtak fenn, így az egyik legrégebb óta ismert fertőző betegség (Jackson és Wunner, 2007). A veszettség zoonózis; fertőzött állatok nyála közvetítésével, harapással terjed emberre és más állatokra. Különleges tulajdonságai a veszettség vírusát az egyik legveszélyesebb kórokozóvá teszik: gazdaspektruma rendkívül széles (az összes melegvérű állat és az ember is fogékony), világszerte elterjedt (minden lakott kontinensen előfordul, de vannak mentes országok), és letalitása egyedülállóan magas (emlősökben a klinikai tünetek megjelenése esetén közel 100%). Hatalmas áttörést jelentett a veszettség elleni vakcina kifejlesztése, amely Louis Pasteur nevéhez fűződik, és amellyel elsőként 1885-ben sikerült megmenteni egy veszett kutya által megmart kisfiút, Joseph Meistert a biztos haláltól. Nem sokkal később Magyarországon Hőgyes Endre is elévülhetetlen érdemeket szerzett az oltóanyag továbbfejlesztésében. Napjainkban már számos különböző típusú, hatékony vakcina áll rendelkezésre a veszettség elleni preventív és posztexpozíciós oltásokhoz.

A kutyák tömeges vakcinázását a világon elsőként Aujeszky Aladár szervezte meg, ami az urbánus (városi) veszettség megszűnéséhez vezetett hazánkban. Az urbánus ciklust Európában és Észak-Amerikában, valamint Dél-Amerika egyes területein mára felszámolták, Ázsia és Afrika legtöbb országában azonban továbbra is endémiás. A kóbor kutyák által fenntartott urbánus veszettség felelős a humán esetek több mint 99 százalékáért. Évente 50-70 ezer közötti halálozást jelentenek be, de az esetek valós száma az évi 150 ezret is meghaladhatja (Rupprecht és mtsai, 2017).

A veszettség másik terjedési módja a szilvatikus ciklus, amelyet vadon élő húsevők – róka, farkas, aranyakál, mosómedve, borz stb. – tartanak fenn. A rezervoár fajok orális immunizálásával Európában és Kanadában napjainkra a szilvatikus veszettséget is sikerült jelentősen visszaszorítani, egyes területeken eradikálni. A denevérek veszettsége, speciális jellemzői miatt különálló járványtani formának tekinthető.

A veszettség közegészségügyi jelentősége Európában és Észak-Amerikában az urbánus ciklus felszámolásával és a szilvatikus ciklus erőteljes visszaszorításával lényegesen csökkent. Ennek megfelelően a nyugati világban a tudományos érdeklődés a közelmúltban elsősorban a rezervoár fajokban cirkuláló vírustörzsek elterjedtségére és genetikai jellemzőire, a denevérvészesség epidemiológiájára és monitoringjára, és az importált humán esetek vizsgálatára fókuszált. Földünk más térségeiben azonban – ezzel egyidőben – emberek tízezrei halnak meg minden évben veszettség következtében. Hiába igaz ugyanis, hogy megfelelő intézkedésekkel (kutyák populációjának kontrollja és immunizálása, a lakosság preventív és posztexpozíciós vakcinázása, felvilágosítása, közegészségügyi hálózat

fejlesztése) a humán esetek közel 100%-ban megelőzhetők, az endémiás területeken anyagi és társadalmi korlátozó tényezők miatt a veszettség elleni küzdelem igen lassan halad. A fejlett és fejlődő országok helyzetében fennálló kettősség miatt a veszettséget egyre gyakrabban sorolják az „elhanyagolt trópusi betegségek” (neglected tropical disease) közé.

A zoonotikus kórokozók elleni küzdelemben az állat- és közegészségügy összehangolt fellépésére van szükség. Ez az ún. „One Health” szemléletmód egyre nagyobb figyelmet kap a veszettség elleni védekezés területén is. Az elmúlt évtizedben korábban nem látott összefogás alakult ki a kutya-közvetítette emberi veszettség globális megszüntetése érdekében. A célkitűzés nyomán különböző szakterületeket érintő új akciótervek, kutatási programok indultak el. Az egyik ilyen kezdeményezés – amely 7 európai ország 9 kutatócsoportjának együttműködésével alakult – az ASKLEPIOS nevet kapta (Advanced Studies towards Knowledge on Lyssavirus Encephalitis Pathogenesis Improving Options for Survival). Ez az Európai Unió által támogatott (FP7) kutatási projekt a humán veszettség terápiás lehetőségeinek keresését és vizsgálatát tűzte ki célul, a betegség kórfejlődését érintő legújabb ismeretekre alapozva. A veszettség halálos áldozatainak magas számában ugyanis komoly szerepe van annak, hogy a már kialakult tünetekkel járó betegség kezelésére nincs megbízható módszer, így a halálos kimenetel elkerülhetetlen. Bár egy önmagában teljes gyógyulást eredményező terápia kifejlesztésének esélye csekély, bármely sikeres eljárás, ami a kórlefolyást érdemben lelassítja, életet menthet a posztexpozíciós profilaxis időablakának kiterjesztésével. A túlélés biztosítása mellett a visszamaradó idegrendszeri károsodások csökkentése is fontos feladata lenne egy hatékony kezelési módszernek. Az ASKLEPIOS projekt konzorciumának tagja volt kutatócsoportunk is; a jelen értekezés alapját képező vizsgálatok a program keretében valósultak meg.

2.1. Célkitűzések

Kutatómunkánk fő célja olyan hatóanyagok és kombinációs kezelések keresése és vizsgálata volt, amelyek hatásosak lehetnek a veszettség okozta agyvelőgyulladás gyógykezelésében.

Munkánk első szakaszában a veszettségvírus szaporodását igazoltan vagy vélhetően gátló szerek hatását kívántuk tanulmányozni sejttenyészetben. Fontos célunk volt, hogy az önálló hatóanyagok mellett azok kombinációinak vírusellenes hatását is elemezzük.

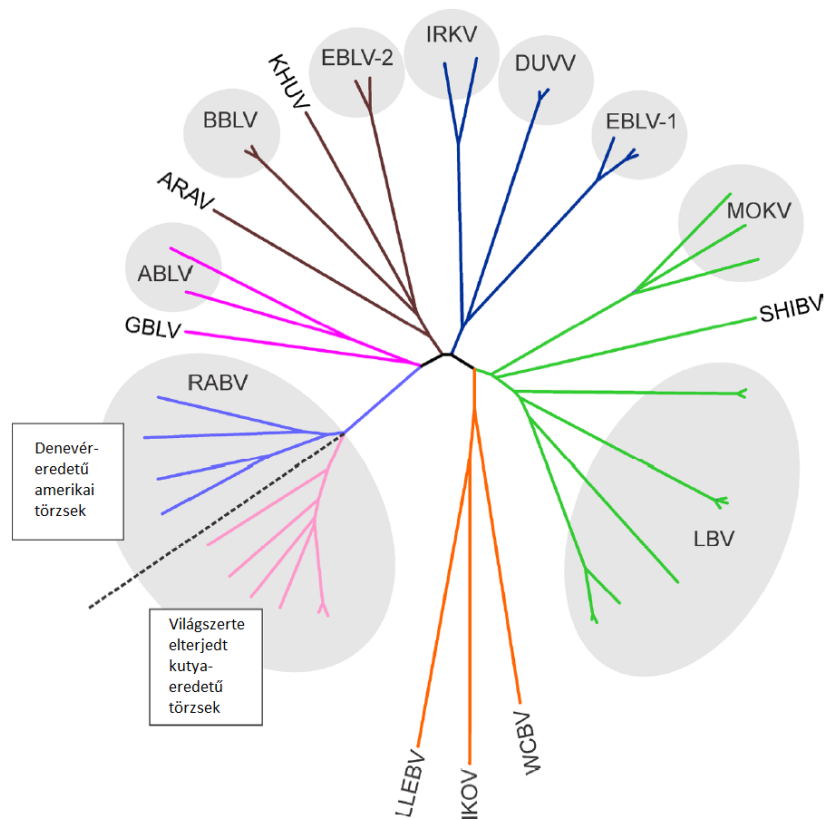
A második szakaszban a célunk az volt, hogy veszettségvírussal fertőzött egereken vizsgáljuk meg különböző kombinációs kezelések hatását a túlélésre. Az állatkísérletekben elsősorban a gazdaszervezet fertőzésre adott káros válaszreakciójának csökkentésével kívántuk megelőzni az állatok elhullását, az idegrendszerben fellépő túlzott gyulladást gátló hatóanyagokkal. Célul tűztük ki, hogy az ígéretes eredményt nyújtó gyulladáscsökkentő és antivirális szerek együttes használatával a leghatékonyabb terápiás kombinációt alakítsuk ki.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A veszettség vírusa

3.1.1. Taxonómia

A veszettség vírusa a nem szegmentált, negatív irányú egyszálú RNS genomú vírusokat tartalmazó *Mononegavirales* rendbe tartozik, ezen belül a *Rhabdoviridae* család *Lyssavirus* nemzetségének tagja. A Nemzetközi Vírustaxonómiai Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) 2018-ban új alapokra helyezte az RNS vírusok rendszerezését (Walker és mtsai, 2019), ez alapján a *Mononegavirales* rend jelenleg érvényes rendszertani besorolása a következő: *Riboviria* (birodalom/realm), *Negarnaviricota* (törzs), *Haploviricotina* (altörzs), *Monjiviricetes* (osztály). A *Lyssavirus* genusba a típusfajon, a veszettségvíruson (*Rabies lyssavirus*, RABV) kívül 15 további vírusfajt (genotípust) sorolnak (1. ábra).

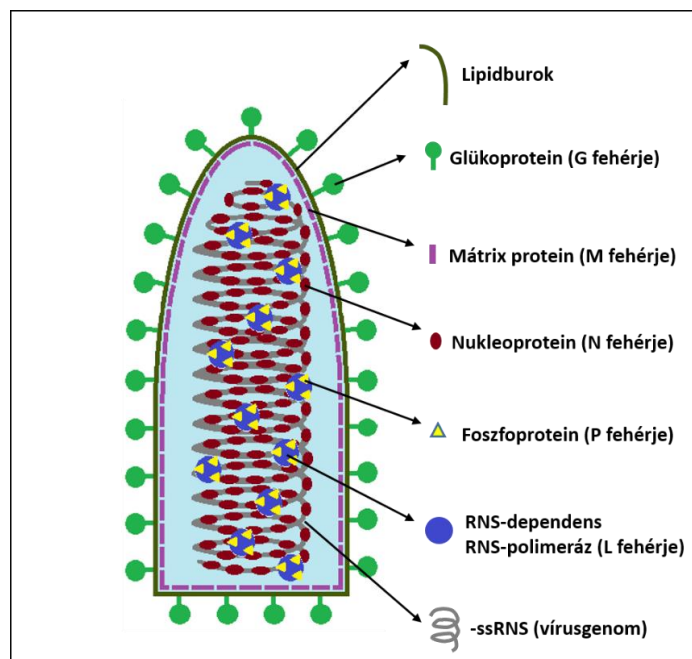


1. ábra: Az eddig leírt *Lyssavirus* genotípusok gyökértelen filogenetikai ábrája. ARAV: *Aravan lyssavirus*, ABLV: *Australian bat lyssavirus*, BBLV: *Bokeloh bat lyssavirus*, DUVV: *Duvenhage lyssavirus*, EBLV-1: *European bat 1 lyssavirus*, EBLV-2: *European bat 2 lyssavirus*, GBLV: *Gannoruwa bat lyssavirus*, IKOV: *Ikoma lyssavirus*, IRKV: *Irkut lyssavirus*, KHUV: *Khujund lyssavirus*, LBV: *Lagos bat lyssavirus*, LLEBV: *Lleida bat lyssavirus*, MOKV: *Mokola lyssavirus*, RABV: *Rabies lyssavirus*, SHIBV: *Shimoni bat lyssavirus*, WCBV: *West Caucasian bat lyssavirus*.
Rózsaszín, kék és barna ágak: I. filogenetikai csoport; zöld ágak: II. filogenetikai csoport; narancssárga ágak: III./IV. filogenetikai csoport. Forrás: Rupprecht és mtsai, 2017

Az elmúlt évtizedek során a fokozódó tudományos érdeklődés és intenzívebb monitoring hatására egyre több genotípust fedeztek fel, jelenleg is vannak hivatalos elfogadásra váró, újonnan leírt vírusok (Nokireki és mtsai, 2018; Hu és mtsai, 2018). A lyssavírusok eredeti gazdái a denevérek, ennek megfelelően a RABV-n kívüli egyéb genotípusok túlnyomó többségét (kivéve a MOKV-t és az IKOV-t) denevérekből izolálták, és kizárólag az Óvilágban fordulnak elő. Az amerikai kontinensen a denevérekben ezzel szemben csak a RABV fordul elő, holott a Föld egyéb területein ez a vírusfaj nincs jelen a denevérekben (Rupprecht és mtsai, 2017). A RABV – ellentétben a többi genotípussal – világszerte elterjedt, fenntartói különféle ragadozó emlősök (és Amerikában denevérek), de bármely szárazföldi emlőst (ritkábban madarakat is) megfertőzhet. A lyssavírusokat két filogenetikai csoportba sorolják a nukleoprotein gén szekvenciája alapján; a csoportokon belül szerológiai keresztreakció és keresztvédelem figyelhető meg. Az I-es filogenetikai csoport tagjai a RABV, EBLV-1 és -2, ABLV, DUVV, KHUV, ARAV, IRKV, BBLV, GBLV vírusok, a II-es számúba a LBV, MOKV és SHIBV tartozik, míg az IKOV, LLEBV és a WCBV nem besorolt fajoknak számítanak, amelyeket egyesek III-as vagy IV-es filogenetikai csoport sorolnak (Shiplely és mtsai, 2019).

3.1.2. A virion szerkezete

A veszettségvírus virionja lövedék alakú, hossza 130-250 nm, átmérője pedig 60-110 nm. Replikációja során nagy számban keletkeznek kisebb méretű és eltérő morfológiájú defektív partikulák, amelyek autointerferenciát okozva csökkentik a vírusszaporodás hatékonyságát (Jackson és Wunner, 2007). A virion központi részét a ribonukleoprotein (RNP) komplex (nukleokapszid) képezi: ezt a helikálisan feltekeredett vírusgenom és a hozzá szorosan kapcsolódó nukleoprotein (N fehérje) alkotja (2. ábra).



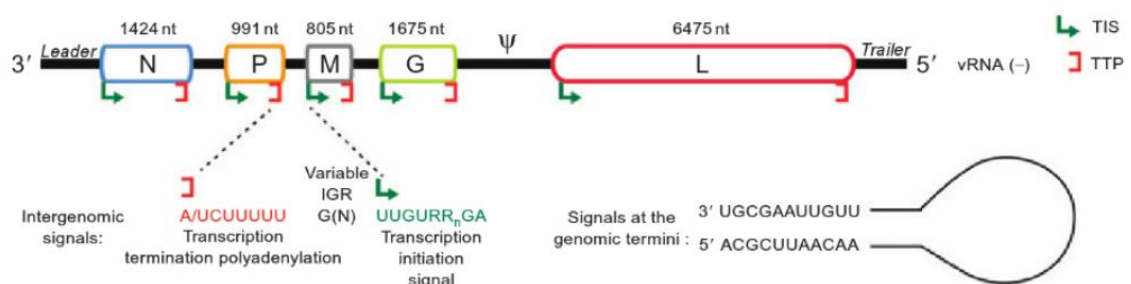
2. ábra: A veszettségvírus szerkezete és fehérjei (saját ábra)

Két másik szerkezeti fehérje, az RNS-dependens RNS polimeráz (L fehérje; large protein) és a foszfoprotein (P fehérje) az RNP-be beágyazva található meg. A viriont lipidburok veszi körül, amelyet a mátrixfehérjék (M fehérje) rétege kapcsol a nukleokapszidhoz. A gazdasejt eredetű burokba kb. 400 glükoprotein peplomer (G fehérje) ágyazódik. Ezek a transzmembrán fehérjék három doménből állnak, a külső domén tűskeszerű kitüremkedéseket képez a burkon (Jackson, 2011; Fooks és mtsai, 2014).

3.1.3. A vírus replikációja

A RABV három különböző sejtfelszíni receptorhoz kötődhet: a nAChR (nikotinos acetilkolin-receptor), az NCAM (neuronal cell adhesion molecule) és a p75NTR (p75 neurotrophin) receptorokhoz (Lafon, 2005; Thoulouze és mtsai, 1998; Tuffereau és mtsai, 1998). Az adszorpciót követően a vírus pinocitózissal jut be a gazdasejtekbe, chlatrin-burkos vezikulába zárva (Piccinotti és Whelan, 2016), majd a RABV lipidburka a G fehérje által vezérelt pH-függő folyamat során fuzionál az endoszóma membránjával (Roche és Gaudin, 2004). Ezáltal az RNP komplex a citoplazmába jut, és megkezdődhet az eklipszis folyamata.

Az RNS-dependens RNS polimeráz (RdRp) enzimkomplex – amely egy L (aktív centrum) és 3 P (kofaktor) fehérjéből áll (Fooks és mtsai, 2017) – végzi a transzkripció és a replikáció feladatát is. A transzkripció során az RdRp a vírusgenom 3' végéhez kapcsolódik, és az itt található nem kódoló szakasz (leader szekvencia) átírásával rövid, szabályozó szerepű leader RNS-t (leRNS) szintetizál. Az egyes fehérjéket kódoló gének – rövid intergénikus szakaszokkal elválasztva – az 5' vég felé haladva a következő sorrendben helyezkednek el a genomban: N, P, M, G, L (3. ábra).



3. ábra: A veszettségvírus genomja. TIS: transzkripció iniciációs szignál; TTP: transzkripció terminációs és poliadenilációs szignál. IGR: intergénikus régió. Forrás: Jackson, 2011.

Az RdRp a génekről monocisztronos, szubgenomiális transzkripteket hoz létre, és az így létrejött mRNS-eket 5' metilált sapkával és poliadenilát farokkal látja el, hogy a riboszómákhoz kötődhessenek. A különböző vírusfehérjék mRNS-ei koncentráció-gradiens szerint képződnek a genomban való pozíciójuk alapján (legtöbb az N-ből, legkevesebb az L-ből szintetizálódik), mert az enzim bármely gén terminációs szignáljánál leválhat a genomról, hogy a 3' végen

újratekerczje a másolást (Knowles, 2011). Az N, P, M és L fehérjék transzlációja a citoplazmában, szabad riboszómákön zajlik. A glükoprotein szintézise a szekretoros útvonalat követi: a durvafelszínű endoplazmatikus retikulum felületén lévő riboszómákön képződött fehérje a Golgi-készülékben glikozilálódik, végül homotrimereket képezve a citoplazma-membránba integrálódik (Schnell és mtsai, 2010).

Idővel, ahogy egyre nagyobb mennyiségű N (Zhang és mtsai, 2017) és M (Finke és mtsai, 2003) fehérje halmozódik fel, az RdRp replikáz módra vált. A replikáció során az RdRp figyelmen kívül hagyja a terminációs szignálokat, és teljes hosszúságú komplementer szálat épít a genomiális RNS-hez. A folyamat során szintetizálódott pozitív szálak templátként szolgálnak a negatív irányú RNS-ek képződéséhez, amelyek végül az utódvirionokba kerülnek. Az új genom-másolatokat az N fehérjék burkolják be, valamint az L és P fehérjék is beépülnek, létrehozva az új RNP komplexeket.

Az új virionok összeépülését és sejtől való kiszabadulását a mátrixfehérje szabályozza: a vírusszaporodás során keletkező citoplazma-zárványokban, a Negri-testekben felhalmozódó M fehérjék oligomerizálódnak, majd a citoplazmamembránhoz vándorolnak, kijelölve a bimbózás helyét (ezen a területen épülnek be a glükoprotein peplomerek is). Az elkészült nukleokapszidok az érintett területen kitüremkedést képeznek a membránon, amely lefűződve az új vírusrészecske burkát alkotja (Finke és Conzelmann, 2003; Pollin és mtsai, 2013).

3.2. A veszettség kórfejlődése

Az esetek túlnyomó részében veszett állatok harapása okozza az emberek és állatok fertőződését egyaránt. A vírus a fertőzött nyállal jut be a bőr barrier alá, annak folytonossági hiányán keresztül. Ehhez akár felületes, karcolás szintű bőrsérülés is elegendő (Messenger és mtsai, 2002). Emberek esetében kivételesen szervtranszplantáció (Srinivasan és mtsai, 2005; Maier és mtsai, 2010), valamint vírustartalmú aeroszol belélegzése is okozhat fertőzést barlangokban, illetve laboratóriumi munka során (Johnson és mtsai, 2006a).

Az expozíciót követően az izomszövetben lassú replikáció indul meg; az újonnan képződő virionok a motoros véglemezek közelében halmozódnak fel, ahonnan a preszinaptikus membránon át belépnek az idegvégződésekre (Fooks és mtsai, 2017). Nagy mennyiségű fertőzőképes RABV bejutása esetén a lassú helyi szaporodás fázisa kimaradhat (Lafon, 2005; Jackson, 2003), valamint a motoros idegvégzödések mellett a területet ellátó érzőidegek is felvehetik a vírust (Velandia-Romero és mtsai, 2013). Kimutatták, hogy bizonyos esetekben az expozíció helyén jelen lévő dendritikus sejtek is fertőződhetnek, amelyek eljuttathatják a RABV-t az idegrendszerbe (Senba és mtsai, 2013). A perifériás idegrostokba való bejutást követően elindul a vírus retrográd, centripetális terjedése a gerincvelő, majd az agy irányába.

Az axonális transzportfolyamatot a mikrotubulus-rendszer dynein motorfehérjéi biztosítják (Klingen és mtsai, 2008), vagy egy gyorsabb alternatív módon, a p75NTR receptorfehérje köti meg a RABV glükoproteinjét és továbbítja a neuron sejttestje felé (Gluska és mtsai, 2014). Ha a vírus az érző idegvégződésbe jut be, a központi idegrendszerbe (KIR) való eljutást anterográd transzportfolyamatok végzik. Ennek során a RABV először a spinális ganglionokban szaporodik el, mielőtt folytatná útját a központba (Bauer és mtsai, 2014; Zampieri és mtsai, 2014).

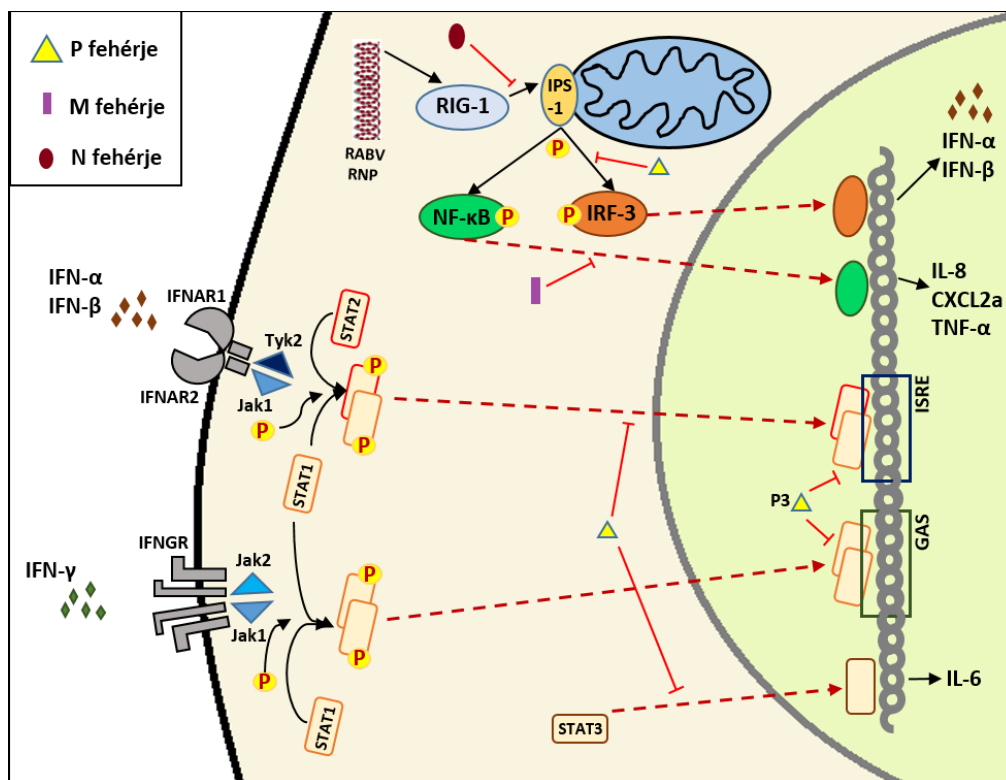
A KIR-be érve a vírusreplikáció jelentősen felgyorsul. A fertőzött neuronokból a dendriteknél, a posztszinaptikus membránon keresztül lépnek ki az újonnan szintetizálódott virionok, és fertőzik a kapcsolódó idegsejteket, így a RABV szinaptikusan terjed, és eléri a legtöbb agyterületet (Begeman és mtsai, 2018). A gyors agyi multiplikáció mellett megindul a centrifugális terjedés: ennek során a vírus az idegek mentén haladva szóródik a szervezetben. A legfontosabb célszervek a vírusürítésért felelős nyálmirigyek: a mirigyhámsejtek fertőződnek, és a virionok az apikális membránon bimbózva ürülnek az acinus lumenébe (Dietzschold és mtsai, 2008). A szaruhártyába és egyes bőrterületekre (pl. a tarkó bőre) szintén gyakran eljut a vírus, valamint idővel több parenchymás szervben is megjelenik (Jackson és Wunner, 2007). A leszálló fertőzés miatt gyulladás alakul ki a spinális ganglionokban, ami az átkapcsolódó érzőidegek ellátási területén viszketést és paraesthesiát okoz. Ezek az emberi veszettség korai tünetei közé tartoznak (Fooks és mtsai, 2017).

3.3. A veszettség immunológiája

A veszettség magas letalitásáért elsősorban az immunválasz elégtelensége felelős. A különleges kórfejlődés (neurotropizmus) egyrészt megnehezíti az immunrendszer feladatát a fertőzés elleni védekezésben: a tömeges vírusszaporodás a KIR-ben, a vér-agy gát által védetten zajlik. Másrészt a RABV az eredeti gazdáival, a denevérekkel történt hosszú koevolúció során különleges, sokféle molekuláris mechanizmus által biztosított immun-elkerülő funkciókat fejlesztett ki (Rupprecht és mtsai, 2017). Az öt vírusfehérje majdnem mindegyike (az L fehérjét kivéve) immunmodulátor hatású; a veszettség és adaptív immunválasz kulcsfontosságú pontjain avatkoznak közbe, megzavarva az immunfolyamatokat (Katz és mtsai, 2017).

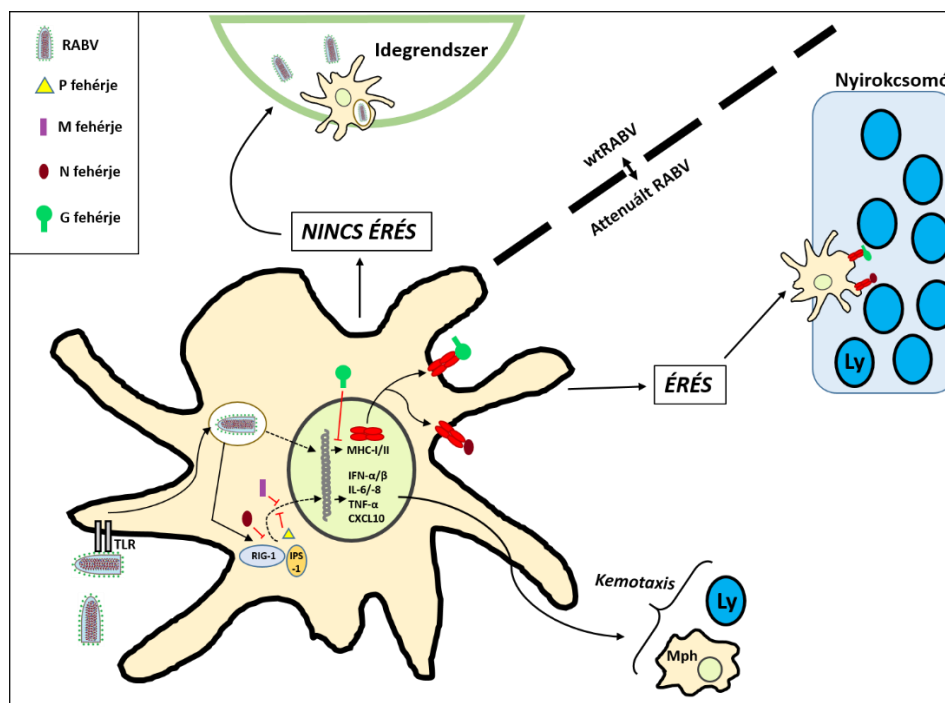
A vírusellenes védekezés első vonala a nem specifikus immunrendszer azonnali reakciója a periférián. Attenuált RABV törzsek fertőzésekor ez a reakció megakadályozhatja vagy késleltetheti a vírus bejutását a KIR-be. Az expozíció helyén a makrofágok (Mph) és dendritikus sejtek (DS) mintafelismerő receptoraikkal (TLR: toll-like receptor; RIG-1: retinoic acid inducible gene-1 protein) azonosítják a virális mintázatokat, és interferonokat (IFN), valamint egyéb citokineket és kemokineket termelnek (Miao és mtsai, 2017). Ezt követően

további immunsejtek érkezik a helyszínre, és az antigén-prezentáló sejtek (Mph és DS) aktiválják a naiv limfocitákat a regionális nyirokcsomóban (Li és mtsai, 2008). A vad-típusú (wt) veszettségvírusok azonban elkerülik az említett immunfolyamatokat (**4. ábra**). A nukleoprotein gátolja a RIG-1 aktivációját és ezzel a negatív szálú virális RNS intracelluláris felismerését (Masatani és mtsai, 2010). Az interferon-szintézist és -jelátvitelt a foszfoprotein három ponton akadályozza: 1) gátolja az IRF-3 (type-I interferon regulatory factor-3) foszforilációját, ezáltal az I-es típusú IFN-termelődés zavart szenved (Brzózka és mtsai, 2005); 2) gátolja a STAT1-2 (signal transducer and activator of transcription) heterodimerek transzlokációját a sejtmagba, így az IFN-vezérelt jelátvitel károsodása miatt az IFN-stimulált gének átírása elmarad (Brzózka és mtsai, 2006); 3) egyik csonkolt változata, a P3 gátolja a STAT-dimerek kapcsolódását a sejtmagban az I-es és II-es típusú IFN-ok célgénjeihez (Vidy és mtsai, 2007). Több citokin és kemokin szintézise is sérül: a P fehérje az IL (interleukin)-6 termelődését gátolja a STAT3 transzlokációjának gátlásával (Lieu és mtsai, 2013), míg az M fehérje az NF- κ B (nuclear factor kappa B) vezérelt jelátvitelt megzavarva gátolja az IL-8, a TNF (tumor nekrozis faktor)- α és a CXCL2 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 2) szintézisét (Luco és mtsai, 2012; Ben Khalifa és mtsai, 2016).



4. ábra: A veszettségvírus különböző fehérjéinek hatása az interferonok termelődésére és az interferon-vezérelt jelátvitelre. Fekete nyíl: folyamat iránya; piros „talpas” vonal: vírusfehérjék gátló hatása; bordó szaggatott nyíl: transzlokáció a citoplazmából a sejtmagba. IFNAR: IFN- α - β -receptor; IFNGR: IFN- γ -receptor; Jak1/-2: Janus kinase 1/-2; Tyk2: tyrosine kinase 2; ISRE: IFN-stimulált gének promoter szakasza; GAS: IFN- γ célgének promoter szakasza (saját ábra)

A RABV a dendritikus sejtek működését is módosítja (**5. ábra**). A DS-ek a periférián már rövidesen az expozíció után találkoznak a vírussal, és bekebelezik azt. Attenuált törzsek esetében a RIG-I érzékeli a virális mintázatokat, elsősorban a leRNS-t a fagoszómában, és elindul az IFN- és citokintermelés (Yang és mtsai, 2015; Li és mtsai, 2008). Neurovirulens törzseknél azonban a kaszkádot gátolják a P, N és M vírusfehérjék. A glükoprotein külső doménje megakadályozza DS érését (Huang és mtsai, 2017), emiatt a virionok a fagoszómában sokáig érintetlenek maradnak, és az MHC (major histocompatibility complex)-I, és -II fehérjék szintézise lényegesen csökken. A hiányzó MHC-expresszió miatt a sejt alkalmatlanná válik az antigén-prezentációra, az érés elmaradása miatt pedig a DS-ek a regionális nyirokcsomó helyett a perifériás idegekbe vándorolnak, elősegítve a RABV neuroinvázióját (Senba és mtsai, 2013).



5. ábra: Dendritikus sejtek szerepe attenuált és vad-típusú (wt) RABV-fertőzésnél, a periférián (saját ábra)

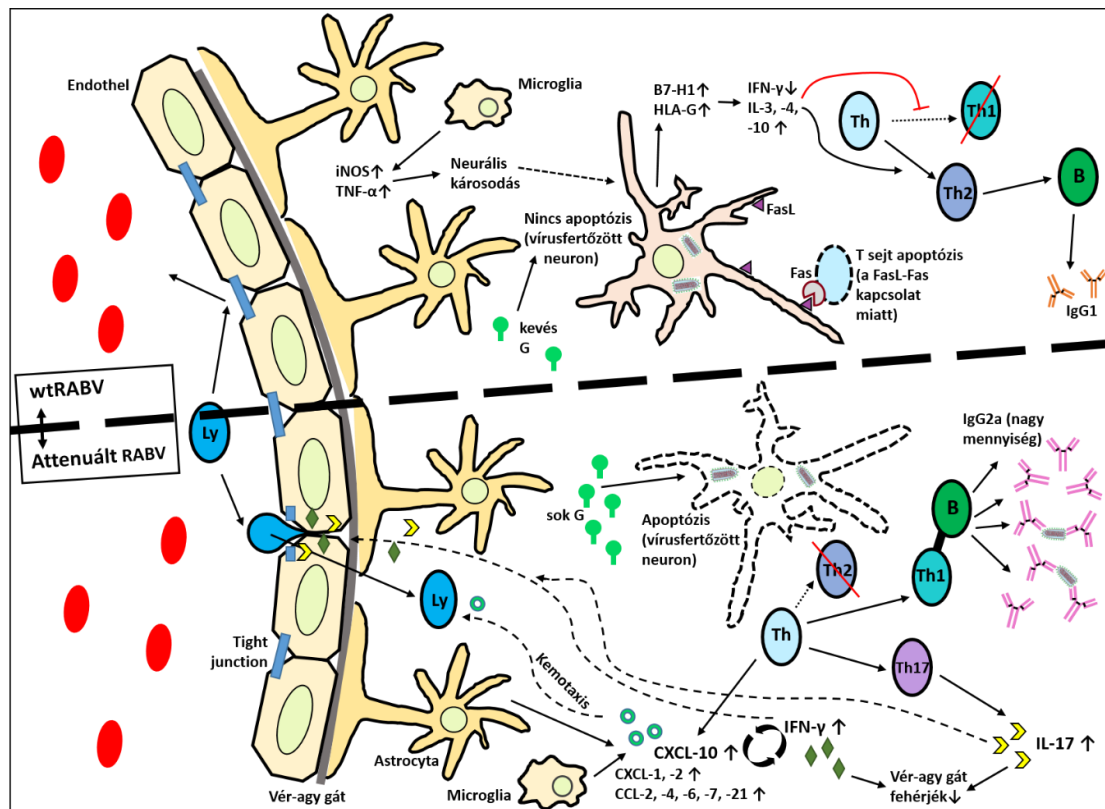
A KIR elérése után a vírus további mechanizmusokat használ az immunrendszer kijátszására. Vad-típusú RABV fertőzésnél a mikrogliaokban, astrocytákban, és rezidens T sejtekben a gyulladásgátló kemokin-gének indukciója elmarad vagy később lép fel, mint attenuált törzsek esetében (Wang és mtsai, 2005; Nakamichi és mtsai, 2005). A kemokinek közül kiemelt jelentőségű a CXCL10, amely – az IFN-γ-val pozitív visszacsatolásban – a fő kemotaktikus ingert jelenti a limfociták belépéséhez az agyba. Az IFN-γ és az általa serkentett IL-17 az agyi erek endothel sejtjeiben a tight junction fehérjék szintézisét csökkenti, így a vér-agy gát átjárhatóbbá válik. Ez a folyamat szintén csak attenuált RABV-nél figyelhető meg,

mivel erősen virulens törzseknél a CXCL10-indukció hiányzik, így a zárt vér-agy gát kívül tartja a T és B sejtek nagyobb részét (Phares és mtsai, 2006; Roy és mtsai, 2007).

Markáns különbségek mutatkoznak attenuált és vad-típusú törzsek között a KIR-ben fellépő apoptotikus folyamatok terén is: míg az attenuált vírus a fertőzött idegsejtek széleskörű apoptózisát okozza, ami korlátozza a továbbterjedést (Sarmiento és mtsai, 2005); a vad-típusú RABV gátolja a neuronok apoptózisát (Suja és mtsai, 2011). A különbséget a G fehérje eltérő eloszlása okozza a különböző virulenciájú RABV típusoknál (Préhaud és mtsai, 2003; Caillet-Saguay és mtsai, 2015). Ezen felül a neurovirulens törzsek az agyba beáramló immunsejtek, elsősorban a helper és citotoxikus T sejtek (Th és Tc) apoptózisát okozzák azáltal, hogy a TNF-géncsaládba tartozó Fas-ligand (FasL) up-regulációját váltják ki az idegsejtekben. A FasL a T sejtek Fas receptorához kapcsolódva indukálja azok apoptózisát (Baloul és mtsai, 2004; Fernandes és mtsai, 2011). A vírus egyes immunszuppresszív mediátorok (B7-H1 és HLA-G) szintézisét is serkenti, ami gátolja a hatékony adaptív immunválaszt, és eltolja azt a veszettség esetén kevésbé hatékony Th2 út irányába (Lafon és mtsai, 2008; Mégret és mtsai, 2007).

Humán veszettség esetek és állatkísérletek egyaránt azt mutatják, hogy a betegség kimenetele erősen függ az agyba beáramló B-limfociták által *in situ* termelt ellenanyagok mennyiségétől (a perifériás ellenanyagok nem jutnak át a vér-agy gáton) (Hooper és mtsai, 2009). A gyengébb virulenciájú vírusok okozta fertőzésnél gyakran magas ellenanyag-titerek mérhetők a liquorban (Gnanadurai és mtsai, 2013), szemben az erősen virulens törzsekkel, ahol legtöbbször nem lehet kimutatni neutralizáló ellenanyagokat a KIR-ben (Hemachudha és mtsai, 2013). A sikeres agyi ellenanyag-termeléshez a Th sejtek Th1 irányú differenciálódása szükséges, ami a B sejteket citokin-stimuláció révén nagy mennyiségű IgG2a kibocsátására serkenti, ahogy attenuált törzseknél megfigyelhető. Vad-típusú RABV-nál inkább a Th2 út aktív, ami csak kevés – IgG1 szub-izotípusú – ellenanyag termelődéséhez vezet, és nem képes megállítani az agyi vírusszaporodást (Lebrun és mtsai, 2015).

A RABV fertőzést követő agyi immunfolyamatokat az **6. ábra** foglalja össze.



6. ábra: Agyi immunfolyamatok összehasonlítása attenuált és vad-típusú (wt) RABV-fertőzést követően: vér-agy gát átjárhatóság; gyulladásozó folyamatok; apoptózis; ellenanyag-termelés (saját ábra)

3.4. A veszettség klinikai tünetei

A veszettségre az összes emlős faj érzékeny, és szinte minden esetben végzetes agy- és gerincvelőgyulladást okoz. A betegség klinikai képét a vírus bejutási helye, valamint a RABV törzs virulenciája és a vírusedózis is befolyásolja. A lappangási idő tág határok között változik, de jellemzően hosszú (5 nap-1 év; általában 2-8 hét). Ezt követően fajoként eltérő tünetek jelennek meg. Állatoknál a viselkedés megváltozása jellemző a korai fázisban (Hanlon, 2013). A betegség lefolyása három stádiumra osztható: bevezető szakasz (stadium prodromorum), ingerlékeny szakasz (stadium excitationis), és bénulások szakasz (stadium paralyseos). A klasszikus (dühöngő) veszettségnél mindhárom szakasz megjelenik, míg a paralitikus (csendes) formánál a fokozott ingerlékenység kimarad (Varga és mtsai, 2018).

Kutyáknál eleinte az erős kóborlási vágy, rekedt ugatás, emészthetetlen tárgyak lenyelése és támadó magatartás jellemzi a veszettséget, majd néhány nap elteltével fokozódó bénulások alakulnak ki: először a fej és garat területén, ami kancsalsághoz, lógó állkapocshoz, nyelési zavarhoz és nyálzáshoz vezet. Később a végtagok, majd a légzőizmok is bénulnak, az állat elfekszik, és elhullik. Csendes veszettségnél a bevezető tünetek után rögtön a bénulások szakasz következik (Lackay és mtsai, 2008). A veszett macskák kifejezetten agresszívvá válnak. Komoly veszélyt jelent, hogy jellemzően fejre, nyakra támadnak és így a vírus az

agyhoz közelebbi területen jut be a megharapott ember vagy állat testébe (Varga és mtsai, 2018). Rókák és egyéb vadon élő állatok esetében sokszor a természetes óvatosság elvesztése vezeti be a veszetséget (Jackson és Wunner, 2007), aminek következtében emberek környezetében, lakott területeken, utak mentén jelenhetnek meg. Az ilyen módon „megszelídülő” rókák azonban megharaphatják az őket megérintő, megsimogató embereket. Alkalmanként egyéb háziállatok is fertőződnek. Lovaknál általában nyugtalanság, viszketegség, kólikás tünetek; míg szarvasmarhák esetében bendőfelfúvódás, nemi ingerlékenység, dühöngési rohamok jellemzik a veszetséget a bénulásos szakasz előtt. Sertések nyugtalanságot, kényszermozgásokat követően bénulnak és elhullanak. Denevéreknél többféle lefolyás is lehetséges az esetleges nyugalmi állapottól (Kuzmin és Botvinkin, 1996) és az érintett *Lyssavirus*-genotípustól függően, de többnyire rendellenes viselkedés, nappali aktivitás, inkoordinált repülés, nyelési zavar, agresszivitás, majd bénulások figyelhetők meg (Forró és mtsai, 2018; Molnár és mtsai, 2008).

Az emberek veszetsége dühöngő és (ritkábban) paralitikus formában is jelentkezhet. A kezdeti tünetek között gyakori az expozíció helyének fájdalma, viszketése, paraesthesiája (Fooks és mtsai, 2017). Rövidesen a központi idegrendszeri tünetek is fellépnek: zavart tudatállapot, fokozott ingerlékenység, dührohamok, hallucinációk. Nyelési képtelenség és víziszony alakul ki, majd átlagosan a tünetek megjelenése után két héttel a fokozódó bénulások légzésbénuláshoz vezetnek és beáll a halál. A görcsös állapotok, dühkitörések között tiszta tudatállapotú időszakok is jellemzők; a paralitikus veszetség pedig végig ép tudat mellett zajlik le a végzetes bénulásig (Hemachudha és mtsai, 2013; Jackson, 2013).

3.5. Veszetség elleni immunizálás és terápiás próbálkozások

A veszetség elleni védekezés legfontosabb eszközei a vakcinák, amelyek régóta hatékonyan bizonyulnak egyrészt az emberek, másrészt a háziállatok megbetegedésének megelőzésében. Erre a célra jelenleg sejtenyészeten előállított, inaktivált, adjuvált vakcinákat használunk, de régebben agyvelőben, illetve csirkeembrióban passzált attenuált vagy inaktivált vakcinák is használatban voltak. Emberek megelőző immunizálásához (PrEP) a jelenlegi ajánlás szerint 4 adag vakcina beadása szükséges a 0., 7., 14., és 21. vagy 28. napon (Fooks és mtsai, 2017). A pre-expozíciós oltást foglalkozásából kifolyóan veszélyeztetett, vagy endémiás területre beutazó egyéneknek indokolt adni. A fertőződés gyanúja esetén posztexpozíciós oltássorozat (PEP) alkalmazandó, amelyet 4 adag (0. [2×], 7., 21. nap; Zágráb protokoll) vagy 5 adag (0., 3., 7., 14., 28. nap; Essen protokoll) vakcina beadásával végeznek el. A WHO ajánlása szerint, amennyiben az expozíció során bőrön áthatoló sérülés keletkezett, és a sérült nem részesült PrEP-ben, az alapos sebkezelés és a PEP alkalmazása mellett szükséges a seb környékének hiperimmun savóval (HRIG – human rabies immunoglobulin; ha ez nem elérhető, ERIG – equine rabies immunoglobulin) történő

beszűrése is (WHO, 2013). Az inaktivált vakcinák csak több adagból álló oltási sorozat esetén nyújtanak kellő védelmet; és PEP esetén csak addig, amíg nem lépett be nagyobb mennyiségű RABV az idegrendszerbe. Ilyenkor a veszélyeztetett immunrendszer hamar aktiválódik, és a gyors antigénprezentációt egy korai, nagymértékű (IgM- majd IgG típusú) ellenanyagválasz követi. Megkésett vakcinázás esetén azonban (a KIR fertőződése után) ez a Th2-vezérelt immunválasz már nem hatékony (Lebrun és mtsai, 2015; Garcia és mtsai, 2018; ld. 3.3.).

A szilvatikus veszettség rezervoár fajait (Európában főként a rókát) jellemzően orálisan immunizálják, csalétekbe rejtett élő-attenuált vakcinával vagy vektorvakcinával. Ezzel a módszerrel Európában komoly sikereket értek el a rókaveszettség felszámolásában. Egyes fejlődő országokban, ahol a kutyák nyilvántartása és oltása nem megoldott, az urbánus veszettség elleni védekezéshez is igénybe vehető az orális immunizálás (WHO, 2007). Az attenuált vakcinák nagyfokú védettséget biztosítanak, de ritkán reziduális virulenciát hordozhatnak, és veszettséget is okozhatnak a felvevő állatban (Forró és mtsai, 2019; Müller és mtsai, 2009a).

A tünetekben megnyilvánuló veszettségre megbízható terápiás eljárás jelenleg nincs. Veszett állatok gyógykezelése a legtöbb országban tilos. Emberi esetekben számos kezelési módszert kipróbáltak, de ezek csak egészen csekély sikerrel jártak. Az elmúlt évtizedben nagy reményeket fűztek a 2005-ben leírt ún. Milwaukee-protokollhoz, amelynek alkalmazásával egy fiatal beteg életét sikerült megmenteni, miután denevérharapást követően kialakultak nála a veszettség klinikai tünetei. A protokoll lényege – intenzív támogató terápia mellett – a mesterséges kóma kiváltása volt, annak reményében, hogy az így elnyújtott kórlefolyás alatt az immunrendszer felszámolja az idegrendszeri fertőzést. Eközben antivirális szereket – ribavirint és amantadint – is adagoltak (Willoughby és mtsai, 2005). Az esetet követően számos alkalommal használták a protokollt világszerte, de a további sikerek elmaradtak (Jackson, 2013). A jelenlegi ajánlások szerint a Milwaukee-protokoll követése a továbbiakban nem javasolt (Zeiler és Jackson, 2016), mégis manapság is kísérleteznek különböző módosított változataival (Murphy és mtsai, 2019). A ribavirin és amantadin mellett további antivirális szereket (pl. IFN- α) és veszettség elleni ellenanyagokat (HRIG és monoklonális antitestek) is adtak veszettségben szenvedő betegeknek, de sem az intravénás, sem az intrathecalis adminisztráció nem volt eredményes. A szakirodalomban számos további lehetséges terápiás módszert írtak le és javasoltak, azonban ezek egyike sem jutott még el a humán esetekben való felhasználásig (Appolinario és Jackson, 2015).

Napjainkig összesen 29 esetről számoltak be, amikor tüneteket mutató betegek túléltek a veszettséget, ezek egy része azonban nem meggyőzően dokumentált (Nadeem és Panda, 2020). Az esetek többségében intenzív terápiás ellátás mellett is súlyos neurológiai szövődmények maradtak vissza (**1. táblázat**). Prognosztikai szempontból kedvező

szempontok a fiatal kor, alapbetegségek hiánya, denevér eredetű RABV törzs, mielőbbi hospitalizáció, valamilyen (akár késői vagy hiányos) PEP, magas ellenanyag szint a vérben és liquorban (Fooks és mtsai, 2017). A néhány ismert túlélő ellenére továbbra is kijelenthető, hogy a klinikai veszethez szinte mindig végzetes, és hatékony terápia eljárás nem ismert.

1. táblázat: Klinikai tünetekkel járó veszethez túléltek emberek (csak részletesen dokumentált esetek)

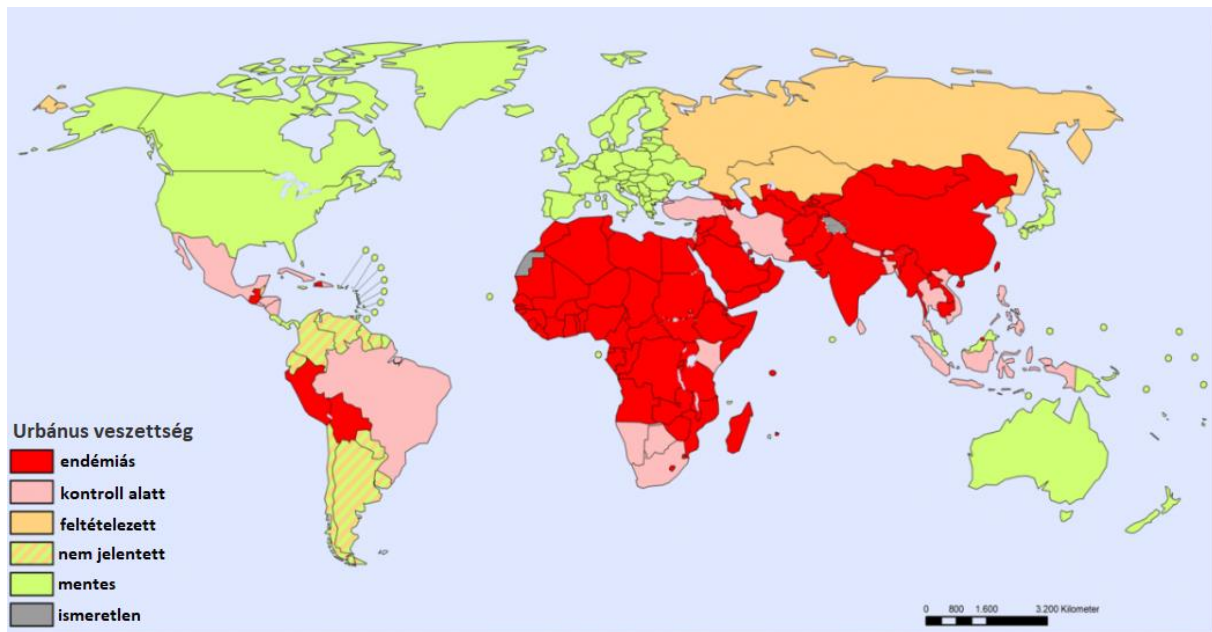
Adatok forrása: Fooks és mtsai, 2017; Mani és mtsai, 2019

Év	Ország	Kor, nem	Expozíció	Vakc., RIG	Szövődm.	Megjegyzés
1970	USA	6, F	denevér	PEP	-	
1972	Argentína	45, N	kutya	PEP	enyhe	
1977	USA	32, F	laboratórium	PrEP	súlyos	aeroszol expozíció
1992	Mexikó	9, F	kutya	PEP	súlyos	
2000	India	6, N	kutya	PEP	súlyos	
2004	USA	15, N	denevér	-	enyhe	eredeti Milwaukee prot.
2008	Brazília	15, F	denevér	PEP	közepes	PCR +
2008	Törökország	17, F	kutya	PEP, ERIG	-	késői ERIG, PCR +
2010	India	4, F	kutya	PEP, HRIG	súlyos	antigén és PCR +
2011	India	17, F	kutya	PEP, HRIG	súlyos	késői PEP
2011	USA	8, N	macska	-	-	csak IgM ellenanyag
2012	Dél-Afrika	4, F	kutya	PEP	súlyos	
2014	India	13, F	kutya	PEP	súlyos	antigén +
2014	India	6, F	kutya	PEP, ERIG	súlyos	hibás PEP protokoll
2017	India	3, N	kutya	PEP	közepes	
2017	India	5, N	kutya	PEP, HRIG	súlyos	
2017	India	4, F	kutya	PEP, ERIG	súlyos	
2017	India	26, F	kutya	PEP	közepes	
2017	India	9, F	kutya	PEP, ERIG	enyhe	késői ERIG

3.6. A veszethez jelenlegi helyzete és jövőbeli kilátások

Annak ellenére, hogy már több mint egy évszázada hatékony vakcinák állnak rendelkezésre a veszethez ellen, a betegség köz- és állategészségügyi jelentősége napjainkban is kiemelkedő. Azokon a területeken a legproblémásabb a helyzet, ahol a kutyák terjesztette urbánus ciklus endémiás (**7. ábra**): a szubszaharai Afrika régióban jelentik a humán esetek kb. 40%-át, míg Dél-, és Dél-Kelet-Ázsiában kb. 60%-át. A legmagasabb esetszámokat Indiában regisztrálják, de Bangladesben, a Fülöp-szigeteken, Vietnamban, Mianmarban, Kínában, továbbá a legtöbb afrikai országban súlyos a járványhelyzet (Ahmad és mtsai, 2018). Az érintett országokban – főleg a vidéki, falusias körzetekben – nem megoldott a kutyapopuláció kontrollja és vakcinázása. A nagyszámú kóbor állat fenntartja a fertőzési ciklust és harapás útján rendszeresen át is adja a vírust az embereknek (az esetek kb. 50%-ában

gyermekeknek) (Fooks és mtsai, 2014). A veszélynek kitett területek lakossága körében a fertőzésveszéllyel kapcsolatos tájékozottság nem megfelelő, a jellemzően alacsony színvonalú egészségügyi ellátórendszer pedig további problémát jelent. Nem minden esetben áll rendelkezésre megfelelő mennyiségű oltóanyag, így a veszélyeztetett lakosság preventív vakcinázása nem megoldható; a védekezés a posztexpozíciós oltásokra épít. A sokszor hiányos HRIG/ERIG ellátottság is komoly kockázatokat hordoz. A veszéttségtől leginkább sújtott országokban a laboratóriumi diagnosztikai háttér is hiányos (Fooks és mtsai, 2017).



7. ábra: Urbánus veszettség elterjedtsége a Földön. Forrás: <https://www.who-rabies-bulletin.org/>

Azokon a területeken, ahol az urbánus veszettség nem fordul elő (Európa, Észak-Amerika, Ausztrália), jóval kevesebb humán esetre kell számítani. Ezek forrásai egyrészt denevérek (különösen az amerikai kontinensen) vagy a szilvatikus ciklus rezervoárjai (róka, aranyakál, mosómedve, borz stb.); másrészt importált esetek (WHO, 2013). A fejlett országokban a kutyák vakcinázása széles körű, azonban a macskák átoltottsága alacsonyabb, és ez kockázatokat hordozhat: Magyarországon a legutolsó humán esetekben macska volt a fertőzési forrás (Munkácsy és Sedlák, 1996), és az USA-ban is a macskák több emberi megbetegedést okoznak, mint a kutyák (Gerhold és Jessup, 2013).

A veszettség teljes eradikálása kilátástalannak tűnik a számos természetes rezervoár faj és a denevérvészesség elterjedtsége miatt (Rupprecht és mtsai, 2017). Az emberi megbetegedések 99 százalékáért felelős urbánus veszettség megszüntetése viszont lehetséges. Kutatások bizonyítják, hogy endémiás területeken a kutyák 70%-nak oltása elegendő a fertőzési lánc megszakadásához és így a vírus cirkulációja legfeljebb 7 év alatt megszűnik (Wallace és mtsai, 2017). Ennek megfelelően az OIE, a WHO és a FAO 2015-ben

elfogadott globális szintű keretprogramja a kutya-közvetítette humán veszettség felszámolását tűzte ki célul 2030-ra (Abela-Ridder és mtsai, 2016). Az ambiciózus cél a megvalósításához a jelenlegi források többszörösét kell biztosítani a védekezésre, és széles nemzetközi összefogásra van szükség az érintett országok döntéshozói, a tudományos közösség és a nemzetközi szervezetek között. Latin-Amerika területén az elmúlt évtizedben elért komoly előrelépés bizonyítja, hogy az urbánus veszettség megszüntethető a korábban nagymértékben átfertőzött régiókban is (Rupprecht és mtsai, 2017).

A veszettség elleni fellépés globális megszervezése és összehangolása mellett a tudományos kutatás terén is fontos feladatok adódnak: nagy szükség van továbbfejlesztett vakcinákra, amelyek minél kevesebb (lehetőleg egy) adag beadása mellett is megbízható védettséget adnak. A poliklonális HRIG/ERIG lecserélése monoklonális ellenanyagokra a PEP területén szintén sok előnnyel jár: ezek gyártása olcsóbb, hatásuk egységesebb, és többféleképpen módosíthatók a nagyobb hatékonyság érdekében – például fokozható az átjutásuk a vér-agy gáton (Both és mtsai, 2013; Müller és mtsai, 2009b; Terryn és mtsai, 2014). A neurológiai tünetekkel járó veszettség esetén használható hatóanyagok, kezelési módszerek kifejlesztése és optimalizálása ugyancsak a közeljövő feladata; az értekezés alapját képező kutatómunka ehhez próbál hozzájárulni.

3.7. I-es típusú interferonok

Az interferonok a citokinek közé tartozó fehérjék, amelyek a vírusok elleni nem-specifikus immunitás kulcsfontosságú elemei. Három csoportjuk közül az I-es típusba tartozók közös jellemzője, hogy a sejtfelszíni IFN- α - β -receptorhoz (IFNAR) kötődnek. Az antivirális hatású IFN- α és - β mellett további tagokat is ide sorolnak (IFN- ϵ , - κ , - ω), amelyek a terhesség anyai felismerésében játszanak szerepet (Randall és Goodbourn, 2008). A II-es típusba az IFN- γ tartozik, amelyet immun-interferonnak is neveznek. Az IFN- γ aktivált NK és T sejtekben termelődik citokinhatásra; az INFR receptorhoz kapcsolódik, és az adaptív immunválasz folyamatait szabályozza. A III-as típusú IFN-ok az IFN- λ (1-4) molekulák, amelyeket a 2000-es évek elején fedeztek fel, az IL10R2-IFNLR1 receptorkomplexhez kapcsolódnak, és az IFN- α - β -hoz hasonlóan vírusellenes hatásúak (Uzé és Monneron, 2007).

Az I-es típusú IFN-ok termelődését patogén mintázatok (pl. virális RNS) sejtfelszíni vagy citoplazmikus receptorok (TLR-ok, RIG-I-típusú receptorok) általi felismerése indítja el. Összetett jelátviteli út vezet az IFN- α és - β szintéziséhez, amely során a mitokondriális IPS-1 (IFN- β promotor stimulator-1) foszforilálja az NF- κ B-t és az IRF-3-at (type-I interferon regulatory factor 3), amitől azok a sejtmagba kerülnek át (4. ábra, ld. 3.3.). A kibocsájtott I-es típusú IFN-ok a környező sejtek IFNAR receptoraihoz kapcsolódnak, majd szintén több lépéses kaskád folyamat után a sejtmagban IFN-stimulált gének átírását váltják ki (Schnell és

mtsai, 2010). Az így termelődött fehérjék sokféle vírusellenes folyamatot indíthatnak el (citokinek termelése, a vírusreplikáció egyes szakaszainak gátlása, autofágia serkentése, apoptózis kiváltása). A RABV – főként P fehérjéje révén – több ponton is gátolja az I-es típusú IFN-ok termelődését és hatásait (ld. 3.3.).

Az IFN- α -t napjainkban főként a hepatitis-B és -C okozta krónikus májgyulladások kezelésében használják, gyakran ribavirinnel vagy egyéb antivirális hatóanyagokkal kombinálva (Woo és mtsai, 2017; Palumbo, 2011). Az IFN- β -t a sclerosis multiplex terápiájában veszik igénybe (Paolicelli és mtsai, 2009). Az exogén I-es típusú IFN-ok veszettség elleni hatását is kimutatták *in vitro* (Chopy és mtsai, 2011a; Niu és mtsai, 2013) és *in vivo* (Mehta és mtsai, 2015), azonban használatuk a gyakorlatban, humán betegekben nem volt sikeres (Appolinario és Jackson, 2015). Egy tanulmányban azt is bizonyították, hogy egyes IFN-stimulált fehérjék is gátolják a RABV replikációját sejtenyészetben (Leroy és mtsai, 2006).

3.8. Ribavirin

A ribavirin egy 1972-ben kifejlesztett guanozin-analóg vírusellenes gyógyszer, ami az RNS vírusok replikációját gátolja a szintetizálódó virális RNS láncba való beépülés útján. Karboxamid csoportjának rotációtól függően a guanozin vagy az adenozin helyét is elfoglalhatja, és ilyenkor egyformán jól kapcsolódik az uridinhez és citidinhez, így szélsőségesen megnöveli a mutációs rátát a nukleinsav-replikáció során. A „letális mutagenézisnek” is nevezett folyamat következménye hibás genomú, működésképtelen utódvirionok képződése (Crotty és mtsai, 2002). További hatásait is kimutatták: a Th1-típusú immunválaszt segíti elő a Th2 ellenében és ezzel befolyásolja az immunválaszt, valamint csökkenti az intracelluláris GTP (guanozin-trifoszfát) szintet az IMPDH (inozin-monofoszfát dehidrogenáz) enzim gátlása által (Te és mtsai, 2007). Ez utóbbi folyamat, amely a vírusszaporodás transzkripció és a replikációs szakaszát is gátolja, visszafordítható a guanozin exogén pótlásával (Anindita és mtsai, 2018).

A ribavirint eredetileg gyermekek HRSV (human respiratory syncytial virus) fertőzéseinek kezelésére szabadalmaztatták, de manapság a fő felhasználási területe a krónikus hepatitis C-fertőzés terápiája, pegilált IFN- α -val kombinációban (Te és mtsai, 2007). Fontos szerepe van ezen kívül egyes vérzéses lázat okozó vírusfertőzések kezelésében, mint a Lassa-láz, vagy a Krími-Kongói haemorrhagiás láz (Bausch és mtsai, 2010; Ascioглу és mtsai, 2011).

A ribavirint emberi veszettség esetekben többször használták már (többek között az eredeti Milwaukee-protokoll részeként is – ld. 3.5.), de sikertelenül (Appolinario és Jackson, 2015). A RABV replikációját gátolta sejtenyészetben, ugyanakkor kísérleti egerekben – posztexpozíciós adagolás esetén – nem fokozta a túlélést (Appolinario és mtsai, 2013).

3.9. Favipiravir

A favipiravir, vagy más néven T-705 viszonylag új fejlesztésű, RNS-vírusok elleni hatóanyag, amit a japán Toyoma Chemical csoport állított elő. Japánban 2014-ben Avigan néven törzskönyvezték influenza kezelésére, 2019 óta pedig egy kínai cég is megkapta a licenszet a gyógyszer forgalmazására. A favipiravir egy előanyag, amelyből a sejtekben a HGPRT (hipoxantin-guanin foszforibozil-transzferáz) enzim foszforibozilációval állítja elő az aktív hatóanyagot, favipiravir-ribofuranozil-5'-trifoszfátot (Naesens és mtsai, 2013). Többféle hatásmechanizmusát is kimutatták: elsősorban az RNS vírusok polimeráz enzimének szelektív gátlószere (Furuta és mtsai, 2013), másrészt a ribavirinhez hasonlóan az RNS-be purin analógnaként beépülve letális mutagenézist idéz elő (Baranovich és mtsai, 2013).

Az influenza elleni hatása mellett RNS vírusok széles körének replikációját gátolja: igazolták a hatását ebolavírus (Oestereich és mtsai, 2014a), arena- és bunyavírusok okozta vérzések lázak (Mendenhall és mtsai, 2011; Oestereich és mtsai, 2014b és 2016) és Zika-vírus (Mumtaz és mtsai, 2016) ellen is, habár a terápiás hatás sok esetben korlátozott mértékű volt. 2020 márciusától komoly nemzetközi érdeklődés övezi a favipiravirt: több beszámoló szerint eredményesen használták a SARS-CoV-2 vírus okozta COVID-19 betegség kezelésében, számottevő mellékhatások nélkül (Cai és mtsai, 2020). Nagy létszámú (randomizált, placebo-kontrollált, kettős-vak) klinikai vizsgálatokra azonban eddig nem került sor, így a hatékonysága erre az indikációra még nem kellően bizonyított.

Veszétség elleni antivirális hatását is vizsgálták: RABV-vel fertőzött sejtenyészetekben ígéretesnek bizonyult, de egérmodellben vizsgálva az eredmények ellentmondásosak voltak (Yamada és mtsai, 2016; Banyard és mtsai, 2019). Humán veszétségben is kísérleteztek már a használatával, módosított Milwaukee-protokollt követve. A későn megkezdett kezelés nem tudta megelőzni a beteg halálát (Murphy és mtsai, 2019).

3.10. Sorafenib

A sorafenib multikináz gátló hatóanyag, amelyet daganatellenes gyógyszerként (Nexavar néven) előrehaladott és egyéb terápiára rezisztens máj-, vese- és pajzsmirigy tumorok kezelésére használnak (Pitoia és Jerkovich, 2016). A sorafenib a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) kaszkádok több különböző útját gátolja, főként a Raf/MEK/ERK jelátvitelt. Ez a kaszkádfolyamat központi szerepet játszik a sejtproliferáció és -differenciáció, sejthalál és citokintermelés szabályozásában (Liu és mtsai, 2006). A sorafenib rákellenes hatásában szerepet játszik, hogy a Raf kinázok mellett az angiogenezist elősegítő VEGFR-t (vascular endothelial growth factor receptor) és PDGFR-t (platelet-derived growth factor receptor) is gátolja (Wilhelm és mtsai, 2008).

Több vizsgálat is kimutatta, hogy a sorafenibnek vírusellenes hatása is van: gátolja a hepatitis C vírus (Himmelsbach és mtsai, 2009; Descamps és mtsai, 2015), a humán cytomegalovírus (Michaelis és mtsai, 2011) és a humán enterovírus 71 (Gao és mtsai, 2014) replikációját. A Raf/MEK/ERK irányította jelátvitel számos egyéb RNS vírus transzkripció és replikációs folyamataiban is fontos szabályozó feladatot lát el, így gátlása a RABV szaporodására is közvetlen hatással lehet (Pleschka, 2008). A veszettség okozta agyvelőgyulladás kórfejlődésének molekuláris szintű folyamataiban a Raf/MEK/ERK MAPK kaszkádok fontos szerepet játszanak, gyulladáskeltő hatásúak, a p38 MAP kinázok jelentősége viszont csekély (Nakamichi és mtsai, 2004 és 2005). Egy szelektív MEK1/2 MAPK-gátló, az U0126 javította a túlélést RABV-fertőzött egerekben, miközben az agyi vírusterjedés is kisebb szintű volt, mint a kezeletlen állatokban. A fokozott túlélés mellett a kezelés jelentősen csökkentette a pro-inflammatorikus nitrogén-oxid és TNF- α szinteket (Manjunatha és mtsai, 2017).

3.11. Infliximab

A TNF- α a gyulladáskeltő citokinek közé tartozik. Különbféle biológiai, kémiai és fizikai stimulusok (virális és bakteriális patogének, citokinek, ischaemia, trauma) hatására termelődik fehérvérsejtekben. Túlzott szintézise immunmediált kóros állapotok kialakulásához vezet (Choi és mtsai, 2008). Az infliximab a TNF- α szelektív gátlószere; egy kiméra (emberi/egér eredetű) monoklonális antitest, amely a citokint megköti és semlegesíti. Több autoimmun betegség kezelése épül rá, mint például a Crohn betegség, rheumatoid arthritis, psoriasis vagy az atopiás dermatitis (Siddiqui és Scott, 2005; Rigopoulos és mtsai, 2008). A TNF- α gátlása autoimmun agyi kórképekben neuroprotektív hatásúnak bizonyult (Brambilla és mtsai, 2011).

A RABV agyi szaporodása során a TNF- α és egyéb pro-inflammatorikus mediátorok – például az IL-1 β vagy a nitrogén-oxidok termelődéséért felelős iNOS (indukálható nitrogén-monoxid szintáz) – felhalmozódása hozzájárulhat az idegszövet károsodásához, ezzel gyorsítva a betegség progresszióját és csökkentve a túlélés esélyét (Solanki és mtsai, 2009; Liao és mtsai, 2012; Ubol és mtsai, 2001). A TNF- α alacsonyabb szintű termelődése összefüggésbe hozható a fokozott túléléssel veszettség esetén (Mehta és mtsai, 2015).

3.12. Caspase-1 gátló (Ac-YVAD-cmk)

A sejtekben az intracelluláris veszélyjelzések (például vírusfertőzés) hatására szabályos, körkörös szerkezetű proteinstruktúrák, inflammoszómák alakulnak ki, amelyek a veleszületett immunrendszer gyulladási folyamatait elindítják. Az inflammoszóma felépülésének hagyományos, „kanonikus” útját a caspase-1 (CASP-1) enzim irányítja (Broz és Dixit, 2016). A CASP-1 alaphelyzetben inaktív zimogén formában található meg a citoplazmában, azonban az inflammoszóma beépülve autoproteolízis révén két alegységre (p20 és p10) válik szét.

A p20 és p10 alkotta heterodimer az enzim aktív formája: elhasítja egyes gyulladáscitokinek (IL-1 β és IL-18) és mediátorok (Gasdermin D) prekursorait, aktiválva azokat (Jorgensen és Miao, 2015). A Gasdermin D a programozott sejthalál egy speciális gyulladáscitokinek formáját, a piroptózist váltja ki: a sejtmembránon pórusokat képez, ezáltal a sejt fokozatosan felduzzad és szétesik. A sejthalál következtében az inflammoszómaiban nagy mennyiségben képződött citokinek kiszabadulnak, ami a környező sejtekben gyulladáscitokinek kaszkádot indít be és immunsejteket vonz a területre (Liu és mtsai, 2016).

A piroptózis a CASP-1 szelektív inhibitoraival gátolható, ezek közül az egyik legismertebb az Ac-YVAD-cmk (acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-klorometilketon) nevű peptid. A hatóanyag egérmodellben neuroprotektívnek bizonyult agyi ischaemia és intracerebrális vérzések esetén – elsősorban a gyulladáscitokinek IL-1 β és a TNF- α szintjének csökkentése révén (Rabuffetti és mtsai, 2000; Wu és mtsai, 2010).

A piroptózis az intracelluláris patogének elleni nem-specifikus védekezés fontos eleme, így nem meglepő, hogy RABV fertőzés során is fontos szerepe van. A kutatási eredmények ellentmondásosak: egy beszámoló szerint a folyamat segít kontrollálni a vírus szaporodását (Kip és mtsai, 2017), más kutatók azonban arra a következtetésre jutottak, hogy a veszettségnél a piroptózis az idegsejtek károsodását és funkciózavarát okozza a KIR-ben, ami fokozza a vírus kártételét (Koraka és mtsai, 2018).

4. Anyag és módszer

4.1. Vizsgálatok laboratóriumi háttere

A veszettség vírusa halálos emberi megbetegedést okozó, zoonotikus ágens, így a vírussal történő munkavégzés körülményei szigorúan szabályozottak. Az Európai Unióban a munkájuk során biológiai anyagokkal kapcsolatos kockázatoknak kitett munkavállalók védelméről szóló 2000/54/EK irányelv fogalmazza meg az egyes, emberre potenciálisan veszélyes mikroorganizmusokra vonatkozóan, hogy milyen biztonsági szintű (Biosafety Level – BSL) laboratóriumban vizsgálhatók. A RABV és a többi lyssavírus faj esetében BSL-3 biztonsági szint szükséges minden olyan munkafolyamathoz, amelynek során élő vírus van/lehet jelen.

Ennek megfelelően kísérleteink jelentős részét a Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpont Állatorvos-tudományi Intézetének (MTA ÁOTI) BSL-3 laboratóriumában végeztük, amelyet a Dr. Gyuranecz Miklós által vezetett, a kutatásban szintén részt vevő Zoonótikus Bakteriológia és Mycoplasmatológia témacsoport üzemeltet. Ebben a laboratóriumban egy BSL-3 szintű állatház is megtalálható, ami az *in vivo* kísérleti szakaszban a kísérleti állatok elhelyezésére szolgált. Az állatkísérletek egy része csehországi kutatási partnerünk, a Brnoban működő Állatorvosi Kutatóintézet Virologiai Osztályának BSL-3 laboratóriumában és állatházában zajlott. A kísérleteket végző személyek pre-expozíciós vakcinázásban részesültek és védettséget biztosító ellenanyag szintjük volt (>1 IU/ml).

Azokat a munkafolyamatokat, amelyeknél az élő veszettségvírus jelenléte kizárható volt, a Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék virológiai laboratóriumában végeztük. Ezek a következők voltak: a sejtenyészetek előkészítése, a nukleinsav kivonást követően a polimeráz láncreakciós vizsgálatok, valamint a fertőzött sejtenyészeteket érintő kísérletekben a vírusokat inaktiváló 80%-os acetonnal végzett fixálás utáni lépések. Az immunhisztokémiai (IHK) vizsgálatok a minták formalinos fixálását követően a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állategészségügyi Diagnosztikai Intézetében (NÉBIH-ÁDI) történtek.

4.2. Sejtkultúrák és sejtenyésztés

A kísérletekhez egér neuroblastoma (N2a) és hörcsög vese (BHK-21 [C-13]) sejtvonalakat használtunk. Mindkét sejtvonal alkalmas a RABV és több rokon lyssavírus (pl. EBLV-1/-2) izolálására. A Nemzetközi Állatjárványügyi Hivatal szárazföldi állatokra vonatkozó diagnosztikai kézikönyve (OIE Terrestrial Manual, 2018) a vírusizoláláshoz az N2a, míg a fluoreszcens vírusneutralizációs próbához (FAVN) a BHK-21 alkalmazását javasolja.

A két sejtvonalat a rotterdami Erasmus Medical Center Viroscience laboratóriumától kaptuk meg. A sejteket krioprotektív fagyasztóközegben (Lonza, Walkersville, USA)

lefagyasztva, -80°C -on tároltuk, majd 75 cm^2 felületű steril tenyésztőedényben tenyésztettük 37°C -on, 5% széndioxid-koncentráció mellett. A sejtek tápfolyadéká Dulbecco által módosított Eagle médium (DMEM) volt, 4,5 g/l glükóztartalommal és ultraglutaminnal (Lonza), amelyet N2a esetében 10%, míg BHK-21-nél 5% főtális borjúsavóval (FBS, Biowest, Nuailé, Franciaország) és antibiotikum-antimikotikum oldattal (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) egészítettünk ki.

4.3. Vírustörzsek

Vizsgálatainkhoz két különböző, erősen virulens RABV törzset használtunk. Az *in vitro* kísérletekhez a CVS-11 (Challenge Virus Standard) fixált laboratóriumi törzset választottuk, amelyet az Egyesült Királyságban, Weybridge-ben működő Animal and Plant Health Agency biztosította számunkra. A vírust N2a sejteken szaporítottuk el, és 10^5 TCID₅₀/ml (tissue culture infectious dose 50/ml) infektív titerre beállítva tároltuk -80°C -on.

Az állatkísérletekhez a Silver-haired bat Rabies Virus-18 (SHBRV-18) vírustörzset használtuk, amely denevér-eredetű, vad-típusú RABV. A törzset a veszetzég egyik fontos észak-amerikai rezervoárjából, az őszes denevérből (*Lasionycteris noctivagans*) izolálták (Messenger és mtsai, 2002), és 1990 óta számos emberi halálesetért volt felelős (Morimoto és mtsai, 1996). A vírust Dr. Bernhard Dietzschold biztosította a Thomas Jefferson Egyetemről (Philadelphia, USA), és N2a sejtvonalon elszaporítva két különböző titerű vírusszuspenziót készítettünk belőle: az egyik $10^{5,2}$, a másik $10^{6,8}$ TCID₅₀/ml koncentrációjú volt. Kutatási partnereink által azonos állatmodellel és vírustörzsszel elvégzett előkísérletek alapján előbbi az általunk használt egerekben LD₅₀ (lethal dose 50), míg az utóbbi LD₁₀₀ vírudózisnak felel meg.

4.4. Hatóanyagok

Az antivirális hatóanyagok közül az egér IFN- α -t és - β -t a Merck-től (Darmstadt, Németország), a ribavirint (Virazole) az ICN Pharmaceuticals-től (Costa Mesa, USA), a favipiravirt (T-705) pedig a BOC Science-től (New York, USA) vásároltuk. A gyulladáscsökkentő, immunmoduláns szerek közül a multikináz-gátló sorafenibet (sorafenib-tosylate-ot tartalmazó Nexavar 200 mg tabletták formájában) a Bayer Pharma AG-től (Berlin, Németország), a TNF- α -gátló infliximabot (Remicade) a belgiumi Leuven egyetemi kórházának gyógyszerárától (gyártó: Janssen Biotech, Horsham, USA), a CASP-1 gátló Ac-YVAD-cmk-t pedig az Invivogen-től (San Diego, USA) szereztük be. Az egérkísérletekben használt veszetzég elleni poliklonális ellenanyagokat tartalmazó hiperimmun savót (HRIG – WHO 2nd International Standard for anti-rabies immunoglobulin, human) a NIBSC-től (London, UK), míg a vér-agy gát megnyitóként használt mannitot a Sigma-Aldrich-től vásároltuk.

4.5. *In vitro* kísérleti szakasz

4.5.1. *A kísérleti hatóanyagok citotoxicitásának vizsgálata*

A kísérletbe bevont antivirális hatóanyagokat négy különböző koncentrációban adtuk hozzá a sejtenyészetekhez. A legmagasabb, az N2a sejteket még nem károsító (citotoxicitás <5%) koncentráció meghatározása érdekében egy előzetes citotoxicitás-vizsgálatot végeztünk, amihez egy kereskedelmi forgalomban elérhető kitet használtunk, a gyártó utasításai szerint (Cytotoxicity Detection Kit Plus, Roche, Basel, Svájc). A kit az extracelluláris laktát-dehidrogenáz-aktivitást méri fotometriás módszerrel, ami arányos a sejtkárosodás mértékével. A tesztanyagok citotoxicitásának vizsgálata előtt meg kellett határozni az optimális sejtszámot, amely mellett az intakt (negatív kontroll) és a 100%-ban lizált (pozitív kontroll) sejtek esetében kapott abszorbancia-értékek közötti különbség a legmagasabb. Ezt követően a tesztanyagokból hígítási sort készítettünk, és hozzáadtuk a sejtekhez, majd 24 óras inkubációt követően meghatároztuk a különböző hígítások által okozott citotoxicitást. A sejtkárosodás mértékét az abszorbancia értékekből ($A_{492\text{nm}} - A_{690\text{nm}}$) a következőképpen számítottuk:

$$\text{Citotoxicitás(\%)} = [(A_{\text{minta}} - A_{\text{negatív kontroll}})/(A_{\text{pozitív kontroll}} - A_{\text{negatív kontroll}})] * 100$$

4.5.2. *Posztinfekciós antivirális vizsgálatok*

Konfluens N2a sejtenyészeteket kétszeri PBS-sel (phosphate-buffered saline) történő mosást követően tripszin-EDTA (etilén-diamin tetraecetsav) oldattal leemésztettük a tenyésztőedény faláról, majd a sejtszuszpenzió sűrűségét hemocitóméterrel 4×10^5 sejt/ml-re állítottuk be. Speciális polimer-bevonattal ellátott 96 mintahelyes mikrotiter lemezek (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Ausztria) minden mélyedésébe 100 μl sejtszuszpenziót pipettáztunk. 24 óra elteltével a tápfolyadékot 5000 TCID₅₀ CVS-11 vírust tartalmazó, 50 μl FBS nélküli DMEM-re cseréltük, ezáltal a sejtenyészeteket kb. 0,1 MOI-nak (multiplicity of infection) megfelelő vírudózissal fertőztük. Az adszorpció egy óráig tartott, 37°C-on és 5% CO₂-szint mellett. Ezt követően a vírustartalmú felülúszót eltávolítottuk, és hozzáadtuk a sejtekhez a vizsgált hatóanyagokat az aktuális lemezkiosztásnak megfelelően. A tesztanyagokból a legmagasabb nem citotoxikus koncentráción kívül (ld. 4.5.1.) 10-es alapú hígítással még 3 alacsonyabb koncentrációt készítettünk, 2% FBS-tartalmú DMEM tápfolyadékban hígítva. A hatóanyagok különböző kombinációit vizsgáló kísérletekben használt hígításokat az önállóan alkalmazott szerekre vonatkozó kísérletek eredményei alapján választottuk ki. A felhasznált hígítások a **2-3. táblázatokban** láthatók.

2. táblázat: A tesztanyagok hígításai a posztinfekciós antivirális vizsgálatokban.

Hatóanyag	Törzsoldat	Vizsgált koncentrációk			
IFN- α	1000 IU/ml* (PBS-ben)	10 IU/ml	1 IU/ml	0,1 IU/ml	0,01 IU/ml
IFN- β	1000 IU/ml (PBS-ben)	10 IU/ml	1 IU/ml	0,1 IU/ml	0,01 IU/ml
Ribavirin	10 mg/mL (DMSO**-ban)	10 μ g/ml	1 μ g/ml	0,1 μ g/ml	0,01 μ g/ml
Favipiravir	10 mg/mL (DMSO-ban)	10 μ g/ml	1 μ g/ml	0,1 μ g/ml	0,01 μ g/ml
Sorafenib	50 mM (DMSO-ban)	50 μ M	5 μ M	0,5 μ M	0,05 μ M

* IU: nemzetközi egység (international unit); **DMSO: dimetil-szulfoxid

3. táblázat: A tesztanyagok kombinációi a posztinfekciós antivirális vizsgálatokban.

Kombináció	Vizsgált koncentrációk			
IFN- β sorafenib	1 IU/ml	1 IU/ml	0,1 IU/ml	0,1 IU/ml
	5 μ M	0,5 μ M	5 μ M	0,5 μ M
IFN- β ribavirin	1 IU/ml	1 IU/ml	0,1 IU/ml	0,1 IU/ml
	10 μ g/ml	1 μ g/ml	10 μ g/ml	1 μ g/ml
IFN- β favipiravir	1 IU/ml	1 IU/ml	0,1 IU/ml	0,1 IU/ml
	10 μ g/ml	1 μ g/ml	10 μ g/ml	1 μ g/ml
ribavirin favipiravir	10 μ g/ml	10 μ g/ml	1 μ g/ml	1 μ g/ml
	10 μ g/ml	1 μ g/ml	10 μ g/ml	1 μ g/ml
sorafenib ribavirin	5 μ M	5 μ M	0,5 μ M	0,5 μ M
	10 μ g/ml	1 μ g/ml	10 μ g/ml	1 μ g/ml
sorafenib favipiravir	5 μ M	5 μ M	0,5 μ M	0,5 μ M
	10 μ g/ml	1 μ g/ml	10 μ g/ml	1 μ g/ml

48 órás inkubáció után a sejtenyészetek felülúszóit összegyűjtöttük, és -80°C-on tároltuk a további vizsgálatokig (vírustitrálás fluoreszcens fókusz módszerrel – 4.5.3., és reverz transzkripció real-time polimeráz láncreakció [qRT-PCR] – 4.5.4.). A lemezeken a sejteket 80%-os acetonnal 20 percig fixáltuk, majd kiszáritás után minden mélyedésbe 50 μ l FITC-el (fluoreszcein izotiocianát) konjugált, a RABV nukleoproteinje ellen termelt monoklonális ellenanyagot mértünk (Fujirebio Diagnostics, Malvern, USA). 30 perc 37°C-on, sötétben végzett inkubáció után a konjugátumot eltávolítottuk, a sejteket kétszer megmostuk PBS-sel, majd a lemezeket inverz fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk (Zeiss AxioVert 200M, Oberkochen, Németország). A vírusfertőzött sejtek élénkzöld fluoreszcenciát mutattak (**10. ábra**, ld. 5.1.2.). Meghatároztuk a fluoreszcens sejtek arányát az egyes mélyedésekben (szemikvantitatív becslés két független bíráló megfigyeléseinek átlaga alapján).

4.5.3. Fluoreszcens fókusz módszer

Az *in vitro* vizsgálatoknál az egyes kezelt és kontroll sejtenyészetekben a vírusreplikáció mértékét a felülúszók vírustitrálásával állapítottuk meg. A titrálást a fluoreszcens fókusz módszerrel (FFA) végeztük: az antivirális lemezekről eltávolított felülúszókat (ld. 4.5.2.) 10-es alapon hígítva N2a sejtenyészetekre oltottuk 4 ismétlésben, 96 mintahelyes mikrotiter lemezen. A lemezeket a 4.5.2. pontban leírtaknak megfelelően készítettük el, és 24 óra elteltével mértük rá a mintákat. Egy óra adszorpció után a vírustartalmú felülúszót friss tápfolyadékra cseréltük, és további 48 órán át inkubáltuk. Ezt követően a lemezeket a korábban leírtak szerint fixáltuk és festettük meg a fluoreszcensen jelölt ellenanyagokkal (4.5.2.). A kiértékelésnél az infektív titert a Spearman-Kärber módszerrel határoztuk meg (Spearman, 1908; Kärber, 1931), és TCID₅₀/ml egységekben adtuk meg.

A hatóanyagokkal vagy azok kombinációival kezelt sejtenyészetek eredményeit a kezeletlen víruskontrollhoz hasonlítottuk, hogy hány nagyságrend (\log_{10}) eltérés van a kontroll és kezelt sejtenyészeteknél mért infektív titer között. Mivel az önálló tesztanyagok és a kombinációk vizsgálata külön kísérletben történt, és a két esetben a víruskontroll titere némileg eltérő volt, az összehasonlíthatóság érdekében a (logaritmikus) antivirális hatást „relatív gátlóhatás %”-ban is kifejeztük. Ennek számítása a következő képlet szerint történt:

$$\text{Relatív gátlóhatás} = 100 - [\text{Lg(kezelt)/Lg(kontroll)}] \cdot 100$$

4.5.4. Reverz transzkripció real-time PCR (qRT-PCR) vizsgálatok (TaqMan)

Az antivirális vizsgálatok során a sejtenyészetek felülúszóinak vírustartalmát a fertőzőképes virionok mennyiségét kimutató FFA módszer (4.5.3.) mellett qRT-PCR-rel is vizsgáltuk, ami a RABV-specifikus RNS kópiaszám meghatározására alkalmas. A mintákból az RNS-t kromatográfiás módszerrel vontuk ki, a QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Németország) használatával, a gyártó utasításai szerint.

Az egy lépéses reakciót a Qiagen One-Step RT-PCR Kit-tel végeztük el, egy Applied Biosystems StepOne Plus (Thermo Scientific, Wilmington, USA) készüléket használva. Az egy lépéses qRT-PCR során a reverz transzkripció és a cDNS amplifikációja egy csőben, egymás után zajlik le, mivel a reakcióelegy reverz transzkriptáz és hőálló polimeráz enzimet is tartalmaz. A primereket és a TaqMan rendszerű real-time meghatározáshoz szükséges fluoreszcens próbát Wakeley és mtsai (2005) tanulmányából adaptáltuk. A reakcióelegy összetétele, a reakció hő- és időprofilja, valamint a primerek és a próba szekvenciája a **4., 5. és 6. táblázatokban** látható. Minden reakciót két ismétlésben végeztünk el.

4. táblázat: A qRT-PCR reakcióelegy komponensei.

Reagens	Mennyiség (µl) 1 reakcióhoz
Nukleáz-mentes H ₂ O	12,15
1-step RT-PCR puffer (5×)	5
MgCl ₂ (25mM)	1,25
dNTP (10mM)	1
Forward primer (10 µM)	1
Reverse primer (10 µM)	1
Próba (10 µM)	0,5
RNAse inhibitor	0,1
RT-PCR enzim mix	1
Templát RNS	2

5. táblázat: A qRT-PCR protokoll.

Lépés	°C	Időtartam	40× ismételve
Reverz transzkripció	50	30 perc	
Aktiváció	95	15 perc	
Denaturáció	95	20 mp	
Annealing	55	30 mp	
Extenzió	72	30 mp	

6. táblázat: A qRT-PCR vizsgálatokhoz használt primer és próba szekvenciák.

Primer/Próba		Hossz	Olvadáspont (°C)	Pozíció*	Szekvencia** (5' – 3')
Forward	JW12	19	49	55-73	ATGTAACACCYCTACAATG
Reverse	N165-146	20	53	165-146	GCAGGGTAYTTRTACTCATA
Próba***	LysGT1	29	62	81-109	ACAAGATTGTATTCAAAGTCA ATAATCAG

* A Pasteur vírustörzs genomja alapján (GenBank hozzáférési szám: M13215; Tordo és mtsai, 1988)

** Y: pirimidin bázis (timin vagy citozin); R: purin bázis (adenin vagy guanin)

*** Próba jelölés: 5'-6FAM 3'-TAMRA

A virális RNS mennyiségét a küszöbciklus (C_t , threshold cycle) és egy 6 tagú standard sor alapján lineáris regresszióval felvett kalibrációs görbe segítségével számítottuk ki. A standard sor felvételéhez egy ismert titerű CVS-11 vírusszuspenzióból kivont RNS-ből 10-es alapú hígítási sort készítettünk. Az FFA módszerrel való jobb összehasonlíthatóság érdekében az eredményeket TCID₅₀-ekvivalensben adjuk meg; kiemelve, hogy a két kvantifikációs eljárás közti lényeges különbségeket figyelembe kell venni az eredmények értékelésénél (ld. 6.1.).

4.5.5. Adatelemzés

Az antivirális tesztek eredeti lemezein megállapított fluoreszcencia-százalékos értékeket és a felülúszókból az FFA teszt segítségével mért titer-eredményeket a kísérlet három ismétlésének (n=3) átlaga ± SEM (az átlag standard hibája) formában közöljük. A qRT-PCR során kapott C_t értékekből a standard sor alapján kiszámított eredményeket a két párhuzamos minta átlaga ± SEM formában adjuk meg. Az egyes kísérleti csoportok adatainak összehasonlításához a Student-féle t-próbát használtuk; 5%-os szignifikancia-szint mellett ($P < 0,05$). A statisztikai elemzéseket az R szoftvercsomag 3.1.2. verziójával végeztük.

4.6. *In vivo* kísérleti szakasz

4.6.1. Állatmodell; az állatkísérletek körülményei

Az *in vivo* kísérleteket egérmodellen végeztük. Hathetes nőstény, SPF (specified pathogen free) státuszú C57Bl/6 egereket rendeltünk az Envigo Laboratories-tól (Casatenovo, Olaszország). Ezt a beltenyésztett egértörzset számos korábbi kutatásban (Huang és mtsai, 2014; Sugiura és mtsai, 2011; Park és mtsai, 2006; Li és mtsai, 2012; Dorfmeier és mtsai, 2012) használták az emberi veszettség modellezésére. Az állatokat BSL-3 biztonsági szintű állatházban (ld. 4.1.), HEPA-szűrős egyedi szellőztetéssel ellátott polikarbonát rágcslótartó dobozokban helyeztük el. Az egereknek az autoklávozható gyári rágcslótápot és az ivóvizet *ad libitum* jelleggel biztosítottuk. A tartási hőmérsékletet 22°C-ra, a relatív páratartalmat 50%-ra állítottuk be; a megvilágítási periódus 12 óra volt. A kísérletek megkezdése előtt az állatok számára 1 hét akklimatizációs időt biztosítottunk.

Az egerek veszettség okozta szükségtelen szenvedésének elkerülése érdekében a kórlefolyás humánus végpontját elérő állatoknál eutanáziára került sor, amelyet izoflurán narkózisban történő cervikális diszlokációval végeztünk. A humánus végpontot a Healy és mtsai (2013) által leírt klinikai értékelőrendszer alapján határoztuk meg (**7. táblázat**), a vad-típusú RABV-fertőzés 3-as klinikai stádiumaként (hátsó testfél bénulása és súlyos görcsök).

7. táblázat: Klinikai pontozásos értékelőrendszer különböző lyssavírusokkal fertőzött C57Bl/6 egerekre (Healy és mtsai, 2013). Kísérleteinkben vad-típusú RABV-t (SHBRV-18) használtunk, a humánus végpontot a 3. stádiumban határoztuk meg.

Klinikai stádium	Klinikai tünetek Labor-adaptált RABV	Klinikai tünetek vad-típusú RABV	Klinikai tünetek EBLV-1	Klinikai tünetek EBLV-2
0	Nincs tünet	Nincs tünet	Nincs tünet	Nincs tünet
1	Borzolt szőrzet Púposított hát Az inokulált láb bénulása	Izomrángás a beoltott lábban Borzolt szőrzet Púposított hát Az inokulált láb bénulása	Izomrángás a beoltott lábban Borzolt szőrzet Púposított hát Az inokulált láb bénulása	Izomrángás a beoltott lábban Borzolt szőrzet Púposított hát Az inokulált láb bénulása
2	Megváltozott viselkedés (lassú vagy körkörös mozgások)	Görcsök	Görcsök	Megváltozott viselkedés (lassú vagy körkörös mozgások)
3	Hátsó testfél bénulás	Hátsó testfél bénulás Súlyos görcsök	Hátsó testfél bénulás Súlyos görcsök	Hátsó testfél bénulás
4	Progresszív bénulás	Progresszív bénulás	Progresszív bénulás	Progresszív bénulás
5	Levertség, elfekvő állapot. Elhullás	Levertség, elfekvő állapot. Elhullás	Levertség, elfekvő állapot. Elhullás	Levertség, elfekvő állapot. Elhullás

Az állatkísérletek során minden eljárás a hatályos magyar jogszabályoknak és Európai Unió irányelveknek megfelelően történt. A vizsgálatokat a Pest Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága engedélyezte (állatkísérleti engedély száma: PEI/001/77-2/2014). A Brno-i partnerintézményben végzett kísérletek a Cseh Köztársaság Földművelésügyi Minisztériuma által kiadott, MZe 1627 számú engedély birtokában zajlottak.

4.6.2. Az állatok fertőzése és kezelése; a kísérleti protokoll

Vizsgálataink során három különböző egérkísérletet végeztünk. Az egyes kísérletekben különböző számú vizsgálati csoportra volt szükség; ennek megfelelően az elsőben 70, a másodikban 96, a harmadikban pedig 39 egér vett részt. Az állatokat online randomizáló szoftver (<https://www.random.org/sequences>) segítségével véletlenszerűen soroltuk különböző kísérleti csoportokba. A vírussal fertőzött és kezelt csoportokon kívül víruskontroll (fertőzött, nem kezelt) és hatóanyag-kontroll (nem fertőzött, kezelt) csoportokat állítottunk fel. Egyhetes akklimatizáció után az egereket izoflurán anesztéziában, SHBRV-18 vírussal fertőztük. Az 50 µl vírusszuszpenziót intramuszkulárisan (im.), a bal hátsó láb tömeges izmaiba oltottuk. A hatóanyag-kontroll csoportok egereibe vírus helyett PBS-t injektáltunk. Az első kísérletben LD₅₀, míg a második és harmadik kísérletben LD₁₀₀ mennyiségű vírussal fertőztük az állatokat. Kutatási partnereink által azonos állatmodellel és vírustörzsszel elvégzett előkísérletek alapján ezek 10^{5,2} TCID₅₀/ml (10^{3,9} TCID₅₀/egér), illetve 10^{6,8} TCID₅₀/ml (10^{5,5} TCID₅₀/egér) vírudózist jelentenek. Az oltóvírus titerét minden esetben ellenőriztük a fertőzés napján N2a sejteken végzett visszatitrálással, amit a 4.5.3. fejezetben részletezett FFA módszerrel végeztünk el, az eredményeket Spearman-Kärber módszerrel meghatározva.

Az első és második kísérletben a vizsgált hatóanyag-kombinációkkal történő kezeléseket három eltérő időpontban kezdtük meg, ennek megfelelően három-három hatóanyag-kontroll, valamint fertőzött-kezelt csoportot alakítottunk ki. A „-4h” csoportokban az első kezelést pre-expozíciósan, a fertőzést megelőzően 4 órával végeztük; a „48h” csoportokban 2 nappal, míg a „96h” csoportokban 4 nappal a vírus beadását követően kezdtük a kezelést. A hatóanyagok keverékét naponta egyszer, PBS-sel 1 ml-re kiegészített végtérfogatban, intraperitoneálisan (ip.) adtuk be az egereknek; az első kísérletben 8, a másodikban és harmadikban 10 napon keresztül. A harmadik egérkísérletben csak egyféle kezelési sémát használtunk: minden kezelt állatnak 96 órával a fertőzés után kezdtük adagolni a szereket. A hatóanyagok kezelésekhöz használt koncentrációit kutatási partnereink előkísérletei alapján választottuk ki. Mindhárom kísérletben a víruskontroll csoportokhoz tartozó egerekbe hatóanyagok helyett 1 ml PBS-t injektáltunk. A csoportok beosztása a különböző kísérletekre vonatkozóan az **8. táblázatban** látható.

8. táblázat: Kísérleti csoportok és a terápiás hatóanyag-kombinációk.

Első kísérlet (n=70)			
Csoportok		egerek létszáma/csoport	
<i>kezelés kezdete</i>		-4h*	48h PI
<i>csoport típusa</i>			96h PI
Víruskontroll (fertőzött, nem kezelt)		13	
Hatóanyag kontroll (nem fertőzött, kezelt)		6	6
Fertőzött-kezelt		13	13
Kombinációs kezelés			
<i>hatóanyag</i>	<i>oldószer</i>	<i>koncentráció (/egér/nap)</i>	
TNF- α gátló (infiximab)	aqua dest. pro injectione**	0,1 mg	
CASP-1 gátló (Ac-YVAD-cmk)	DMSO	0,2 mg	
MAP kináz gátló (sorafenib)	DMSO	0,6 mg	
Második kísérlet (n=96)			
Csoportok		egerek létszáma/csoport	
<i>kezelés kezdete</i>		-4h*	48h PI
<i>csoport típusa</i>			96h PI
Víruskontroll (fertőzött, nem kezelt)		26	
Hatóanyag kontroll (nem fertőzött, kezelt)		6	6
Fertőzött-kezelt		13	13
HRIG kontroll***		13	
Kombinációs kezelés			
<i>hatóanyag</i>	<i>oldószer</i>	<i>koncentráció (/egér/nap)</i>	
TNF- α gátló (infiximab)	aqua dest. pro injectione	0,1 mg	
CASP-1 gátló (Ac-YVAD-cmk)	DMSO	0,2 mg	
MAP kináz gátló (sorafenib)	DMSO	0,6 mg	
HRIG	aqua dest. pro injectione	0,8 IU	
Harmadik kísérlet (n=39)			
Csoportok		egerek létszáma/csoport	
<i>kezelés kezdete</i>			96h PI
<i>csoport típusa</i>			
Víruskontroll (fertőzött, nem kezelt)			13
Hatóanyag kontroll (nem fertőzött, kezelt)			13
Fertőzött-kezelt			13
Kombinációs kezelés			
<i>hatóanyag</i>	<i>oldószer</i>	<i>koncentráció (/egér/nap)</i>	
TNF- α gátló (infiximab)	injekcióhoz való víz	0,1 mg	
MAP kináz gátló (sorafenib)	cremophor EL és etanol (5%-5%) vizes oldata ¹	0,6 mg	
HRIG	injekcióhoz való víz	0,8 IU	
ribavirin	PBS	3 mg	
favipiravir	2,9%-os NaHCO ₃ oldat ²	6 mg	
IFN- α , IFN- β	PBS	6000 - 6000 IU	
mannit****	PBS	500 μ l 25%-os oldat	

* fertőzés előtt; ** infiximabhoz mellékelte; *** HRIG monoterápiával kezelt kontrollcsoport; **** a többi hatóanyag beadása után 30 perccel; n: az egerek összlétszáma az adott kísérletben; PI: fertőzés után

¹ Liu és mtsai, 2006; Fendrich és mtsai, 2012; Sonntag és mtsai, 2014

² Gowen és mtsai, 2013; Westover és mtsai, 2015

Az első kísérletben a kombinációs kezelés három gyulladáscsökkentő, immunmoduláns hatóanyagot tartalmazott: MAP-kináz gátló (sorafenib), TNF- α -gátló (influximab), és CASP-1-gátló (Ac-YVAD-cmk) szereket. A második kísérletben az előbbi kombinációt veszettség elleni humán ellenanyagokat tartalmazó hiperimmun savóval (HRIG) egészítettük ki. A harmadik kísérletben mindezekén felül az *in vitro* kísérleti szakaszban antivirális hatást mutató szereket is hozzáadtuk a kombinációhoz (egér-specifikus I-es típusú interferonokat, ribavirint és favipiravirt), továbbá a vér-agy gát ozmotikus elven történő megnyitása céljából mannittal is kezeltük az egereket (**8. táblázat**). Az 500 μ l 25%-os mannitot a napi kezelések után 30 perccel, ip. adtuk be az állatoknak (a víruskontroll csoportnak pedig ugyanígy 500 μ l PBS-t mannit helyett).

Az egerek testtömegét a fertőzés napjától kezdve minden nap megmértük, klinikai állapotukat pedig naponta kétszer ellenőriztük (a kezelések előtt reggel, és késő délután). A veszettség kórlefolyása szempontjából megállapított humánus végpontot (**7. táblázat**) elért állatokat extermináltuk (ld. 4.6.1.), majd mintákat vettünk belőlük virológiai és kórszövettani-immunhisztokémiai vizsgálatokra. A jobb agyféltekét és a nyaki gerinc területéről egy 2-3 csigolyának megfelelő hosszúságú gerincvelő-szakaszt PBS-be helyeztünk és homogenizáltunk; a májat, a lépet, a szívet, a bal agyféltekét és egy 6-7 csigolyányi szakaszt a gerincvelő thoracolumbaris szakaszából formalinnal fixáltunk. A kísérletek utolsó, 28. napján minden túlélő egeret leöltünk mintavétel és további vizsgálatok céljából.

4.6.3. Reverz transzkripció real-time PCR (qRT-PCR) vizsgálatok (SyBR Green)

A kísérleti egerek idegrendszeri mintáiban a RABV-specifikus RNS mennyiségét qRT-PCR módszerrel határoztuk meg. A nukleinsav kivonása az agy- és gerincvelő-homogenizátumokból a 4.5.4. pontban leírtaknak megfelelően történt. A reakciót SyBR Green rendszerben, a Verso 1-step RT-qPCR SYBR Green ROX Kit-el (Thermo Scientific) egy Rotor-Gene Q 5plex HRM (Qiagen) készülékben végeztük el, olvadáspont-analízissel kiegészítve. A PCR rendszer paraméterei a **9. és 10. táblázatokban** láthatók.

9. táblázat: A qRT-PCR reakcióelegy komponensei.

Reagens	Mennyiség (μ l) 1 reakcióhoz
Nukleáz-mentes H ₂ O	2,7
2 \times RoxMix	7,5
RT Enhancer	0,75
Verso Enzim mix	0,15
Forward primer (10 μ M)	1,2
Reverse primer (10 μ M)	1,2
Templát RNS	1,5

10. táblázat: A qRT-PCR protokoll.

Lépés	°C	Időtartam	
Reverz transzkripció	50	15 perc	
Aktiváció	95	15 perc	
Denaturáció	94	15 mp	40 \times ismételve
Annealing	55	30 mp	
Extenzió	72	30 mp	
Olvadáspont-analízis	50-95	30 mp / 0,5°C lépés	

Az agyi és gerincvelői minták virális RNS kópiaszámait a C_t értékekből egy (meghatározott RNS-tartalmú, *in vitro* transzkripcióval előállított standard SHBRV-18 nukleinsav 10-es alapú hígítási sora alapján felvett) hatpontos kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg. Minden minta esetében az eredményeket két párhuzamos mérés átlaga adta.

4.6.4. Kórszövetteni és immunhisztokémiai vizsgálatok

A kísérletek során az egerektől gyűjtött formalinnal fixált mintákat paraffinba ágyasztuk, majd 4 μm vastagságú metszeteket készítettünk belőlük. A metszeteket a RABV-specifikus antigének *in situ* kimutatásával IHK vizsgálatoknak vetettük alá, továbbá hematoxylin-eozin festéssel is vizsgáltuk. Az IHK festéshez a metszeteket deparaffináltuk, majd az antigéneket 0,05%-os proteáz XIV oldattal (Sigma-Aldrich) tártuk fel, 37°C-on 5 percig. A tárgylemezeket 3%-os H_2O_2 -oldatban 10 percig inkubáltuk, ezután 20 percig Vectastain blokkoló oldattal (Vector Laboratories, Burlingame, USA) kezeltük a nem-specifikus kötőhelyek blokkolása céljából. A FITC-el konjugált, a veszettség nukleoproteinjére specifikus monoklonális ellenanyagokat (No. 5199i, Chemicon International, Temecula, USA) 400 \times -os hígításban adtuk a metszetekhez, amelyeket egy éjszakán át 37°C-on inkubáltunk. Az ellenanyagok kötődését az ABC peroxidáz rendszerrel detektáltuk (Vectastain ELITE ABC Peroxidase Kits Goat IgG 1 kit PK6105, Vector Laboratories) a gyártó utasításai szerint.

A metszetek vizsgálata során a KIR egyes területein a vírus okozta agyvelőgyulladás jeleit (mononukleáris sejtes beszűrődés, limfocitás érköpeny) kerestük és megfigyeltük ezen területeken a RABV antigénjeinek mennyiségét. A kiértékelés szemi-quantitatívan történt (-/+/++/+++) két független bíráló eredményeinek átlaga alapján. A bírálati szempontrendszert a kutatási projektben résztvevő partnerintézmények patológusai dolgozták ki, meghatározva az egyes fokozatok számszerű kritériumait (vírusfertőzött sejtek, illetve gyulladós sejtek száma látóterenként). Ugyanezen szakemberek voltak felelősek a szakszerű kiértékelésért is.

4.6.5. Fluoreszcens vírusneutralizációs próba (FAVN)

Szerológiai vizsgálat céljából az első kísérlet végéig túlélő vírusfertőzött egerekből az eutanázia előtt vért vettünk. A vérsavómintákat 56°C-on 30 percig inaktiváltuk, majd fluoreszcens vírusneutralizációs (FAVN) próbával határoztuk meg a veszettség elleni neutralizáló ellenanyagok mennyiségét. A tesztet az OIE Terrestrial Manual (2018) leírása alapján végeztük el: a savókat 3-es alapú, míg a vírust 4-es alapú hígítással, négy párhuzamos sorban titráltuk, és kontrollként a 0,5 IU (nemzetközi egység)/ml titerű OIE referencia savót is vizsgáltuk. A savóhoz 100 TCID₅₀ mennyiségű CVS-11 veszettségvírust adtunk, amit 1 óra inkubáció követett 37°C-on a vírus neutralizálása céljából. Ezután a lemezek minden mélyedésébe 50 μl 2×10^4 BHK-21 sejtet tartalmazó sejtszuszpenziót mértünk, majd a lemezeket további 48 órán át inkubáltuk (37°C, 5% CO_2). Az inkubációt követően a lemezeket acetonnal fixáltuk, fluoreszcens jelölésű ellenanyaggal festettük, és fluoreszcens

mikroszkóppal vizsgáltuk (ld. 4.5.2.). Az ellenanyag-szinteket a minták és OIE referencia savó titrálási eredményei alapján számítottuk ki.

4.6.6. Adatelemzés

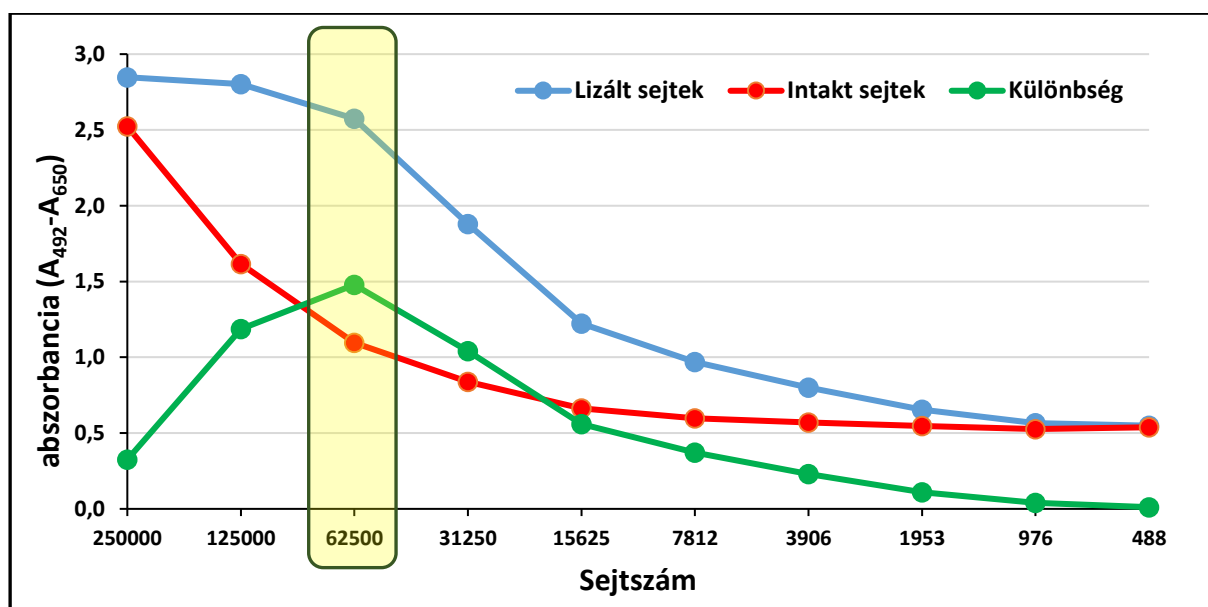
A különböző egércsoportok Kaplan-Meier túlélési görbéinek statisztikai elemzéséhez a Mantel-Cox (log-rank) tesztet használtuk. A csoportokban tapasztalt túlélési arányokat Fisher-féle egzakt próbával hasonlítottuk össze. Az idegrendszeri mintákban a virális RNS-szintek csoportok közti összehasonlítását a Kruskal-Wallis próbával (Dunn-teszttel kiegészítve) végeztük el, míg egyéb esetekben (pl. túlélő és elpusztult egerek, vagy agyminták és gerincvelőminták összehasonlítása) a Mann-Whitney-féle U-próbát használtuk. A veszettség-specifikus antigénmennyiségek szemikvantitatív adatainak összehasonlítását (IHK vizsgálat) Fisher-féle egzakt próbával végeztük el. A vírusneutralizációs próbában kapott ellenanyag-titerek átlagainak összehasonlításához Student-féle t-próbát használtunk. A szignifikancia szintje minden esetben $P < 0,05$ volt. A statisztikai vizsgálatokat a GraphPad Prism 5.04 szoftverrel végeztük el.

5. Eredmények

5.1. *In vitro* kísérleti szakasz

5.1.1. Citotoxicitás-vizsgálat

A kutatásba bevont hatóanyagok vírusellenes hatásvizsgálataiban használt hígításokat citotoxicitás-vizsgálat alapján választottuk ki: a tesztanyagok 5%-nál kisebb citotoxicitást okozó legmagasabb koncentrációit, valamint azok 10×-es, 100×-os és 1000×-es hígításait használtuk. Első lépésként meghatároztuk, hogy a kísérlethez N2a sejtek esetén az optimális sejtkoncentráció $6,25 \times 10^4$ sejt/ml, amelynél az elhalt és élő sejtek laktát-dehidrogenáz-kibocsájtása között a legnagyobb különbség mérhető (**8. ábra**). A rekombináns egér IFN- α és - β , ribavirin, favipiravir és sorafenib törzsoldataiból 10-es alapú hígítási sort készítve mértük az egyes hígítások citotoxikus hatását és megállapítottuk a hatóanyagok 50%-os citotoxikus koncentrációját (CC_{50}) (**11. táblázat**).



8. ábra: Az optimális N2a sejtszám meghatározása a citotoxicitás-vizsgálathoz.

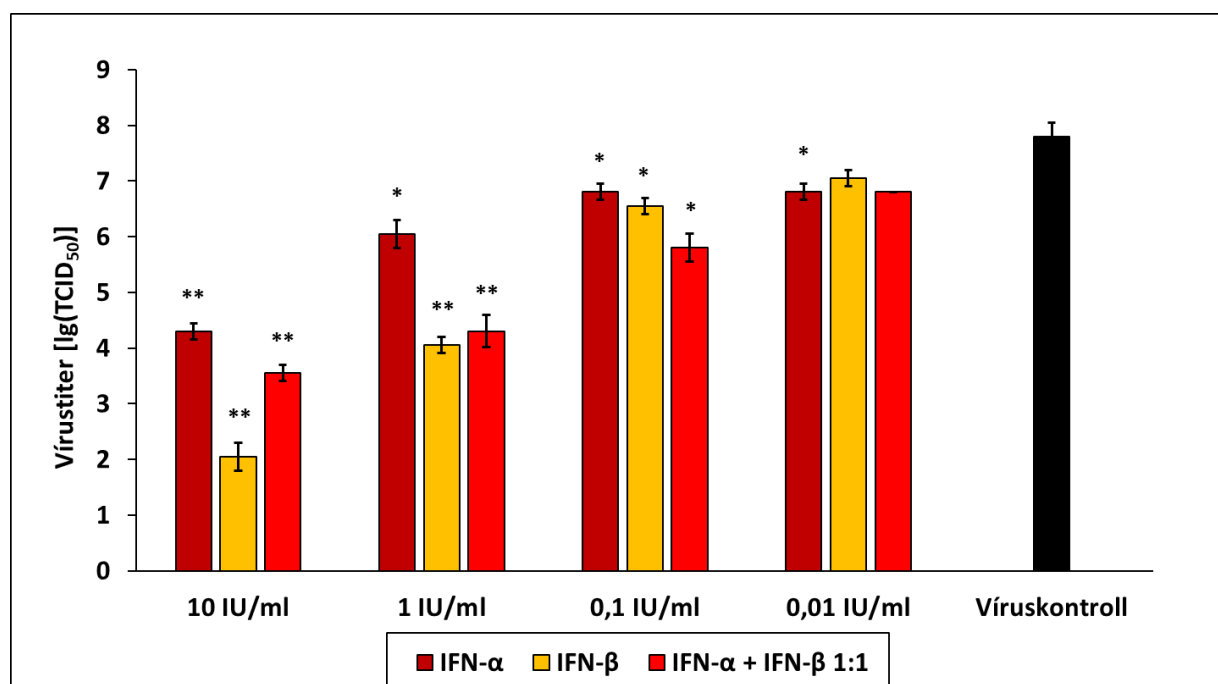
11. táblázat: A tesztanyagok CC_{50} értékei és legmagasabb nem citotoxikus koncentrációja.

Hatóanyag	50%-os citotoxikus koncentráció (CC_{50})	Legmagasabb, nem citotoxikus koncentráció (citotox.<5%)
IFN- α	751,56 IU/ml	10 IU/ml
IFN- β	472,46 IU/ml	10 IU/ml
Ribavirin	934,05 μ g/ml	10 μ g/ml
Favipiravir	1610,15 μ g/ml	10 μ g/ml
Sorafenib	580,10 μ M	50 μ M

5.1.2. Az I-es típusú interferonok antivirális hatása

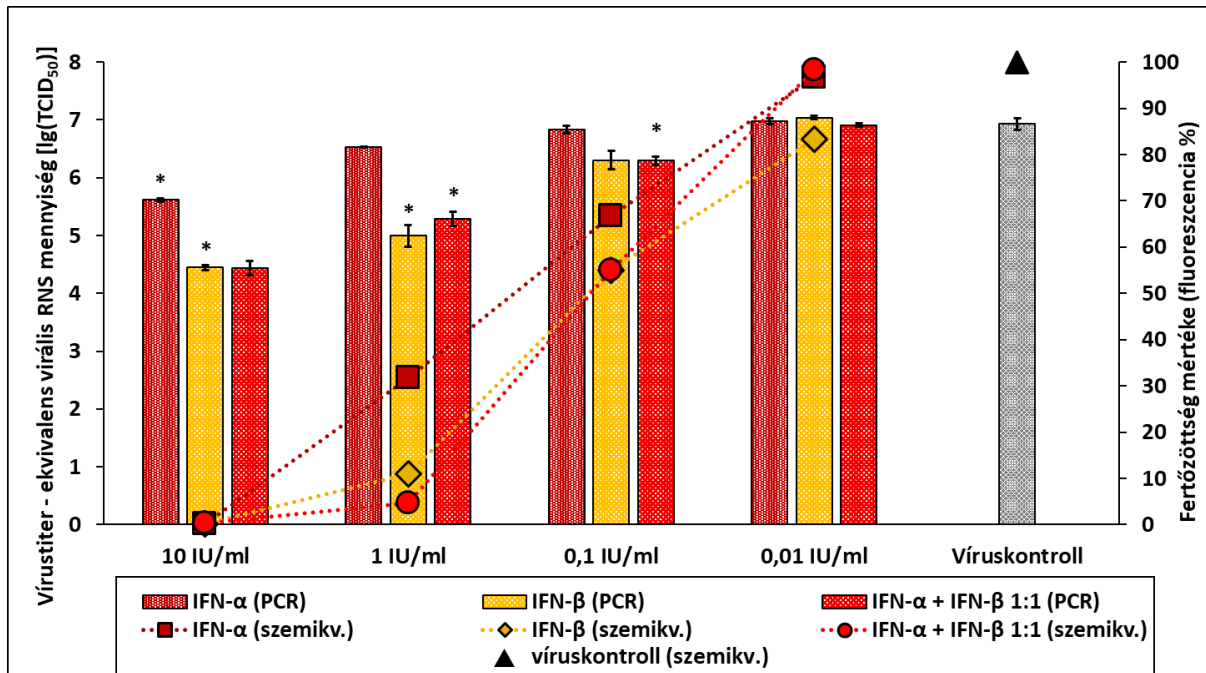
A vírusellenes hatást először szemikvantitatív módon értékeltük (a vizsgálati lemezek egyes mélyedéseiben megfigyelhető fluoreszcencia szintjének %-os becslésével), majd a hatás mértékét FFA és qRT-PCR módszerrel határoztuk meg. Mindhárom módszer azt mutatta, hogy az I-es típusú interferonok – az IFN- α és - β egyaránt – jelentősen csökkentették a veszettségvírus replikációját N2a sejtekben. A hatás koncentrációfüggő: a legnagyobb mértékű csökkenést a legmagasabb, 10 IU/ml koncentrációval lehetett elérni, míg a további hígítások mérsékeltebb gátlóhatást váltottak ki.

Az IFN- α esetében a 10 IU/ml koncentráció FFA módszerrel vizsgálva (9. ábra) 3,5 nagyságrendnyi (\log_{10}) csökkenést okozott a vírustiterben a kezeltlen (vírus)kontrollhoz képest, míg 1 IU/ml-nél 1,75 log csökkenést mértünk. A 0,1 és 0,01 IU/ml esetében megállapított 1-1 log különbség még mindig szignifikánsan alacsonyabb a víruskontrollnál ($P=0,0366$).



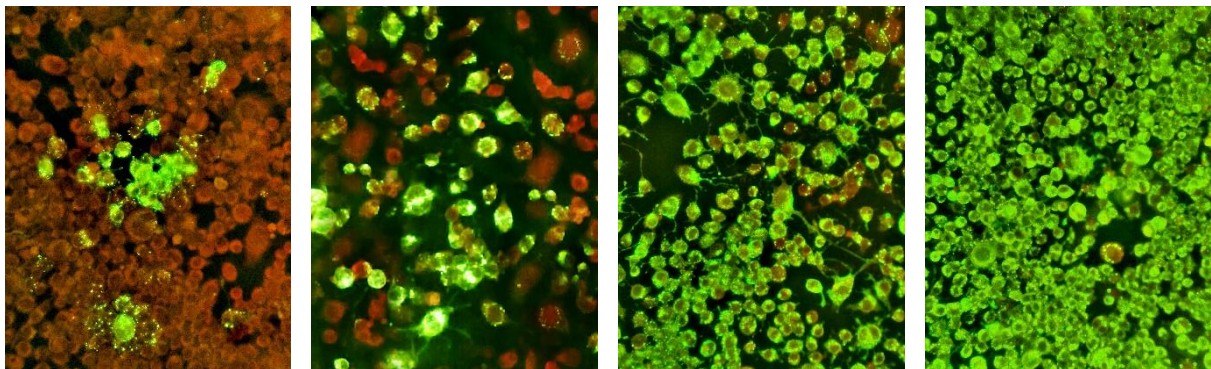
9. ábra: Az I-es típusú interferonok RABV elleni antivirális hatása, FFA teszttel vizsgálva. Átlag \pm SEM (n=3). Szignifikancia szintek: * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$ (a víruskontrollhoz képest)

Ugyanezen minták TaqMan qRT-PCR-el meghatározott RNS-kópiaszámok is hasonló eredményt adtak, bár TCID₅₀-ekvivalens értékekben kifejezve a különbségek kisebbek voltak. A szemikvantitatív vizsgálat szintén azonos tendenciát mutatott: magasabb IFN- α koncentrációk mellett kevesebb (<1% és kb. 32%), alacsonyabb dózisonál több (kb. 67% és 97%) fluoreszcens (vírusfertőzött) sejt volt megfigyelhető. A víruskontroll közel 100%-os fertőzöttséget mutatott (10. ábra).



10. ábra: Az I-es típusú interferonok RABV elleni antivirális hatása, qRT-PCR-rel vizsgálva és a sejtenyészetek fertőzöttségi arányának szemikvantitatív értékelése alapján. PCR eredményeknél: Átlag ± SEM (n=3). Szignifikancia szintek: * P<0,05 (a víruskontrollhoz képest)

Az IFN-β a két magasabb koncentrációban igen jelentős gátlóhatást váltott ki a RABV replikációjára: a sejtekhez 10 IU/ml-t hozzáadva 5,75 log; 1 IU/ml mellett 3,75 log vírustiter-csökkenést okozott az FFA vizsgálatok szerint (9. ábra). Az IFN-α eredményeihez képest ez számottevően erősebb effektust jelent (P=0,0035 és P=0,0050 a két I-es típusú IFN-t összehasonlítva). A két további hígításnál (0,1 és 0,01 IU/ml) a víruskontrollhoz képest 1,25 log, valamint 0,75 log eltérés volt mérhető (ez utóbbi különbség már nem szignifikáns: P=0,0754). A PCR eredmények és a becsült fertőzöttségi ráta (fluoreszcencia %) szintén jelentős vírusellenes hatást jeleznek a 10, illetve 1 IU/ml-es koncentrációkban, míg az IFN-β-t 0,1 és 0,01 IU/ml-ben használva a hatás enyhébb (10. ábra, 11. ábra).



11. ábra: Fertőzöttségi arány szemikvantitatív vizsgálata IFN-β kezelés hatására. Balról jobbra: 1 IU/ml kezelés (10%); 0,1 IU/ml (60%); 0,01 IU/ml (90%); víruskontroll (100%). Immunfluoreszcens festés, 200× nagyítás. Zöld szín: a RABV N fehérje a sejtekben. Vörös szín: nem fertőzött N2a sejtek.

Bár a kutatásban szereplő tesztanyagok különböző kombinációinak vizsgálatára külön kísérleteket végeztünk (ld. 5.1.6.), az IFN- α és - β 1:1 arányú keverékét az önálló hatóanyagok vírusellenes hatását tesztelő első kísérleti blokkban vizsgáltuk. Ennek oka az volt, hogy így csökkenthetjük a lehetséges kombinációs kezelések számát azzal, hogy csak a RABV szaporodását legerősebben gátló interferont (IFN- α , IFN- β , vagy – szinergista hatás esetén – az I-es típusú IFN-ok keveréke) kombináljuk a többi antivirális szerrel. Az elvégzett kísérletek azt mutatták, hogy a kétféle IFN együttes használatával nem fokozható a veszettség elleni hatás. FFA vizsgálattal (**9. ábra**) az IFN- α és - β közötti eredményt kaptunk a két magasabb koncentrációban (5-5 UI/ml és 0,5-0,5 IU/m): a vírustiteret 4,25 illetve 3,5 nagyságrenddel csökkentek (ebből az első érték szignifikánsan eltér az IFN- β eredményétől, a második nem). Mindkét IFN-ből 0,05 IU/ml-t adva a sejtekhez a RABV-gátló hatás valamivel meghaladta az egyedi IFN-okét (2 log csökkenés), de az eltérés csekély ($P=0,0753$ az IFN- β -hoz hasonlítva). A legalacsonyabb koncentráció (0,005-0,005 IU/ml) nem csökkentette szignifikánsan a vírusreplikációt (1 log; $P=0,0572$). A PCR vizsgálat és a fertőzöttség szemikvantitatív értékelése hasonló eredményt adott (**10. ábra**). Mindezek alapján úgy döntöttünk, hogy a későbbi, kombinációs kezelést vizsgáló kísérletekbe csak az IFN- β -t vonjuk be az I-es típusú IFN-ok közül.

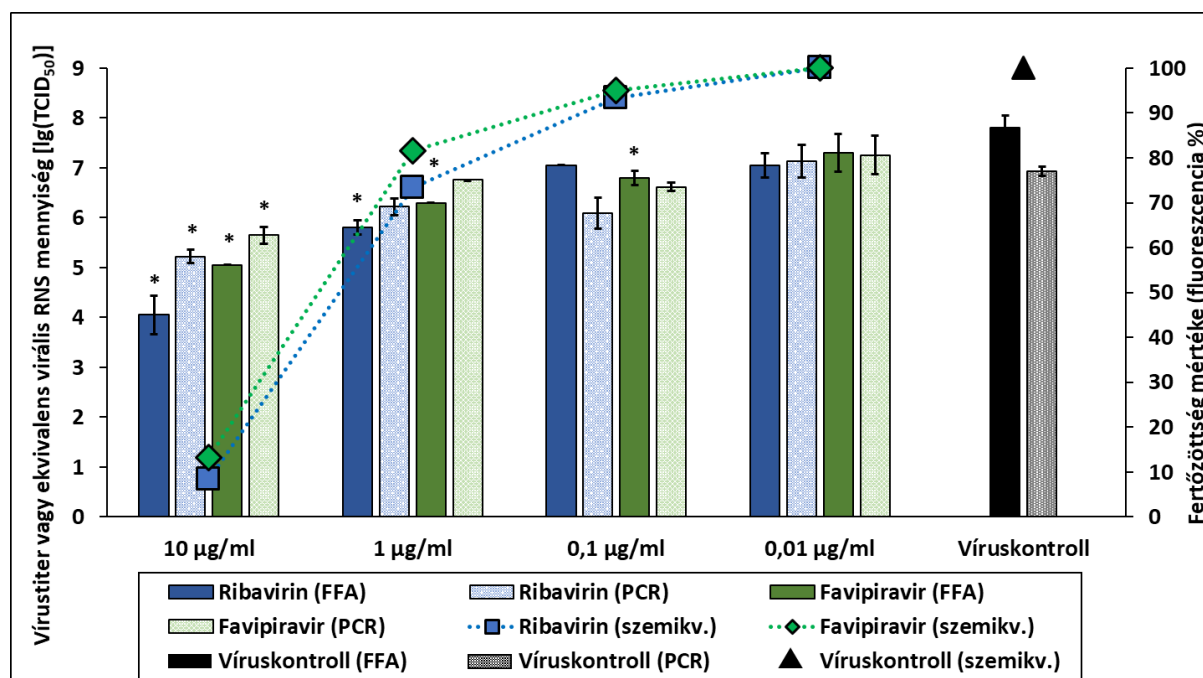
5.1.3. A ribavirin és a favipiravir antivirális hatása

A ribavirin és a favipiravir az RNS vírusok széles köre ellen hatásos antivirális szer. Hatásmechanizmusuk egyes elemei hasonlóak (ld. 3.8. és 3.9.). Az N2a sejteken végzett citotoxicitás-vizsgálat eredménye alapján azonos koncentrációkban használtuk a két hatóanyagot az *in vitro* kísérletekben (**11. táblázat**, ld. 5.1.1.). Ezen okok miatt célszerű eredményeiket együtt tárgyalni és egymással összehasonlítani.

Mindkét hatóanyag veszettség elleni koncentrációfüggő antivirális hatását sikerült igazolni (**12. ábra**). FFA vizsgálataink alapján a legalacsonyabb, 0,01 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjuk ugyan nem gátolta számottevően a RABV szaporodását a víruskontrollhoz képest, de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ favipiravir már szignifikáns ($P=0,0366$), 1 log csökkenést okozott a vírustiterben. A ribavirin csak a két magasabb koncentrációban (10 és 1 $\mu\text{g/ml}$) volt egyértelműen hatékony: 3,75 log, illetve 2 log értékkel alacsonyabb vírusrészeséget mértünk a kezelt mintákban, mint a kontrollban. Ez a RABV-ellenes aktivitás kissé meghaladta az azonos dózisú favipiravirét, amelynél a 10 $\mu\text{g/ml}$ -es oldat 2,75 log, míg az 1 $\mu\text{g/ml}$ -es 1,5 log RABV-titercsökkenést okozott. A ribavirin és a favipiravir eredményei között nincs szignifikáns különbség, azonban a magasabb dózisokban mindkét hatóanyag gátlóhatása gyengébb, mint az IFN- β -é.

Az FFA eredményekhez hasonlóan a qRT-PCR vizsgálatok is kimutatták az antivirális hatást, azonban a minták és a kontroll RNS kópiaszámaiból számított RABV-titeret kisebb különbségeket mutattak. Ezért az eltérés ezzel a módszerrel csak 10 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációnál

bizonyult szignifikánsnak a ribavirin és a favipiravir esetében is. A sejtenyészetek szemikvantitatív vizsgálatát itt is elvégeztük, ami szintén megmutatta, hogy csak a két hatóanyag töményebb oldatai csökkentik érdemben a fertőzöttséget.



12. ábra: A ribavirin és a favipiravir RABV elleni antivirális hatása, FFA teszttel, qRT-PCR-rel és szemikvantitatíven (sejtek fertőzöttségi aránya) vizsgálva. Átlag ± SEM (n=3).

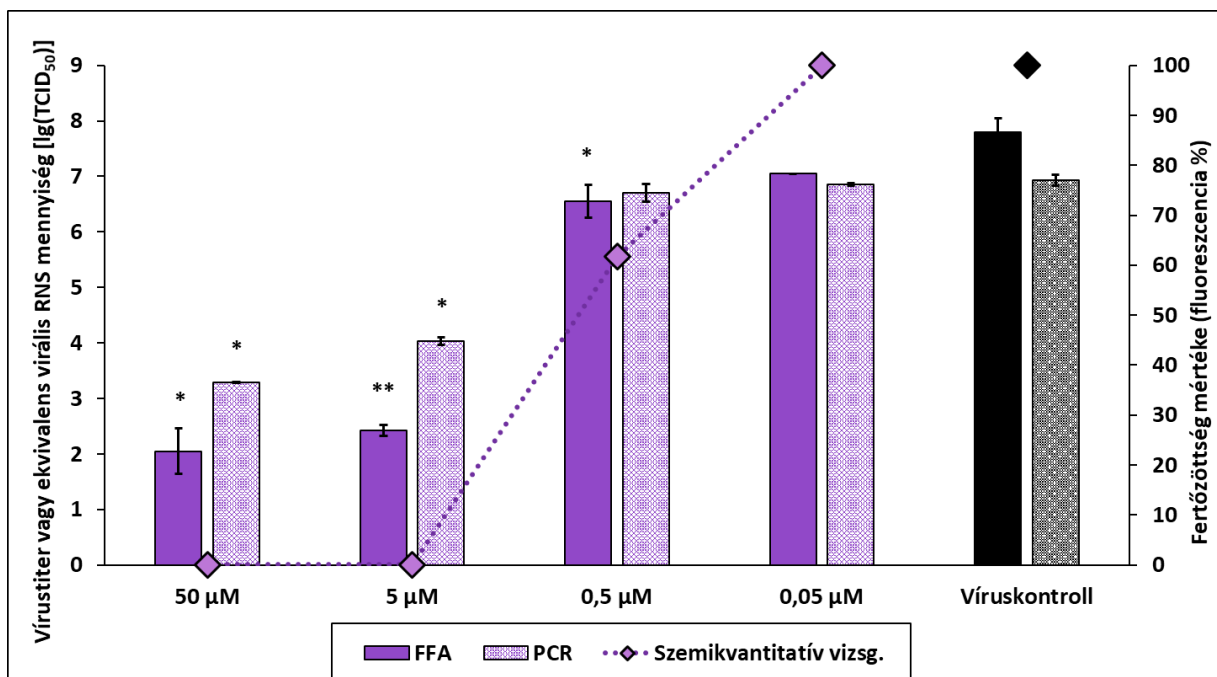
Szignifikancia szintek: * P<0,05 (a víruskontrollhoz képest)

5.1.4. A sorafenib antivirális hatása

A kinázgátló sorafenib a vizsgált két magasabb koncentrációban (50 µM és 5 µM) kiemelkedő mértékben csökkentette a kezelt sejtenyészetekben a veszettségvírus szaporodását (**13. ábra**). 50 µM sorafenibet adva a sejtekhez az FFA vizsgálatok 5,75 log csökkenést mutattak ki, amely megegyezik az IFN-β 10 IU/ml-es koncentrációjának vírusellenes hatásával. Tízszeres hígításban (5 µM) használva a szert még mindig igen jelentősen, 5,37 log értékkel alacsonyabbnak találtuk a vírustitert a kezeletlen kontrollnál. Ez nagymértékben meghaladja az 1 IU/ml IFN-β hatását (P=0,0039). A következő, 0,5 µM sorafenib-koncentráció azonban sokkal gyengébb gátlóhatást váltott ki: a vírusrészecske mennyiség csökkenése mindössze 1,25 log volt (a víruskontrollhoz képest ez még szignifikáns eltérés: P=0,0366). A legkisebb sorafenib-tartalmú oldat (0,05 µM) nem befolyásolta a RABV replikációját.

A sorafenib antivirális hatását real-time PCR-rel vizsgálva azt állapítottuk meg, hogy a RABV-specifikus RNS kópiaszámok (illetve az ebből számolt ekvivalens titerértékek) szorosan követik az FFA eredményeket. Bár a kalkulált vírustiterek és a kontroll különbsége – a többi hatóanyagnál tapasztaltakhoz hasonlóan – kisebb volt, mint az FFA teszténél, a tendencia

azonos. A két magasabb koncentráció nagymértékben csökkentette a vírusrésztartalmat (3,64 log – 50 µM; 2,89 log – 5 µM), míg a következő hígítás jóval kisebb csökkenést okoz (0,23 log, amely már nem szignifikáns). A 0,05 µM hatóanyag-tartalmú oldat hatása elhanyagolható volt. Az eredeti vizsgálati lemezt fluoreszcensen festve szemikvantitatívan is vizsgáltuk a fertőzöttség mértékét. Az 50 µM és 5 µM sorafenibbel kezelt sejtenyészetekben a fluoreszcens sejtek aránya nagyon alacsony, 1% alatti volt; a 0,5 µM koncentráció kb. 60%-ra csökkentette a fertőzöttséget. 0,05 µM sorafenib használata esetén nem volt látható csökkenés a víruskontrollhoz képest.



13. ábra: A sorafenib RABV elleni antivirális hatása, FFA teszttel, qRT-PCR-rel és szemikvantitatíven (sejtek fertőzöttségi aránya) vizsgálva. Átlag ± SEM (n=3).

Szignifikancia szintek: * P<0,05; ** P<0,001 (a víruskontrollhoz képest)

5.1.5. A hatóanyagok antivirális hatásának összehasonlítása

A hatóanyagok legmagasabb nem citotoxikus koncentrációinak vírusellenes hatását az FFA vizsgálatok alapján hasonlítottuk össze: a statisztikai elemzés eredményei az **12. táblázatban** láthatók. A kezelt sejtenyészetekben mért vírustiterok logaritmikus értékéből és a víruskontroll eredményéből kiszámítottuk a szerek egyes koncentrációinak RABV elleni relatív gátlóhatását (ld. 4.5.3.). A különböző koncentrációjú hatóanyagok antivirális hatása alapján megállapítottuk a veszettségvírus replikációjának gátlására vonatkozó IC₅₀ (50%-os gátló koncentráció) értékeket is (**13. táblázat**).

12. táblázat: A hatóanyagok antivirális hatásának páronkénti összehasonlítása (FFA teszt; legmagasabb koncentráció). Student-féle T próba P értékei; a csillagok a szignifikáns különbségeket jelzik (P<0,05)

	IFN- α	IFN- β	IFN- α + - β (1:1)	ribavirin	favipiravir	sorafenib
IFN- α		* 0,0035	* 0,0213	0,5903	* 0,0351	0,1169
IFN- β			* 0,0118	* 0,0164	* 0,0069	1,000
IFN- α + - β (1:1)				0,3213	* 0,0091	0,1825
ribavirin					0,1201	0,0789
favipiravir						0,1051
sorafenib						

13. táblázat: A hatóanyagok IC₅₀ értékei és különböző koncentrációik relatív gátlóhatása.

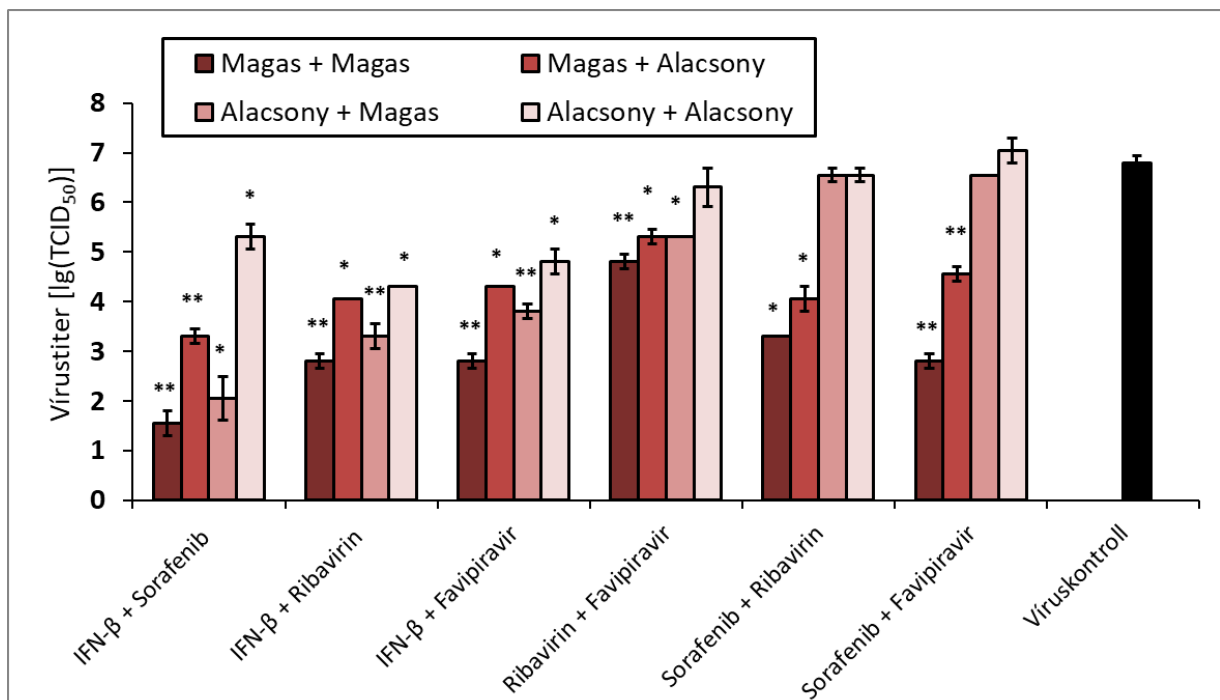
Hatóanyag	IC ₅₀	Koncentráció	Relatív gátlóhatás
IFN- α	28,415 IU/ml	10 IU/ml	44,87%
		1 IU/ml	22,43%
		0,1 IU/ml	12,82%
		0,01 IU/ml	12,82%
IFN- β	1,219 IU/ml	10 IU/ml	73,71%
		1 IU/ml	48,07%
		0,1 IU/ml	16,02%
		0,01 IU/ml	9,61%
IFN- α + IFN- β (1:1)	3,788 IU/ml	2 × 5 IU/ml	54,48%
		2 × 0,5 IU/ml	44,87%
		2 × 0,05 IU/ml	25,64%
		2 × 0,005 IU/ml	12,82%
ribavirin	14,322 μ g/ml	10 μ g/ml	48,07%
		1 μ g/ml	25,64%
		0,1 μ g/ml	9,61%
		0,01 μ g/ml	9,61%
favipiravir	792,166 μ g/ml	10 μ g/ml	35,25%
		1 μ g/ml	19,23%
		0,1 μ g/ml	12,82%
		0,01 μ g/ml	6,41%
sorafenib	3,333 μ M	50 μ M	73,71%
		5 μ M	68,90%
		0,5 μ M	16,02%
		0,05 μ M	9,61%

5.1.6. A kísérleti hatóanyagok kombinációinak antivirális hatása

A kísérletben szereplő hatóanyagoknak a veszettségvírus replikációját gátló hatását nem csak egyedileg, hanem kombinációban is vizsgáltuk. Az interferonok közül a kombinációs kísérletekbe csak az IFN- β -t vontuk be, mivel vírusellenes hatása meghaladta nemcsak az IFN- α -ét, de a két I-es típusú IFN 1:1 arányú keverékét is. A kombinációkat két-két különböző

antivirális szer alkotta az IFN- β , ribavirin, favipiravir és sorafenib közül, és az egyes hatóanyagoknak egy magasabb és egy alacsonyabb koncentrációját használtuk. Ezáltal összesen 24 kombinációval végeztük el a kísérleteket (**3. táblázat**, ld. 4.5.2.). A készítményeknek a kombinációkban szereplő koncentrációit az önálló használatuk során kapott eredményekre alapoztuk. Az IFN- β és a sorafenib korábbiakban vizsgált legmagasabb koncentrációja olyan erősen csökkentette a víruszaporodás mértékét, hogy más szerrel kombinálva egy esetleges szinergista hatást nehéz lenne kimutatni. Ezért ezeknél a hatóanyagoknál a második és harmadik hígítás szerepelt a kombinációkban (IFN- β : 1 és 0,1 IU/ml; sorafenib: 5 és 0,5 μ M). A ribavirin és a favipiravir esetében a két legmagasabb koncentrációt választottuk (mindkét hatóanyagnál 10 μ g/ml és 1 μ g/ml), mert alacsonyabb dózisokban nem váltottak ki igazán jelentős antivirális hatást.

Az FFA vizsgálatok eredménye alapján a tesztelt kombinációk egyikénél sem sikerült szinergizmust igazolni az összetevők között. Az IFN- β -t is tartalmazó kombinációk (IFN- β + sorafenib, IFN- β + ribavirin, IFN- β + favipiravir) vírusellenes hatása erősebb volt, mint az azonos koncentrációban használt önálló hatóanyagoké, de ez a különbség kis vagy közepes mértékű volt. A többi kombináció (ribavirin + favipiravir, sorafenib + ribavirin, sorafenib + favipiravir) gátlóhatása nem érte el az egyik vagy másik összetevőnél mért szintet, ami antagonizmust jelez a komponensek között.



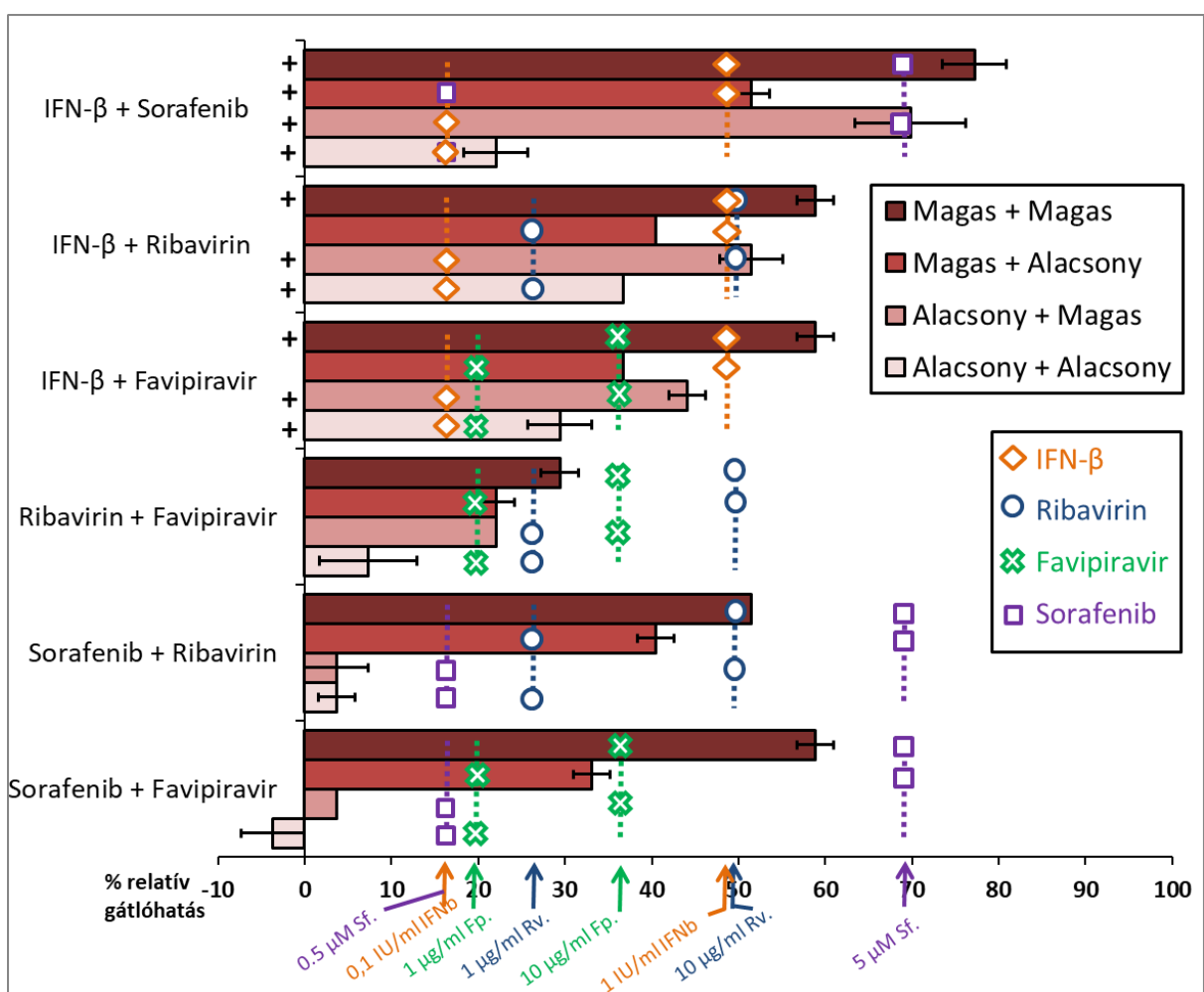
14. ábra: A vizsgált testanyagok kombinációinak RABV elleni antivirális hatása, FFA teszt.

„Magas” koncentrációk: IFN- β : 1 IU/ml; sorafenib: 5 μ M; ribavirin és favipiravir: 10 μ g/ml.

„Alacsony” koncentrációk: IFN- β : 0,1 IU/ml; sorafenib: 0,5 μ M; ribavirin és favipiravir: 1 μ g/ml.

Átlag \pm SEM (n=3). Szignifikancia szintek: * P<0,05; ** P<0,001 (a víruskontrollhoz képest)

A veszettségvírus replikációját az IFN- β és a sorafenib kombinációja csökkentette legnagyobb mértékben FFA eredményeink alapján (**14. ábra**). Amikor mindkét tesztanyag a magasabb koncentrációban volt jelen, a RABV titere 5,5 log értékkel alacsonyabb volt, mint a víruskontrollnál. Ez az eredmény felülmúlja még a két komponens tízszer töményebb oldatának (10 IU/ml IFN- β ; 50 μ M sorafenib) gátlóhatását is. Bár ez utóbbiaknál a vírustiter csökkenése látszólag nagyobb (5,75 log) volt, a víruskontolloknak a két kísérletben tapasztalt eltérése miatt az értékek közvetlenül nem hasonlíthatók egymáshoz. Azonban az eredmények relatív gátlásban (ld. 4.5.3. és 5.1.5.) kifejezve összevethetők: eszerint az 1 IU/ml IFN- β és 5 μ M sorafenib kombinációja 77,19%, míg az egyedileg használt 10 IU/ml IFN- β vagy 50 μ M sorafenib egyaránt 73,71% RABV-gátló hatást váltott ki.



15. ábra: A tesztanyagok kombinációinak relatív gátlóhatása a RABV replikációjára (FFA teszt), az egyedileg használt hatóanyagok hatásához hasonlítva. Sávok: a kombinációk gátlóhatása. Színes jelölők: az önálló hatóanyagok gátlóhatása (a kombinációban használttal azonos koncentrációban). „+”: az adott kombináció gátlóhatása meghaladja az alkotó komponensekét. Átlag \pm SEM (n=3)
 „Magas” koncentrációk: IFN- β : 1 IU/ml; sorafenib: 5 μ M; ribavirin és favipiravir: 10 μ g/ml.
 „Alacsony” koncentrációk: IFN- β : 0,1 IU/ml; sorafenib: 0,5 μ M; ribavirin és favipiravir: 1 μ g/ml.

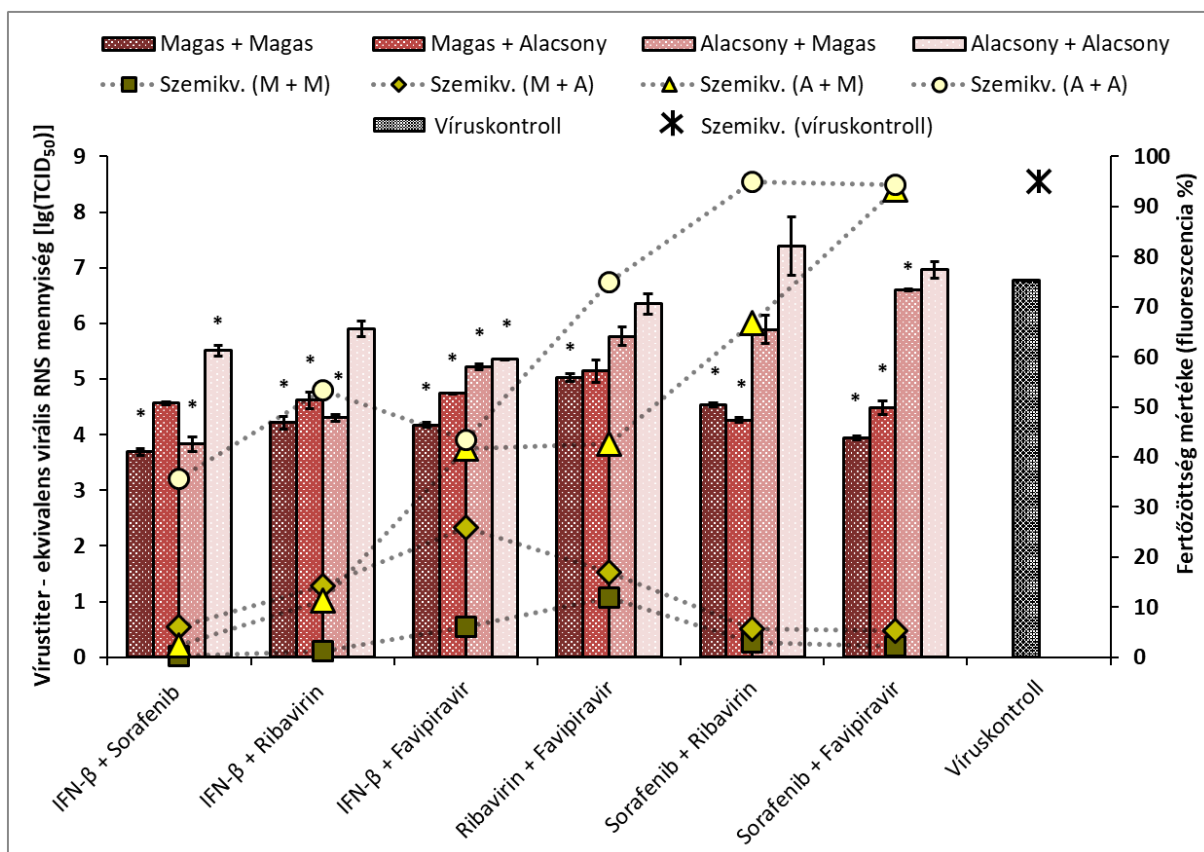
A kombinációban szereplő koncentrációkhoz hasonlítva a különbség még szembetűnőbb: az 1 IU/ml-es IFN- β oldat relatív gátlóhatása 48,07%, míg az 5 μ M-os sorafenibé 68,90% volt. Ha a kombinációban az IFN- β koncentrációját csökkentettük (0,1 IU/ml-re), a relatív gátlás 69,84%-ra csökkent; ha pedig sorafenibből használtunk 5 helyett 0,5 μ M-t, az eredmény 51,46% lett. Amikor mindkét összetevőt az alacsonyabb dózisban adtuk a keverékhez, még mindig 22,06%-os gátlást kaptunk. Ezek az eredmények mind fokozott vírusellenes hatást jeleznek az azonos töménységben külön-külön használt komponensekhez képest (**15. ábra**).

A különálló szerekkel elérhető vírusellenes hatás növelhető az IFN- β + ribavirin, és az IFN- β + favipiravir párosításokkal is, mivel kombinációban a relatív gátlás legtöbb esetben meghaladta a hatóanyagok önálló aktivitását. Kivételt képeztek azok a változatok, amikor az IFN- β magasabb, míg a másik összetevő (ribavirin vagy favipiravir) alacsonyabb koncentrációban szerepelt, ekkor az eredmény (40,44% és 36,76%) nem érte el az egyedileg használt 1 IU/ml IFN- β 48,07%-os relatív gátlóhatását.

Amikor ribavirint kombináltunk favipiravirral, vagy sorafenibet akár ribavirinnel akár favipiravirral, az eredmények kivétel nélkül gyengébb gátlóhatást jeleztek, mint amit legalább az egyik összetevő azonos koncentráció mellett önállóan ki tudott váltani. Bizonyos esetekben még a víruskontrollhoz képest sem csökkent szignifikánsan a vírusreplikáció (**14. ábra**).

A különböző kombinációkkal kezelt sejttenyészetekben a RABV replikációját qRT-PCR módszerrel is vizsgálatuk, az RNS-kópiaszámokból kiszámítva az ekvivalens vírustiter-értékeket (**16. ábra**). Az eredmények – az FFA teszttel összehangban – azt mutatják, hogy az IFN- β és bármely másik hatóanyag kombinációja fokozza a vírusellenes hatást, míg a többi három kombinációra inkább az antagonizmus jellemző. A két vizsgálati módszer különbségéből adódóan eltéréseket is találunk: az IFN- β + ribavirin és az IFN- β + favipiravir keverékeket PCR-rel vizsgálva mind a négy koncentráció-változatban fokozott antivirális hatás mutatható ki, továbbá a ribavirin + favipiravir és a sorafenib + ribavirin kombinációknál a mindkét összetevőből magasabb koncentrációt tartalmazó elegyek kis mértékben ugyan, de erősítették a vírusellenes effektust.

A kombinációs kísérleteknél sem maradt el az eredeti kísérleti lemez immunfluoreszcens festése és a sejttenyészetek fertőzöttségének becslése (**16. ábra**). Az FFA és PCR eredményekhez hasonló tendenciák itt is megfigyelhetők, de az erősebb gátlóhatások esetén már az egyedi hatóanyagok vizsgálatánál is annyira alacsony volt a fertőzött sejtek aránya, hogy a kombinációk esetében nem mindig volt kimutatható ehhez képest fokozott vírusellenes hatás. Ebben a tartományban a szemikvantitatív vizsgálat érzékenysége nem elegendő a különbségek biztos megállapításához.



16. ábra: A vizsgált testanyagok kombinációinak RABV elleni antivirális hatása, qRT-PCR és szemikvantitatív (sejtek fertőzöttségi aránya) vizsgálat.

„Magas” koncentrációk: IFN-β: 1 IU/ml; sorafenib: 5 μM; ribavirin és faipiravir: 10 μg/ml.

„Alacsony” koncentrációk: IFN-β: 0,1 IU/ml; sorafenib: 0,5 μM; ribavirin és faipiravir: 1 μg/ml.

Átlag ± SEM (n=3). Szignifikancia szintek: * P<0,05 (a víruskontrollhoz képest)

5.2. In vivo kísérleti szakasz

5.2.1. Első egérkísérlet

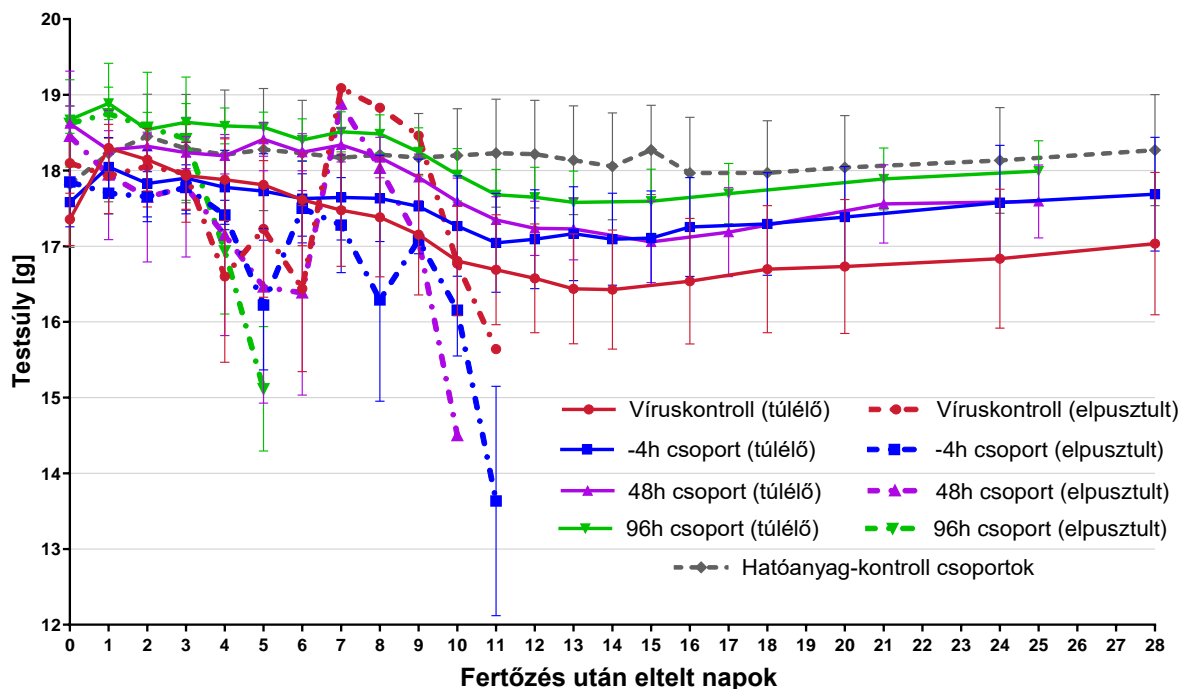
A kísérletben résztvevő 70 C57Bl/6 egeret 7 csoportba osztottuk: a kezeletlen víruskontroll csoport mellett a kezelés kezdeti időpontjának megfelelően 3-3 hatóanyag-kontroll, illetve fertőzött-kezelt csoportot állítottunk fel (**8. táblázat**, ld. 4.6.2.). Az állatokat LD₅₀ mennyiségű SHBRV-18 vírussal fertőztük (a visszatírázás alapján az oltóvírus títtere 10^{5,301} TCID₅₀/ml volt). A MAP-kináz-, TNF-α- és CASP-1-gátló gyulladáscsökkentő hatóanyagokat tartalmazó kombinációt 8 napon át adagoltuk, naponta egyszer.

5.2.1.1. Kórlefolyás és testtömegváltozások

A kísérlet kezdetén 7 hetes egerek átlagosan 17,58 ± 0,6 g (átlag ± SD [szórás]) tömegűek voltak. A nem fertőzött hatóanyag-kontroll csoportok egyedei a vizsgálatok 28 napja alatt végig egészségesek maradtak, a kezelések ideje alatt testtömegcsökkenést nem tapasztaltunk, a kísérlet végére tömegük növekedett (**17. ábra**).

A veszettség első jelei a fertőzés utáni 6. napon jelentek meg a víruskontroll csoportban, majd a következő naptól a fertőzött-kezelt csoportokban is. Az első tünetek közé tartozott a borzolt szőr és a hát púposítása, azonban ezek nem minden esetben voltak megfigyelhetők. Az egerek egy részénél a betegség a vírussal beoltott bal hátsó láb remegésével vagy bénulásával kezdődött, és ez a tünet – amely az általunk használt pontozásos rendszer (7. táblázat, ld. 4.6.1.) szerinti 1. klinikai stádiumnak felel meg – minden megbetegedett állatnál jelen volt. Ezt az állapotot igen gyorsan, általában fél napon belül ismétlődő és egyre gyakoribb tonico-clonicus görcsök követték (2. klinikai stádium). Amikor a görcsrohamok már szinte a teljes testre kiterjedtek és igen intenzívvé váltak, az egerek klinikai állapotát 3. stádiumúnak minősítettük, és eutanizáltuk őket. Az érintett állatok nagyobb részénél ekkorra a hátsó testfél gyengesége vagy bénulása is kialakult. A teljes kórlefolysis, tehát az első tünetek megfigyelésétől a humánus végpontig eltelt idő általában igen rövid volt (12-36 óra), ezen belül az egyes klinikai stádiumok időnként egymást átfedve, gyorsan követték egymást, így nem mindig lehetett egyértelműen elkülöníteni őket.

A megbetegedett egerek testtömege a tünetek megjelenésétől kezdve gyors csökkenésnek indult, elsősorban a táplálékfelvétel hiánya és a súlyosbodó görcsök miatt. A veszettségben elhullott (leölt) állatok átlagosan a kezdeti testtömegük 16,79%-át veszítették el a klinikai végpontig. A kísérlet végéig tüneteket nem mutató egerek tömege (a hatóanyag-kontroll csoportokhoz hasonlóan) a fertőzött csoportokban sem csökkent (17. ábra).

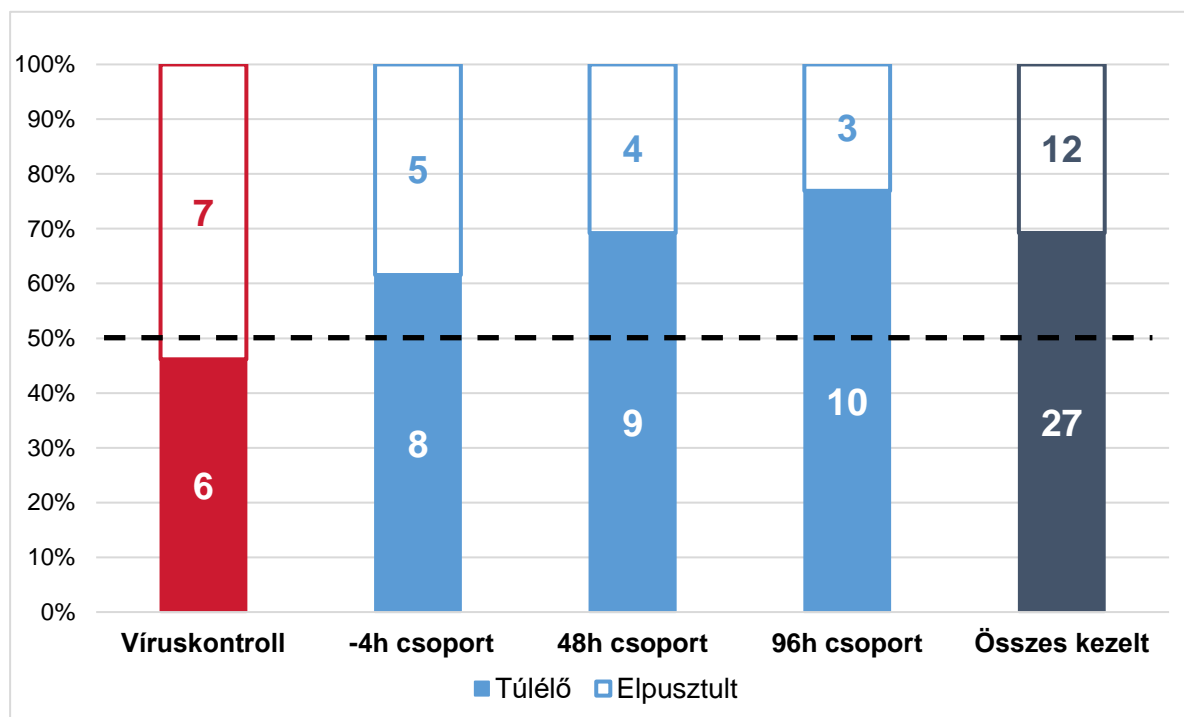


17. ábra: Az egerek testtömegváltozásai csoportonként az első kísérletben. A vírusfertőzött csoportoknál külön jelennek meg az ábrán a túlélő és a veszettség miatt kiirtott egerek tömegének átlagai. A három hatóanyag-kontroll csoport összesítve szerepel. Átlag \pm SD.

Egy fertőzött-kezelt egér (a 48 órával a fertőzés után kezelni kezdett csoportban) annak ellenére túlélte a betegséget, hogy a veszettség klinikai tünetei egyértelműen kialakultak nála. Ebben az állatban a tünetek a többi megbetegedett egérhez képest később, 16 nappal a fertőzés után jelentek meg. Az 1. klinikai stádium elérése után a veszettség további progressziója elmaradt: az állat bal hátsó lába lebénult és ebben az állapotban maradt a kísérlet végéig. Testtömege a klinikai manifesztációt követő napokban jelentősen csökkent (19,05 g-ról 14,95 g-ra), majd a 23. naptól lassú gyarapodásnak indult, a kísérlet végén (28. nap) 15,40 g-ot nyomott.

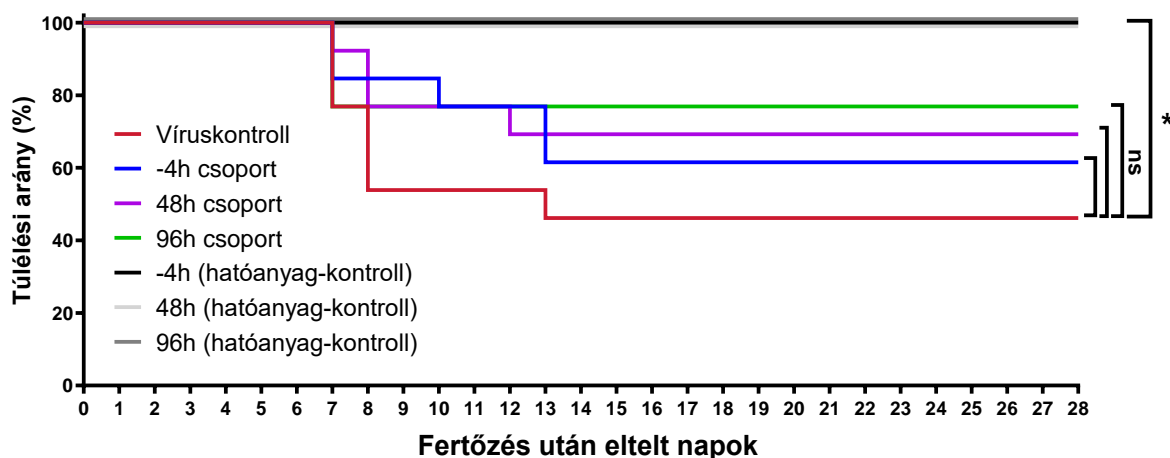
5.2.1.2. Túlélés

Az egereket LD₅₀ dózissal vírussal fertőztük, ezért a víruskontroll csoportban 50% körüli túlélési arányra lehetett számítani. Ennek a csoportnak a 13 tagjából 6 élte túl a kísérletet, ami 46,2%-nak felel meg, tehát a mortalitás a várakozásnak megfelelő mértékű volt. A kezelt csoportokban a túlélési arány magasabb lett: a legkorábban megkezdett kezelést kapott csoportban (-4h csoport) 13-ból 8 egér élte túl a fertőzést (61,5%); a 48 óra után kezelni kezdett csoport (48h csoport) 13 egyede közül 9 túlélő volt (69,2%). A legmagasabb túlélési arányt (13-ból 10 túlélő: 76,9%) abban a csoportban tapasztaltuk, ahol a terápiát 96 órával a vírusfertőzés után indítottuk (96h csoport). Bár jól látható a kezelés pozitív hatása a túlélésre, a víruskontroll csoporttal összehasonlítva a különbség statisztikailag egyik esetben sem szignifikáns; elsősorban a víruskontroll egerek közel 50%-os túlélési arányához képest relatív alacsony csoportlétszám miatt (**18. ábra**).



18. ábra: A vírussal fertőzött egércsoportok túlélési arányai az első kísérletben. A szaggatott fekete vonal az 50%-os túlélési arányt jelöli.

A humánus végpontot jelentő 3. klinikai stádiumot először a víruskontroll csoport 3 tagja érte el a fertőzést követő 7. napon, majd a következő 3 nap során további elhullások történtek, a víruskontroll mellett a kezelt csoportokban is. Ezt követően egy kisebb szünet után a kísérlet 12. és 14. napja között egy újabb mortalitási hullám következett. A 13. napot követően újabb egerek már nem betegedtek meg, kivéve a korábban említett, 1. stádiumot elért túlélő egyedet a 48h csoportban (ld. 5.2.1.1.). A Kaplan-Meier túlélési görbék a **19. ábrán** láthatók. A különböző időzítés szerint kezelt csoportok túlélési görbéi – Mantel-Cox próbával összehasonlítva – nem mutattak szignifikáns különbséget, ahogy az egyes fertőzött-kezelt csoportok víruskontrolltól való eltérése sem érte el a szignifikancia küszöbértékét.

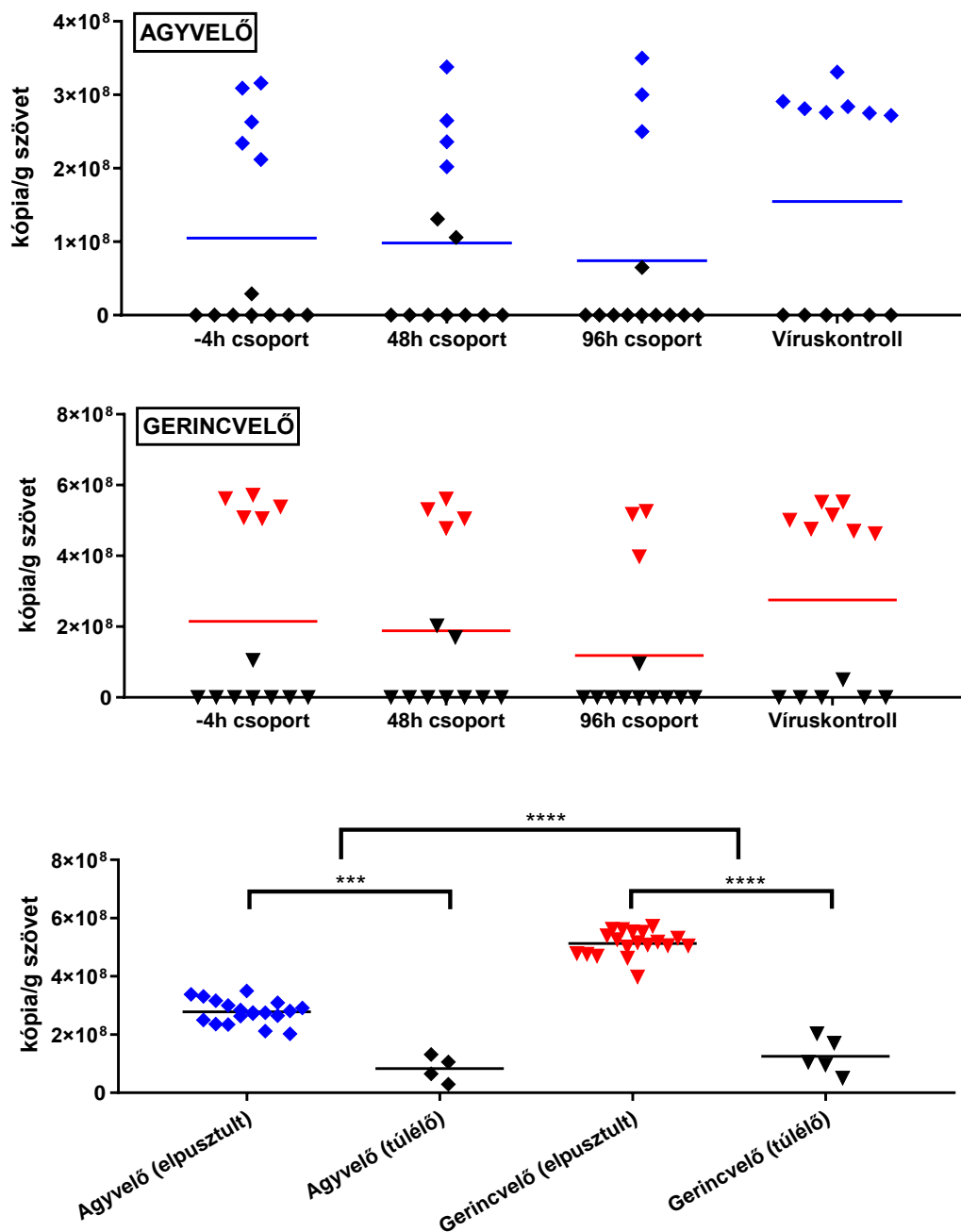


19. ábra: A különböző kísérleti csoportok Kaplan-Meier túlélési görbéi az első kísérletben.

ns = nem szignifikáns; * $P < 0,05$

5.2.1.3. Virális RNS mennyisége idegrendszeri mintákban

A humánus végpontot elért egerek agy- és gerincvelő mintáiban qRT-PCR módszerrel mértük a RABV-specifikus RNS mennyiségét. Hasonlóképpen vizsgáltuk a kísérlet végén (fertőzést követő 28. nap) minden túlélő egér idegrendszeri mintáit (**20. ábra**). Az összes veszettségben elhullott állatnál – az alkalmazott kezelési sémától függetlenül – magas kópiaszámban volt jelen a virális RNS, míg a túlélő egyedek többségében a RABV nukleinsavát nem tudtuk kimutatni. Három tünetmentes túlélő egérben (a három különböző fertőzött-kezelt csoportban egy-egy állat) az agyban és a gerincvelőben is kimutatható volt a veszettségvírus nukleinsava, továbbá a 48h csoportban tüneteket mutató, de túlélő egér idegrendszerében (agy és gerincvelő) is igazolni tudtuk a vírusreplikációt. A víruskontroll csoport egy túlélő tagjának gerincvelő mintája pozitív, míg agyvelő mintája negatív eredményt adott. A túlélő egerekben a betegség miatt eutanizáltakhoz képest jelentősen alacsonyabb mennyiségben volt jelen a virális RNS (agy: $P=0,0002$; gerincvelő: $P < 0,0001$). Az összes pozitív állatot vizsgálva a gerincvelőben szignifikánsan magasabb átlagos kópiaszámot mértünk, mint az agyban ($P=0,0001$).



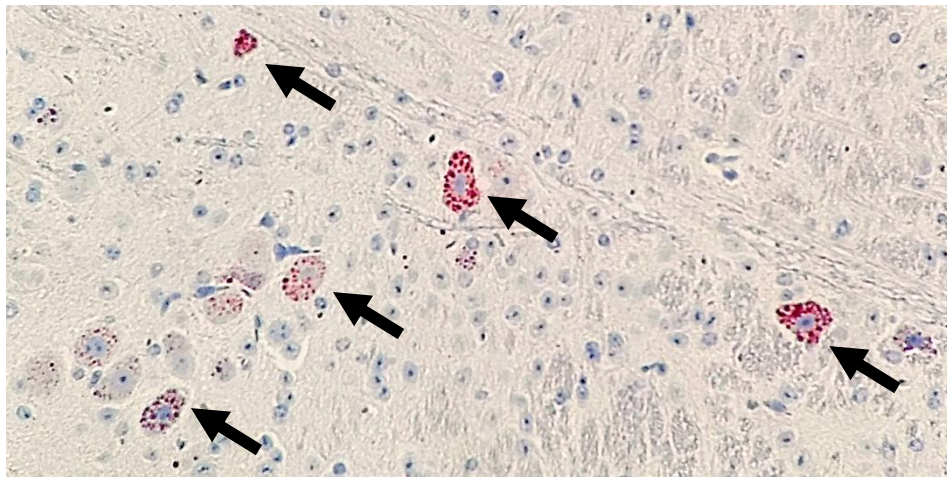
20. ábra: A KIR-ben mért RABV RNS kópiaszámok (SyBR Green qRT-PCR), első kísérlet. Kék és piros jelölők: elpusztult állatok; fekete jelölők: túlélő állatok. Felül: agyvelő-minták eredményei csoportonként; középen: gerincvelő-minták eredményei csoportonként; alul: túlélő és elpusztult állatok, illetve agyvelő és gerincvelő minták eredményeinek összehasonlítása (csak PCR-pozitív egerek). *** P<0,001; **** P<0,0001

5.2.1.4. Idegrendszeri minták kórszövetteni és immunhisztokémiai vizsgálata

A PCR vizsgálatok mellett szövettani módszereket is használtunk a vírusreplikáció kimutatására az egerekben. IHK vizsgálataink alapján a parenchymás szervekben a RABV antigénjei nem voltak jelen és nem találtunk kórszövetteni elváltozásokat sem. A veszettség tüneteit mutató egerek idegrendszerében nagy mennyiségben mutattuk ki a vírus N fehérjét;

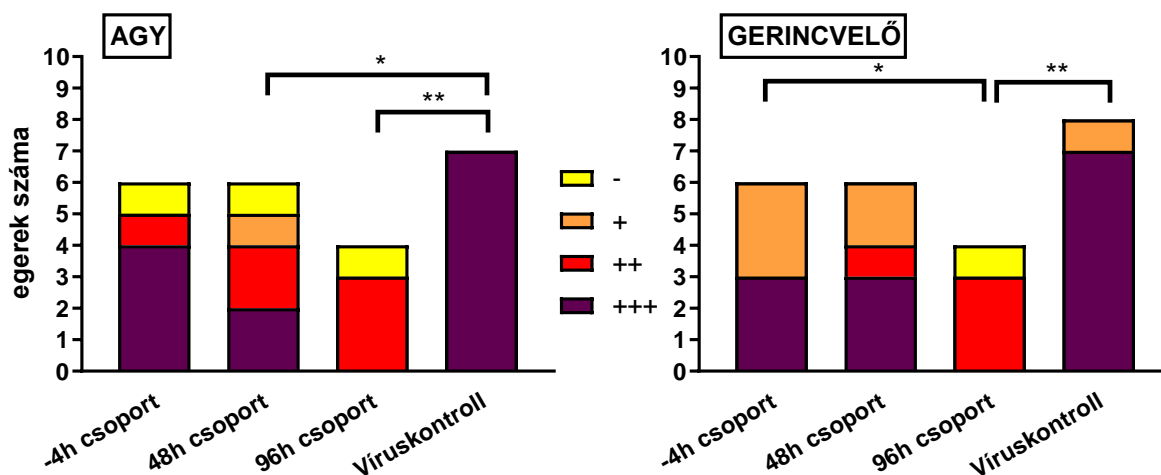
elsősorban a gerincvelő, az agytörzs, a kisagy- és nagyagyvelő sejtjeiben. A virális antigének legnagyobb számban a neuronok sejttestében fordultak elő, de az axonokban is jelen voltak. A vírus-specifikus antigének tömeges jelenlétét az agy- és gerincvelőgyulladás kórszöveti jelei – mononuclearis sejtbeszűrődés és lymphocytás érköpeny – kísérték. A hippocampus területét szinte egyáltalán nem érintette a fertőzés: csak egyetlen egernél találtunk kimutatható mennyiségű antigént ezen a területen, és a gyulladásos elváltozások is elvétve fordultak elő.

A fertőzést túlélő egerek nagy részében nem volt kimutatható virális antigén a KIR-ben, kivéve azt az öt állatot, amelyeknél a PCR-vizsgálat is pozitív eredményt adott. Ezek közül a négy tünetmentes túlélő egér agyában nem, de gerincvelőjében igazoltuk a RABV jelenlétét. Az ötödik, 1-es stádiumú tünetek mellett túlélő egyednél (48h csoport) a gerincvelő mellett az agyban is találtunk antigéneket (**21. ábra**).



21. ábra: SHBRV-18 antigének a veszettség tüneteinek kialakulása (1. klinikai stádium) mellett túlélő egér agyában (48h kezelési csoport). Immunhisztokémiai festés, 400× nagyítás.
A vírus nukleoproteinjét vörös szín jelzi a neuronokban (nyilak).

A qRT-PCR vizsgálattal pozitívnak talált egereket figyelembe véve összehasonlítottuk az egyes kísérleti csoportokra jellemző antigénmennyiségeket a KIR-ben (**22. ábra**). Az eredmények a csoportokban tapasztalt túlélési arányokat követik: a legkevesebb antigént a legkésőbb kezelt, 96h csoportban találtuk, amit a 48h és -4h csoportok eredményei követtek. A legmagasabb antigénszintet a víruskontroll csoportnál állapítottuk meg. Bár az érintett állatok alacsony száma (csoportonként 3-7 pozitív egér) miatt a különbségek sok esetben nem szignifikánsak, a 96h csoportra jellemző antigénmennyiség szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a víruskontrollhoz képest mind az agyat ($P=0,0030$), mind a gerincvelőt ($P=0,0040$) tekintve, míg a 48h csoport a gerincvelő-mintákat vizsgálva nem-, de az agyvelőminták alapján szintén szignifikánsan különbözik a víruskontroll csoporttól ($P=0,0209$). A gerincvelő-minták esetében a 96h csoport antigén-szintje a -4h csoportnál is szignifikánsan alacsonyabb volt ($P=0,0142$).



22. ábra: RABV antigének mennyisége az agyban és a gerincvelőben a különböző vírusszaporított csoportokban (első kísérlet, csak PCR-pozitív állatok). * P<0,05; ** P<0,01

5.2.1.5. A túlélő egerek szerológiai vizsgálata

A kísérlet végéig túlélő vírusszaporított egerek veszettség elleni neutralizáló ellenanyag-szintjét FAVN próbával határoztuk meg, vérsavó mintából. Mindegyik, a vírussal való fertőzést túlélő állatban kimutattuk a RABV ellen termelődött antitesteket, ami azt bizonyítja, hogy az egerek szerológiai áthangeltek. Az ellenanyag-szint 0,29 és 1,50 IU/ml közé esett, az átlagos titer $0,61 \pm 0,45$ IU/ml (átlag \pm SD) volt. A kezelés időzítése nem befolyásolta érdemben az ellenanyag-szintet, de azokban az egerekben, amelyekben PCR- és IHK vizsgálattal vírusszaporodást mutattunk ki a KIR-ben, az átlagnál szignifikánsan magasabb ellenanyag-titert mértünk ($1,09 \pm 0,30$ IU/ml; $P=0,0420$). Az 1-es klinikai stádiumnak megfelelő tüneteket mutató, de túlélő egér (48h csoport) eredménye 0,87 IU/ml volt.

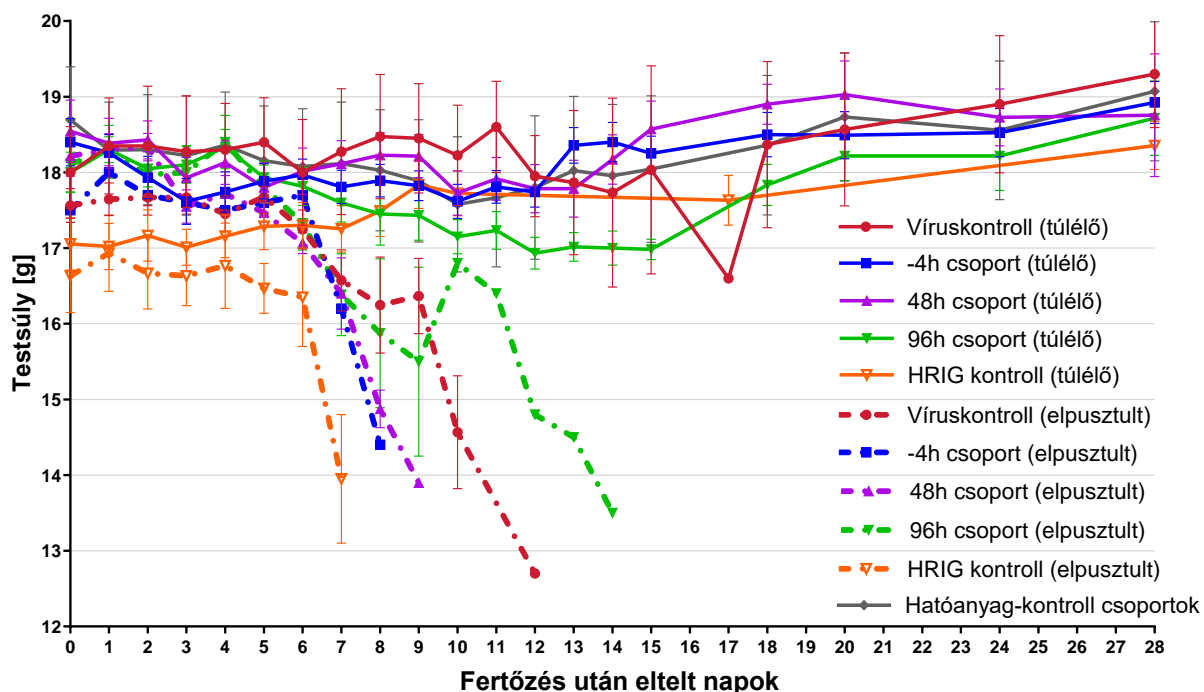
5.2.2. **Második egérkísérlet**

A második kísérletben a terápiás kombináció a MAP-kináz-, TNF- α - és CASP-1-gátló hatóanyagok mellett veszettség elleni humán poliklonális antitesteket (HRIG) is tartalmazott. A kezelést a fertőzést követően 10 napig folytattuk. A fertőzéshez a korábbi kísérletnél magasabb, LD₁₀₀ vírusedőzist használtunk. Az oltóvírust visszatitálva az infektív titer $10^{6,926}$ TCID₅₀/ml-nek bizonyult. A statisztikai próbák erősítése érdekében a víruskontroll csoportba 26 egeret osztottunk be. Ennek bizonyítása céljából, hogy a víruskontrollhoz képest egy esetlegesen tapasztalt fokozott túlélés nem kizárólag a HRIG jelenlétének köszönhető a kombinációban, egy további kísérleti csoportot is beiktattunk, amelynek 13 egerét a -4h csoport szerinti időzítés alapján, de csak HRIG-gel kezeltük, a gyulladáscsökkentő szerek nélkül. A kísérletben így összesen 96 állat vett részt (8. táblázat, ld. 4.6.2.).

5.2.2.1. Kórlefolyás és testtömegváltozások

A veszettség manifesztációja esetén a kórlefolyás nem különbözött az első kísérletben tapasztaltaktól. Vélhetően a magasabb vírusdózis miatt az első klinikai tünetek már a kísérlet 5. napján megjelentek a víruskontroll csoportban, a következő naptól pedig a fertőzött-kezelt csoportok számos tagjánál is kialakult a betegség.

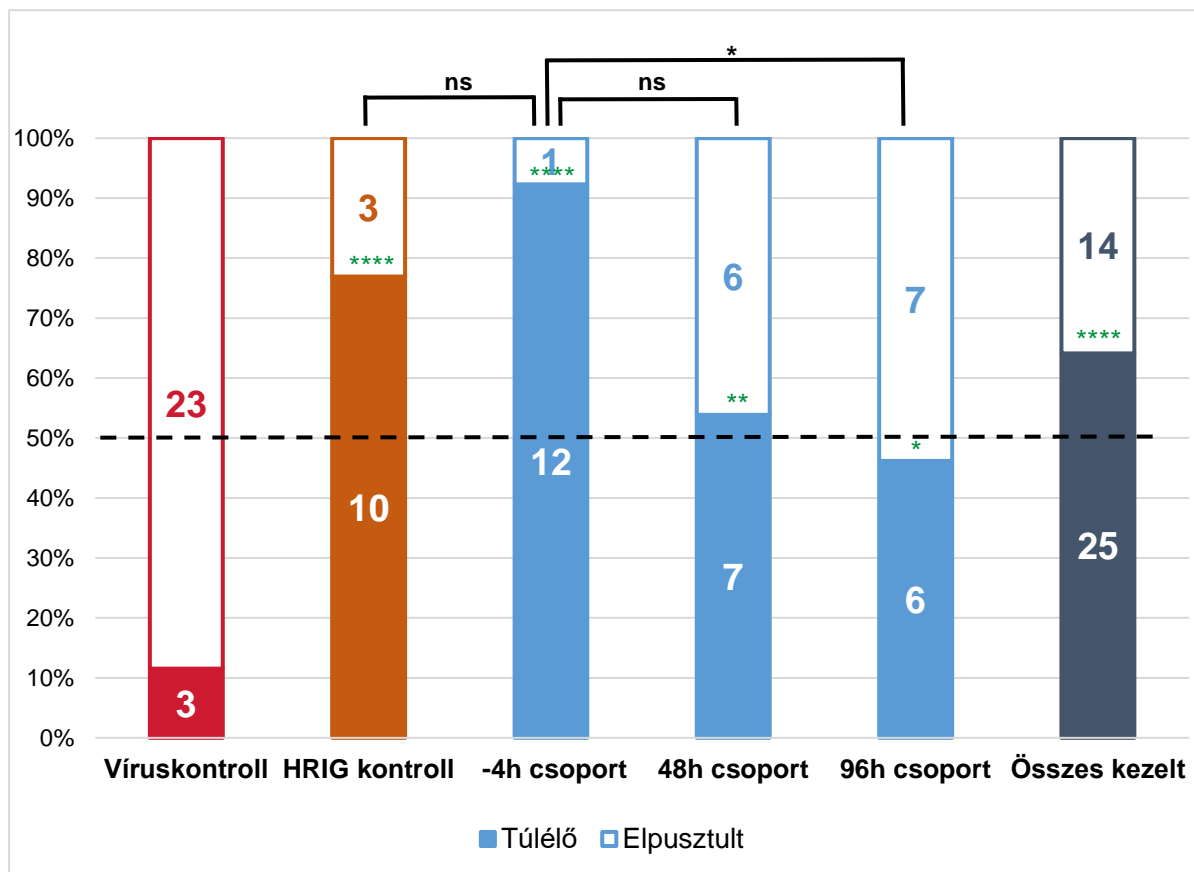
Az egerek átlagos testtömege a kísérlet kezdetén $18,19 \pm 1,04$ g volt. A hatóanyag-kontroll csoportokban minden állat egészséges maradt, ennek megfelelően testtömegcsökkenést sem tapasztaltunk. Szintén nem csökkent a tömege a vírussal fertőzött csoportok túlélő egyedeinek. A veszettség kialakulása esetén az érintett egerek testtömege az állapot romlásával párhuzamosan gyorsan esett, eutanáziájuk időpontjáig a kezdeti testtömegük nagyjából ötödével csökkent (**23. ábra**).



23. ábra: Az egerek testtömegváltozásai csoportonként a második kísérletben. A vírusfertőzött csoportoknál külön jelennek meg az ábrán a túlélő és a veszettség miatt kiirtott egerek tömegének átlagai. A három hatóanyag-kontroll csoport összesítve szerepel. Átlag \pm SD.

5.2.2.2. Túlélés

Az LD₁₀₀ vírusdózis használata ellenére a víruskontroll csoport 26 tagjából 3 túlélte a fertőzést, ami 11,5%-os túlélési aránynak felel meg. A fertőzött-kezelt csoportokban jóval magasabb túlélési arányt tapasztaltunk: 13-ból 7 túlélő egér volt a 48h csoportban (53,8%), 6 pedig a 96h csoportban (46,2%). Az első adag hatóanyag-kombinációt pre-expozíciósan kapott -4h csoportnak mindössze egyetlen tagja betegedett meg (és érte el a klinikai végpontot): ez 92,3%-os túlélési arányt jelent (**24. ábra**).

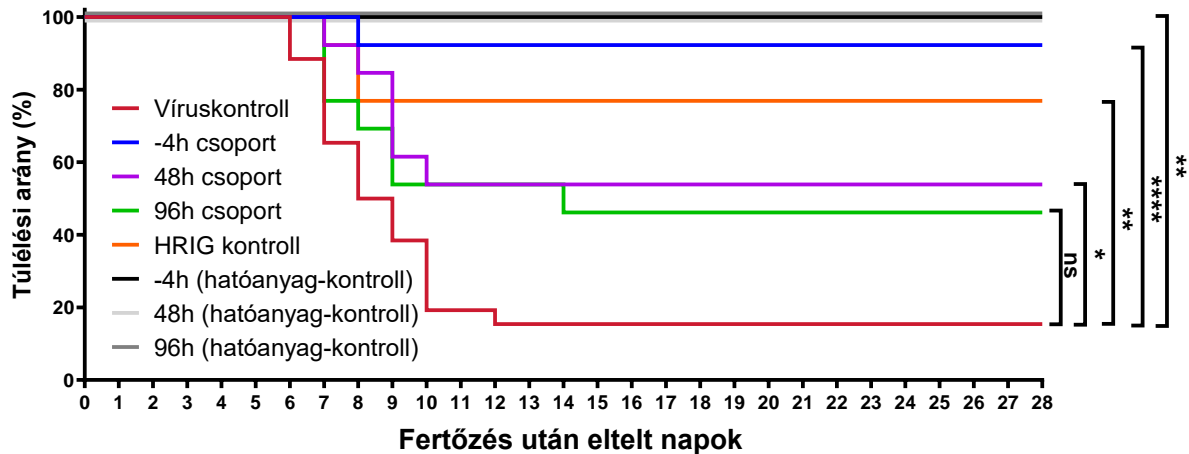


24. ábra: A vírussal fertőzött egércsoportok túlélési arányai a második kísérletben.

A szaggatott fekete vonal az 50%-os túlélési arányt jelöli. Az oszlopokon belüli, zöld színű csillagok a víruskontrolltól való szignifikáns különbséget jelzik. A felső kapcsok az egyes fertőzött-kezelt csoportok összehasonlítását jelölik. ns = nem szignifikáns; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$

Mindhárom kezelt csoportnál szignifikáns a különbség a víruskontrollhoz képest (-4h csoport: $P < 0,0001$; 48h csoport: $P = 0,0077$; 96h csoport: $P = 0,0386$). A -4h csoport eredménye a 48h csoportétól nem, a 96h csoportétól azonban szignifikánsan eltér ($P = 0,0302$). A túlélési görbék időbeli lefutását is figyelembe vevő Mantel-Cox statisztikai próbával a 96h csoport az egyetlen, amely a víruskontrollhoz képest nem mutat szignifikáns eltérést ($P = 0,0610$); a 48h csoportnál a P érték 0,0167, míg a -4h csoportnál $< 0,0001$ volt (**25. ábra**). A fertőzött-kezelt csoportokat egymással összevetve a 48h és 96h csoportok egymástól nem, de a -4h csoporttól szignifikánsan eltérnek ($P = 0,0351$ és $P = 0,0125$).

A csak HRIG-el (-4h terápiás séma szerint) kezelt kontrollcsoportban 10 egér élte túl a fertőzést, és 3 pusztult el (76,9% túlélési arány). Látható, hogy ez az érték alacsonyabb, mint a teljes kombinációval azonos időzítés szerint kezelt csoportban, bár a különbség nem szignifikáns.

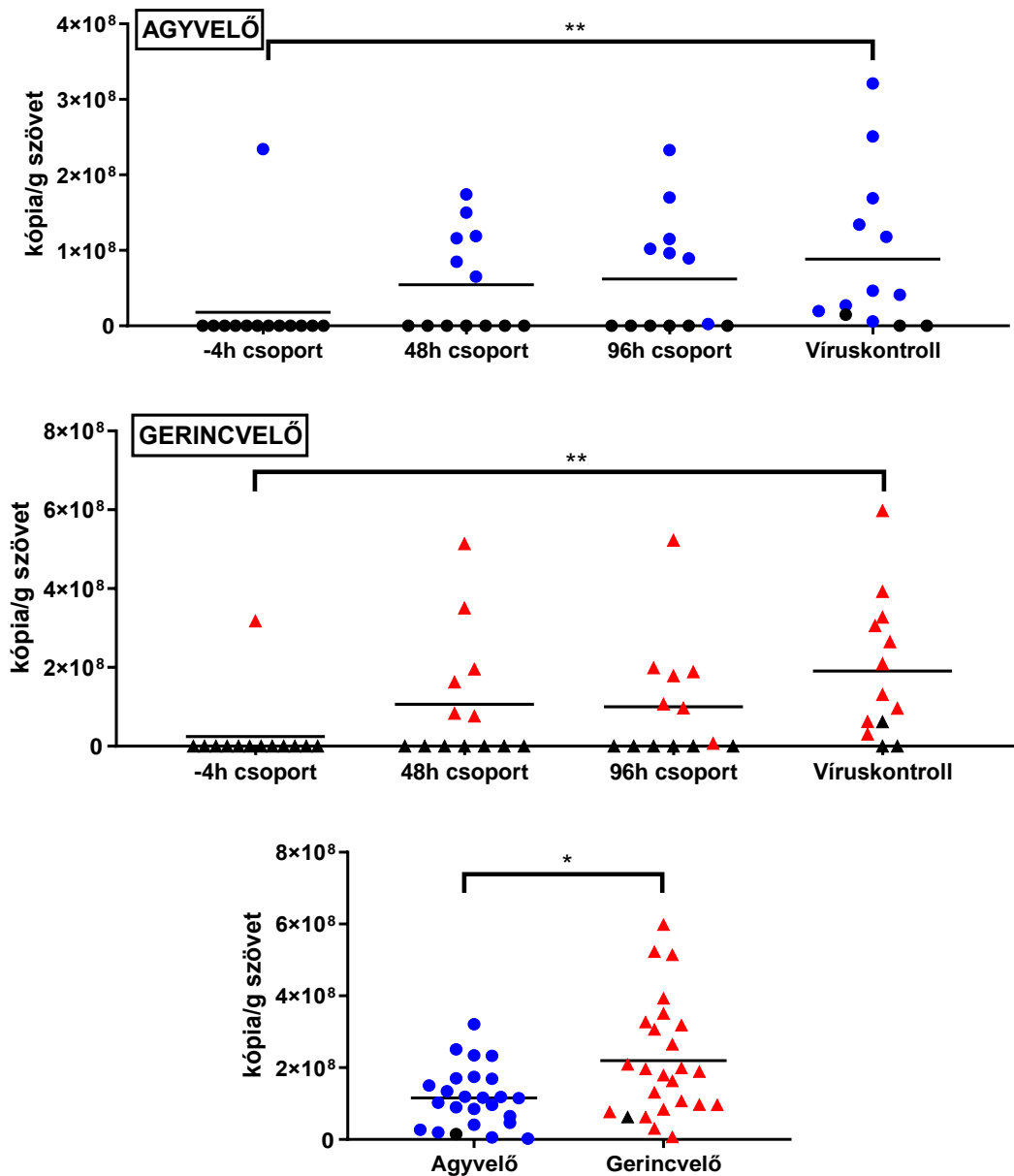


25. ábra: A kísérleti csoportok Kaplan-Meier túlélési görbéi a második kísérletben.

ns = nem szignifikáns; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$

5.2.2.3. Virális RNS mennyisége idegrendszeri mintákban

Az összes, veszettségben elpusztult egér agyában és gerincvelőjében kimutattuk az SHBRV-18 RNS-ét. Néhány – a 3. klinikai stádium elérése miatt exterminált – állatban a kópiaszámok viszonylag alacsonyak voltak az agyban és a gerincvelőben is. A túlélő egerek közül csak egy esetben, a víruskontroll csoport egy tagjában találtunk – kis mennyiségű – RABV-specifikus nukleinsavat a KIR-ben (**26. ábra**). Az egyes csoportokat statisztikailag összehasonlítva nincsenek szignifikáns különbségek, kivéve a víruskontroll csoportot összevetve a -4h csoporttal. Ez utóbbi csoportban 13-ból 12 egér túlélte a fertőzést és negatív eredményt adott, ez az oka a szignifikáns eltérésnek (agy: $P = 0,0033$; gerincvelő: $P = 0,0011$). Hasonlóan az első kísérlethez, a gerincvelőben mért átlagos RNS kópiaszám szignifikánsan meghaladta az agyvelőmintáknál kapott értékeket ($P = 0,0211$).



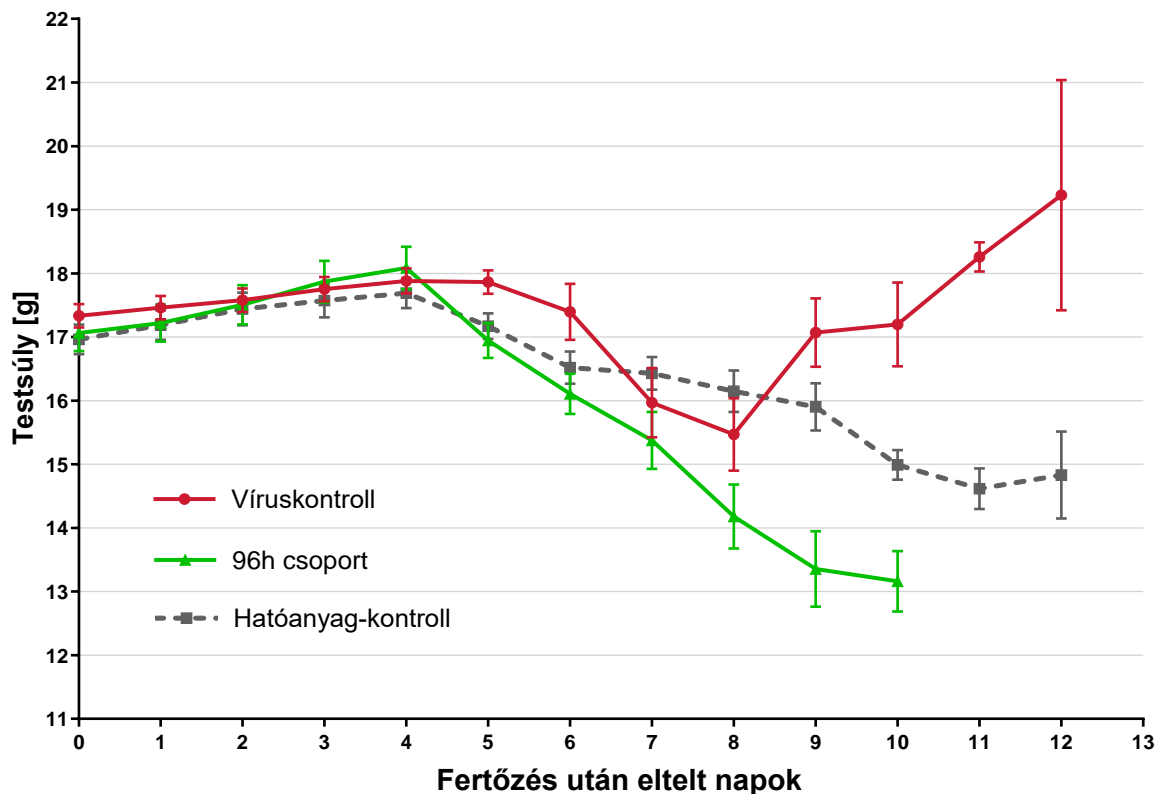
26. ábra: A KIR-ben mért RABV RNS kópiaszámok (SyBR Green qRT-PCR), második kísérlet. Kék és piros jelölők: elpusztult állatok; fekete jelölők: túlélő állatok. Felül: agyvelő-minták eredményei csoportonként; középen gerincvelő-minták eredményei csoportonként; alul: agyvelő és gerincvelő minták eredményeinek összehasonlítása (csak PCR-pozitív egerek esetében). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

5.2.3. Harmadik egérkísérlet

A harmadik állatkísérletbe 39 egeret vontunk be. A fertőzés ezúttal is LD_{100} vírusedménnyel történt (a vírus titere $10^{6,676}$ TCID₅₀/ml volt). A terápiás kombinációhoz – az immunmoduláns készítmények és a HRIG mellett – az *in vitro* kísérletekben RABV elleni antivirális hatást mutatott szereket is hozzáadtunk (IFN- α , - β , ribavirin, favipiravir). A hatóanyagok hatékonyabb bejutásához a KIR-be, a vér-agy-gát megnyitása céljából mannittal is kezeltük az állatokat a kombináció beadása után fél órával. Ezúttal csak egyféle terápiás sémát használtunk: a napi kezeléseket a fertőzést követően 96 óra elteltével kezdtük el (**8. táblázat**, ld. 4.6.2.).

5.2.3.1. Kórlefolyás és testtömegváltozások

A kísérleti állatok testtömege kezdetben $17,12 \pm 0,85$ g volt. A kezelések megkezdésének napjától (fertőzés utáni 4. nap) a nem vírusfertőzött hatóanyag-kontroll egerek testtömege látványos csökkenésnek indult, és hasonlóan csökkenni kezdett az átlagos testtömeg a fertőzött-kezelt csoportban is. Ezzel szemben a víruskontroll csoportban a 4.-6. napig minimális testtömegcsökkenést tapasztaltunk (a 6. naptól kezdve ebben a csoportban is csökkent az egerek tömege, a veszettség okozta görcsök és anorexia miatt) (**27. ábra**).



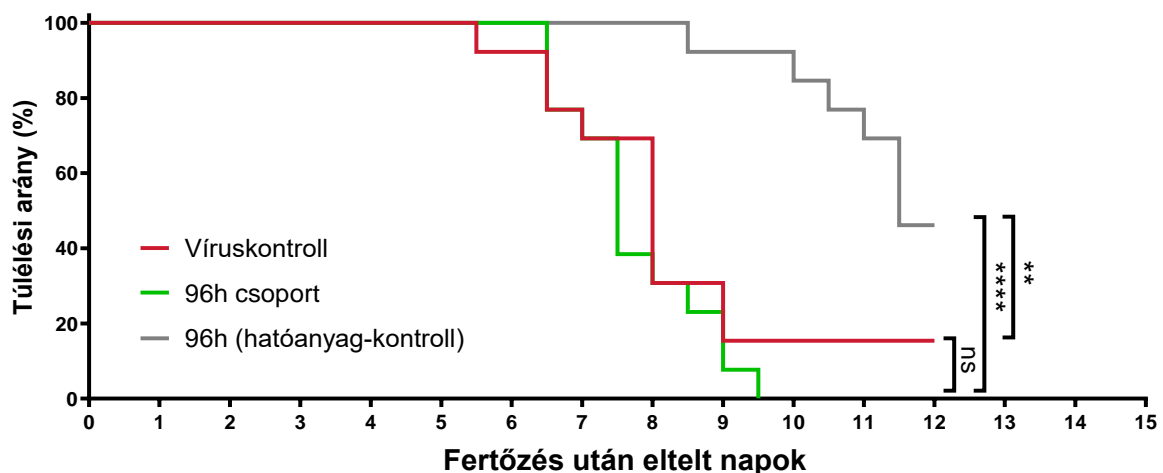
27. ábra: Az egerek testtömegváltozásai csoportonként a harmadik kísérletben. A víruskontroll csoportban a 8. nap utáni átlagnövekedést a két túlélő egér eredménye okozza. Átlag \pm SD.

A víruskontroll csoportban az előző kísérlethez hasonlóan a 5. napon jelentek meg a klinikai tünetek, és aznap egy állat a fertőzött-kezelt csoportban is eljutott az 1. klinikai stádiumig. A következő napon további állatokon láttuk a veszettség tüneteit, és a víruskontroll csoportban megkezdődtek az eutanáziák is a humánus végpont elérése miatt. A 6. napon a fertőzött-kezelt csoportban két egernél a veszettségre jellemző kórlefolyástól teljesen eltérő tünetek kezdtek kialakulni, amelyek a következő napokban súlyosbodtak: lelassult mozgás, majd teljes apátia, elfekvés volt jellemző rájuk. Ezek az állatok a kísérlet 7., illetve 8. napján elhullottak. A csoport többi tagjánál típusos veszettség alakult ki, az utolsó állat a 10. napon érte el a humánus végpontot. Néhány nap elteltével a hatóanyag-kontroll csoport tagjainak is romlani kezdett az állapota: tüneteik megegyeztek a fertőzött-kezelt csoportban említett két

lelassult mozgású, elfekvő egér tüneteivel. A kísérlet végére (12. nap) a hatóanyag-kontroll csoportban is jelentős számban történtek elhullások. Mivel ebben a csoportban nem történt vírusfertőzés, a testtömegcsökkenés, az atipikus tünetek és az elhullások a kezelésre használt készítmények toxicitásának következményei voltak.

5.2.3.2. Túlélés

Hasonlóan a második kísérlethez, a víruskontroll csoportban ezúttal sem tapasztaltunk 100%-os mortalitást. A csoport 13 tagjából 2 túlélte a fertőzést, ami 15,4%-os túlélési aránynak felel meg. A fertőzött-kezelt csoportban minden egér elpusztult: 11 a veszettség 3. klinikai stádiumának elérése miatt került eutanáziára, 2 pedig – vélhetően a kombinációs kezelés toxikus hatásától – elhullott. A kísérletet a hatóanyag-kontroll csoportban fellépő toxicitás és elhullások miatt a 12. napon leállítottuk; eddig a pontig a kezdeti 13 állatból már csak 6 volt életben (46,2%-os túlélési arány) (**28. ábra**).

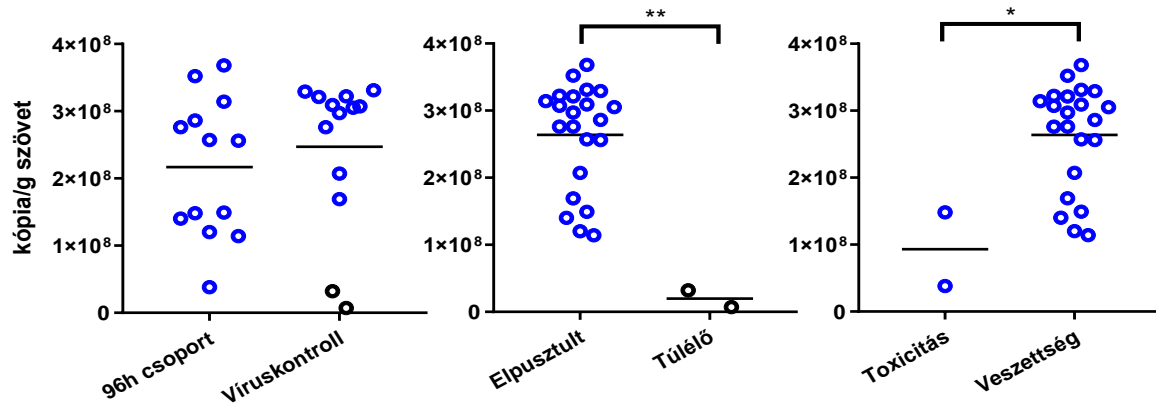


28. ábra: A kísérleti csoportok Kaplan-Meier túlélési görbéi a harmadik kísérletben.

ns = nem szignifikáns; ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$

5.2.3.3. Virális RNS mennyisége idegrendszeri mintákban

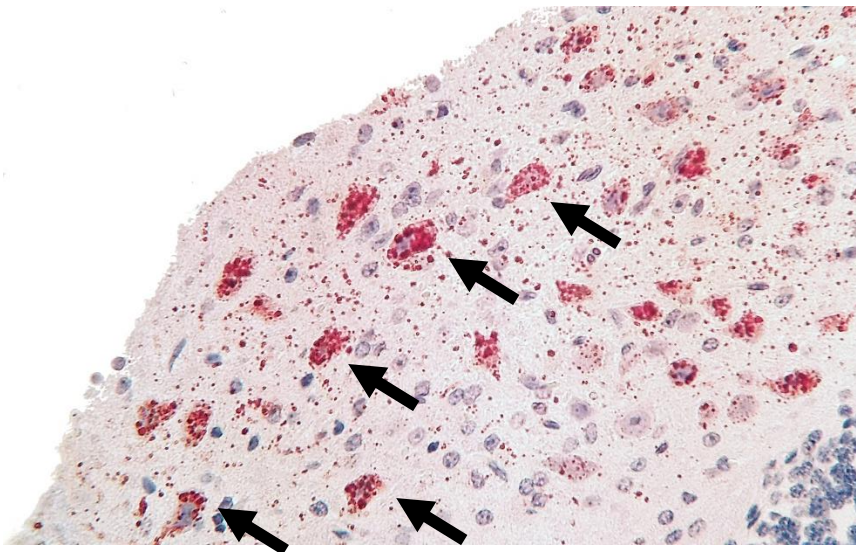
A víruskontroll csoportot a fertőzött-kezelt csoporttal összehasonlítva az agyban mért virális RNS kópiaszámok nem mutattak érdemi eltérést (**29. ábra**). A veszettség tüneteit mutató egereken kívül a víruskontroll csoport két túlélő tagjának idegrendszerében is kimutattuk a RABV RNS-ét, de a veszettségben megbetegedett állatoknál lényegesen alacsonyabb mennyiségben ($P=0,0072$). Ugyancsak pozitív eredményt adott a fertőzött-kezelt csoportban a gyógyszerotoxicitás okozta tünetek mellett elhullott két állat is, de az RNS kópiaszámok az ő esetükben is szignifikánsan alacsonyabbak voltak a típusos veszettséggel érintett egyedekhez képest ($P=0,0435$).



29. ábra: Az agyban mért RABV RNS kópiaszámok (SyBR Green qRT-PCR), harmadik kísérlet. Kék jelölők: elpusztult állatok; fekete jelölők: túlélő állatok. Bal oldalon: fertőzött-kezelt és víruskontroll csoportok; középen: elpusztult és túlélő (PCR-pozitív) állatok; jobbra: toxicitás és veszettség miatt elpusztult (fertőzött) állatok eredményeinek összehasonlítása. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

5.2.3.4. Idegrendszeri minták kórszövettani és immunhisztokémiai vizsgálata

A veszettség miatt leölt egerek agy- és gerincvelő-mintáiban nagy mennyiségben mutattuk ki a RABV antigénjeit (**30. ábra**). Az első kísérlethez hasonlóan a tömeges vírusszaporodást gyulladásos jelek kísérték. A víruskontroll és a fertőzött-kezelt csoport között nem volt számottevő eltérés az antigének mennyiségében és a kórszövettani elváltozásokban. A víruskontroll csoportban a két túlélő egér agyában nem, de a gerincvelőben találtunk vírus-specifikus antigéneket, bár kevesebbet, mint a tüneteket mutató állatoknál. A fertőzött-kezelt csoport toxicitás miatt elhullott két tagjának IHK vizsgálata (a pozitív PCR eredmény ellenére) negatív eredményt adott.



30. ábra: Kiterjedt RABV-fertőzés az agyban. Immunhisztokémiai festés, 400× nagyítás. A vírus nukleoproteinjét vörös szín jelzi a neuronokban (nyilak).

6. Megbeszélés

6.1. *In vitro* kísérleti szakasz

A vírusfertőzések terápiájára szánt hatóanyagok vizsgálatának korai fázisát leggyakrabban az *in vitro* hatástanulmányok jelentik. Ennek során a vírust fogékony sejt kultúrában, a tesztanyag jelenlétében és hiányában elszaporítva elemezhető az antivirális hatás. A vizsgált szer megfelelő koncentrációjának megállapításához fontos figyelembe venni a sejtekre kifejtett esetleges toxicitást (Chávez és mtsai, 2006).

A neurotrop RABV replikációjának vizsgálatára jó osztódási képességű, immortalizált, adherens idegsejt eredetű sejtvonalak állnak rendelkezésre, amelyek használata praktikusabb, mint a primer neuron sejt kultúráké. A veszetséget érintő *in vitro* kutatásokban főként egér (Niu és mtsai, 2013; Yamada és mtsai, 2016; Nakamichi és mtsai, 2005) és humán (Luo és mtsai, 2015; Chopy és mtsai, 2011a; Appolinario és mtsai, 2013) neuroblastoma sejtvonalakat vesznek igénybe. Kísérleteinkhez az N2a egér neuroblastoma sejtvonalat választottuk, amely az OIE diagnosztikai kézikönyvében ajánlott sejt típus a RABV izolálásához (OIE, 2018). A hatásvizsgálatok megkezdése előtt meghatároztuk a kiválasztott vírusellenes szerek citotoxicitását N2a sejtekre. A hatóanyagoknak csak olyan koncentrációit használtuk a kísérletekben, amelyek nem váltottak ki számottevő citotoxicitást (<5%).

A vírusok elleni nem-specifikus immunitás kulcsfontosságú citokinjei, az I-es típusú IFN-ok kézenfekvő jelöltjei egy tervezett antivirális terápiának. A RABV, replikációja során nagyrészt kiiktatja az I-es típusú IFN-ok termelődését a vírusfertőzött sejtekben, hátrányosan érintve a veleszületett immunválaszt (ld. 3.3.). Az idegsejtekben egy átmeneti, kisebb mértékű IFN-válasz ennek ellenére is kialakulhat a fertőzést követően (Johnson és mtsai, 2006b), és ez lassítja a vírus terjedését az idegrendszerben (Chopy és mtsai, 2011a). A RABV tehát érzékeny az I-es típusú IFN-okra, ezt bizonyítja több tanulmány is, amelyben exogén IFN-kezeléssel sikeresen csökkentették a vírus replikációját *in vitro* (Niu és mtsai, 2013; Chopy és mtsai, 2011a), továbbá egérmodellben növelték a túlélési időt (Mehta és mtsai, 2015). Ezen vizsgálatok többsége az IFN- α hatását elemezte, Chopy és munkatársai pedig az IFN- β -ét; de a két I-es típusú IFN RABV elleni aktivitását eddig nem hasonlították össze.

Kísérleteink bizonyították, hogy mindkét I-es típusú IFN koncentrációfüggő csökkenést okoz a veszetségvírus replikációjában. Az IFN- β – nem citotoxikus koncentráció mellett elérhető – maximális gátlóhatása jelentősen meghaladja az IFN- α -ét: FFA teszt alapján előbbinél 5,75; utóbbinál 3,5 nagyságrenddel alacsonyabb vírustiteret mértünk a kezeletlen kontrollhoz képest. Rutinszerű antivirális terápia céljára jelenleg csak az IFN- α -t használják (hepatitis B és C fertőzések kezelésére), ez magyarázhatja, hogy az emberi veszetség

kezelésére tett kísérletek során is ezt az IFN-t választották (Appolinario és Jackson, 2015). Bizonyos vírusok replikációját ugyanakkor az IFN- β nagyobb mértékben csökkenti: főként a humán légzőszervi koronavírusok esetében igazolták erőteljes gátlóhatását (SARS: Hensley és mtsai, 2004; MERS: Hart és mtsai, 2014). Ráadásul az IFN- β szerepe igen jelentősnek tűnik az idegsejtek vírus-indukálta válaszreakciójában (Ward és Massa, 1995; Delhaye és mtsai, 2006), többek között más rhabdovírus (VSV – fertőző hólyagos szájgyulladás vírusa, *Vesiculovirus*) fertőzés esetén is (Detje és mtsai, 2015). Mivel vizsgálatunkat neuroblastoma sejteken végeztük, ez magyarázatot adhat eredményeinkre a két I-es típusú IFN hatásának különbségét tekintve.

Az IFN- α és - β keveréke nem erősítette a vírusellenes effektust: az 1:1 arányú elegy eredménye az IFN- α és - β közé esett. Mivel az I-es típusú IFN-ok azonos sejtfelszíni receptorhoz kötődnek (IFNAR-1/2), nem számítottunk fokozott hatásra. Az eredmények alapján egyértelművé vált, hogy csak az IFN- β -t érdemes bevonni a kísérletek következő fázisába, amikor a különböző hatóanyagok kombinációit vizsgáljuk.

A ribavirin az első hatóanyagok között volt, amelyek hatékonyságát kimutatták a RABV multiplikációjának gátlásában, sejttenyészetben (Bussereau és Ermine, 1983). Azóta további publikációk is alátámasztották ezt az eredményt (Appolinario és mtsai, 2013; Anindita és mtsai, 2018), habár a hatóanyag nem segítette a veszettség túlélését humán esetekben és egérmodellben (Appolinario és Jackson, 2015). A már bizonyított *in vitro* vírusellenes hatásra építve a ribavirint kontrollként vontuk be a vizsgálatunkba, amihez a többi antivirális szer gátlóhatását hasonlíthattuk.

A szakirodalmi adatoknak megfelelően mi is igazoltuk a ribavirin RABV szaporodását gátló hatását. Magasabb koncentrációk mellett hatékonyabban csökkentette a vírusreplikációt, mint a favipiravir, egy újabb fejlesztésű vírusellenes molekula. A favipiravir a ribavirinhez hasonlóan az RNS vírusok ellen aktív nukleozid analóg. Eddig elsősorban vérzések okozó vírusok esetében hasonlították össze a ribavirinnel, és a legtöbb esetben hatékonyabbnak bizonyult nála (krími-kongói haemorrhagiás láz vírusa: Oestereich és mtsai, 2014b; Junin arenavírus: Westover és mtsai, 2016). Eredményeink szerint RABV elleni koncentrációfüggő gátlóhatása szignifikáns, de a többi vizsgált hatóanyaghoz képest mérsékeltebb volt. A favipiravir a ribavirin eredményét csak alacsony koncentráció mellett érte el, ami összhangban van a Banyard és mtsai (2019) által leírtakkal. Alacsonyabbnak találtuk ugyanakkor aktivitását a veszettségvírus ellen, mint Yamada és mtsai (2016). A favipiravir a sejtekben a HGPRT enzim általi foszforilációval alakul aktív formába, azonban ennek a konverziós lépésnek a hatékonysága (és ezáltal a vírusellenes effektus) igen eltérő különféle sejttypusokban (Naesens és mtsai, 2013). Az antivirális hatás részletesebb megismeréséhez tehát érdemes lenne további sejtvonalakon is hatásvizsgálatokat végezni, vagy a favipiravir aktív metabolitját

is bevonni a kísérletekbe. Egy nemrég megjelent közlemény rámutatott, hogy a ribavirin kisebb módosításával szintetizált egyes analógok fokozott RABV elleni gátlóhatást mutatnak az eredeti hatóanyaghoz képest (Anindita és mtsai, 2018). A fentiek fényében egyértelmű, hogy a nukleozid analógok veszetség elleni használatában komoly perspektíva van, és további kutatások szükségesek ezen a területen.

Egy kinázgátló daganatellenes szer, a sorafenib többféle vírus replikációját gátló hatása (Descamps és mtsai, 2015; Gao és mtsai, 2014) és a MAP kináz kaskádok fontos szerepe a veszetség okozta agyvelőgyulladás sejtszintű kórfolyamataiban (Nakamichi és mtsai, 2005) arra utalt, hogy érdemes megvizsgálni esetleges antivirális hatását RABV ellen is. Kimutattuk, hogy a sorafenib nagymértékben gátolja a veszetségvírus replikációját: a legmagasabb nem sejtkárosító koncentrációban FFA teszt alapján az IFN- β -val megegyező, míg qRT-PCR-rel vizsgálva azt meghaladó gátlóhatást fejtett ki. Eredményeink alapján tehát az általunk vizsgált hatóanyagok közül az IFN- β mellett a sorafenib bizonyult a leghatásosabb vírusellenes szernek *in vitro* körülmények között.

Ennek a kiemelkedő RABV elleni hatékonyságnak a háttérében lévő hatásmechanizmus feltárásához további vizsgálatok szükségesek. Egyéb vírusok (hepatitis C, humán enterovírus 71, humán cytomegalovírus) esetében kimutatták, hogy a sorafenib – a Raf/MEK/ERK jelátvitel gátlásával összefüggő változatos hatásmechanizmusok révén – a vírusfehérjék szintézisét és a nukleinsav-replikációt is gátolhatja (Himmelsbach és mtsai, 2009; Gao és mtsai, 2014; Michaelis és mtsai, 2011). Besson és mtsai (2019) friss kutatása RNS interferencia segítségével bizonyította, hogy a MAP-kináz jelátvitel számos pontja kulcsfontosságú a RABV replikációs ciklusában, és egy MEK1/2 inhibitorral (PD 198306) szignifikánsan csökkentették a vírusszaporodást humán idegsejtekben. A hatóanyag aktivitása csak a magasabb koncentráció-tartományban (5-10 μ M) volt jelentős, ez alatt kisebb mértékűnek bizonyult. A mi eredményeink – sorafenibet használva – ezzel megegyező dózis-hatás mintázatot mutattak (**13. ábra**; ld. 5.1.4.). A tanulmány szerint a PD 198306 hatásában a MEK és ERK kinázok mellett a cyclin-dependens kinázok gátlása is fontos szerepet játszik, amelyek részt vesznek a transzkripció folyamatok szabályzásában az idegsejtekben (Besson és mtsai, 2019). Tekintve, hogy a RABV sikeres replikációjához a transzkripció pontos szabályozása elengedhetetlen (ld. 3.1.3.), és hogy a sorafenib gátolja a Raf/MEK/ERK jelátvitelt, a leírt folyamatnak szerepe lehet a sorafenib kísérleteikben tapasztalt vírusellenes hatásában is.

Vizsgálataink fontos célja volt, hogy a RABV replikációját gátló hatóanyagok kombinációinak vírusellenes hatását is megállapítsuk. A veszetség elleni antivirális terápiás lehetőségeket és gyógyszerjelölteket felmérő legtöbb tanulmányban csak egyedi hatóanyagokat vizsgálnak. Az emberi veszetség kezelésének eddigi kudarca, valamint a betegség kórfejlődésének és immunológiai háttérének összetettsége alapján valószínűtlen,

hogy monoterápiával sikert lehetne elérni a gyógykezelésben. A vírusellenes kombinációk vizsgálatával nyert *in vitro* eredmények fontosak a lehetséges kezelési stratégiák későbbi kidolgozásához.

Az IFN- β , ribavirin, favipiravir és sorafenib különböző kombinációinak vizsgálata során arra az eredményre jutottunk, hogy az egyedi hatóanyagokhoz képest fokozott vírusellenes hatás érhető el, ha az IFN- β -t kombináljuk bármely másik hatóanyaggal. Az együttes hatás azonban egyik esetben sem mutatott szinergizmust az összetevők között.

A RABV replikációját legnagyobb mértékben az IFN- β + sorafenib kombináció csökkentette. Az FFA teszt logaritmikus eredményéből számított relatív gátlóhatás az 1 IU/ml IFN- β és 5 μ M sorafenib kombinációja esetében 77,19% volt, míg az egyedi összetevők azonos koncentrációban 48,07%, illetve 68,90% gátlást váltottak ki. A kombináció 77,19%-os eredménye még az alkotó szerek tízszer töményebb oldatainak antivirális hatását is felülmúlta. A jelentős RABV elleni védőhatás nem meglepő, hiszen az egyedi hatóanyagok vizsgálata során is az IFN- β és a sorafenib voltak a leghatékonyabb vírusellenes szerek. Számos tanulmányban számolnak be a sorafenib és I-es típusú IFN-ok szinergista hatásáról vese- és májdaganatok kezelésében (IFN- α + sorafenib: Takeuchi és mtsai, 2010; IFN- β + sorafenib: Enomoto és mtsai, 2017). Azonban tekintve, hogy a sorafenib fő tumorellenes hatásmechanizmusa az angiogenezis csökkentése a VEGFR és PDGFR kinázok gátlása által, (ami a veszettségnél nem játszik szerepet) ennek jelentősége kísérleteink szempontjából elhanyagolható. Érdekes módon a hepatitis C vírus replikációjának gátlásában kifejezett antagonizmust írtak le a sorafenib és az IFN- α között (Himmelsbach és Hildt, 2013).

Az I-es típusú IFN-ok és a ribavirin kombinációja a krónikus hepatitis C kezelésének korábban leginkább elterjedt módszere volt (Palumbo és mtsai, 2011). Kísérletünkben az IFN- β + ribavirin kombináció enyhén fokozott, de nem szinergista vírusellenes hatást váltott ki RABV ellen az önállóan használt komponensekhez képest. Ehhez hasonló eredményt kaptunk az IFN- β + favipiravir kombináció elemzésével is: a kombinált gátlóhatás jelentősen meghaladja a favipiravir eredményét, de az IFN- β -ét csak kisebb mértékben. Ezeknél a kombinációknál főként a ribavirin, illetve a favipiravir koncentrációja határozza meg az antivirális effektus mértékét: a magasabb dóziszú ribavirin vagy favipiravir kombinációja alacsonyabb dóziszú IFN- β -val erősebb gátlóhatást mutatott, mint a fordított változat (magas IFN- β + alacsony ribavirin/favipiravir koncentráció). Ez az eredmény meglepő, tekintve, hogy egyedi hatóanyagként az IFN- β jóval nagyobb mértékben csökkentette a vírusmultiplikációt, mint a ribavirin vagy a favipiravir (**15. ábra**, ld. 5.1.6.). Az I-es típusú IFN-ok és a ribavirin kombinációjának *in vitro* hatását több vírus ellen is vizsgálták. Szinergizmusról számoltak be az IFN- β és ribavirin között a SARS coronavirus (Morgenstern és mtsai, 2005), valamint az IFN- α és ribavirin között a chikungunya vírus (Gallegos és mtsai, 2016) elleni hatásban. A

MERS coronavirus replikációjának gátlásában hatékonyabb volt az IFN- α + ribavirin kombináció az egyedi összetevőknél, de szinergizmust nem sikerült igazolni (Falzarano és mtsai, 2013). Az IFN- α és a favipiravir kombinációja a Zika vírus ellen hatékonynak, de nem szinergistának bizonyult (Pires de Mello és mtsai, 2017). Az említett közlemények és a mi eredményeink alapján jól látható, hogy az RNS vírusok elleni nukleozid analógok hatékonysága növelhető I-es típusú IFN-okkal, azonban a kombinációval elérhető hatásnövekedés mértéke eltérő különböző vírusoknál és tesztrendszereknél.

Nagy várakozással tekintettünk a ribavirin + favipiravir kombináció RABV replikációra gyakorolt hatására, mert több tanulmányban erős szinergizmusról számoltak be a két hatóanyag együttes használatánál vérzéses lázat okozó arena- és bunyavírusok ellen, Vero sejtekben és kísérleti állatokban is (Oestereich és mtsai, 2014b és 2016; Westover és mtsai, 2016). Ezt a szinergista hatást nem sikerült igazolnunk RABV ellen N2a sejtekben, sőt, a kombináció antagonizmust mutatott: az együttes antivirális hatás elmaradt az önálló komponensekétől szinte minden vizsgált koncentráció mellett (**15. ábra**, ld. 5.1.6.). Pires de Mello és mtsai (2017) szintén *in vitro* antagonista interakciót mutattak ki a ribavirin és a favipiravir között a Zika vírus elleni kombinációs kezelés esetén. Mindkét molekula aktív metabolitja a virális RdRp-t gátló purin nukleozid analóggként működik, amely beépül az RNS láncba, letális mutagenézist idézve elő (Crotty és mtsai, 2002; Baranovich és mtsai, 2013). Hatásmechanizmusuk tehát átfedést mutat, ami magyarázatul szolgálhat az antagonizmusra. A ribavirin ugyanakkor gátolja az IMPDH enzimet, ami a favipiravirra nem jellemző (Te és mtsai, 2007). Az IMPDH inaktiválása csökkenti az intracelluláris GTP szintet, ami fokozhatja a favipiravir beépülését az épülő RNS szálba, erősítve annak antivirális hatását. Valószínű, hogy a ribavirin által kiváltott egyes folyamatok hangsúlya eltér különböző vírusfertőzések esetén, ami a favipiravirral való kombináció hatását a szinergizmus vagy az antagonizmus felé billentheti. Figyelembe kell venni továbbá, hogy a favipiravir metabolizmusának hatékonysága igen eltérő különféle sejtvonalakban (Naesens és mtsai, 2013).

Kísérleteink egyértelművé tették, hogy a sorafenib kombinálása ribavirinnel vagy favipiravirral a RABV replikációjának gátlása érdekében nem célszerű, ugyanis erős antagonizmus lép fel közöttük. A kombinációk közül csak azok tudták szignifikánsan gátolni a vírusszaporodást, amelyek a sorafenib magasabb koncentrációját tartalmazták, de ezek antivirális hatása is jelentősen elmaradt az azonos dózisban egyedileg használt sorafenibétől. Alacsonyabb sorafenib koncentráció esetén számottevő vírusellenes hatás nem volt; még a ribavirin vagy a favipiravir magasabb koncentrációja mellett sem. A Raf/MEK/ERK jelátviteli út hatása szerteágazó a sejtekben; az érintett tirozin-kinázok számos metabolikus folyamat szabályozásában vesznek részt. Lehetséges, hogy a sorafenib által gátolt MAP kináz kaszkádok valamelyike kulcsfontosságú szerepet játszik a ribavirin és a favipiravir pro-drugból

aktív hatóanyaggá történő enzimátikus konverziójában. Kimutatták például, hogy a (favipiravir metabolizmusáért elsődlegesen felelős) HGPRT enzim és az ERK kinázok kölcsönhatásban lehetnek egymással (Kang és mtsai, 2013). A folyamatok részletes felderítése azonban további alapos kutatást igényelne.

A hatóanyagok és kombinációik veszettségvírus elleni *in vitro* gátlóhatását három különböző módszerrel is meghatároztuk (sejtek fertőzöttségi aránya, FFA, qRT-PCR). A három vizsgálati eljárás eredményei minden esetben összhangban voltak, azonos tendenciákat tártak fel, ami nagyban növeli következtetéseink megbízhatóságát. A módszerek közti alapvető különbségek okoztak kisebb eltéréseket a részletes eredményekben, mivel a vírusréplikáció különböző stádiumairól adnak információt. Első lépésként meghatároztuk az N2a sejtek fertőzöttségének mértékét a kísérleti lemezekon: immunfluoreszcens festést követően a fluoreszcenciát mutató sejtek arányát vizsgáltuk. Mivel a módszer vizuális megfigyelésen alapuló becslésre épül, csak szemikvantitatív eredményeket kaphattunk. Ezek az információk azonban jól jelezték a vizsgált szerek által kiváltott effektust, amit később a másik két módszerrel igazolni tudtunk. A vírusellenes hatásról a legpontosabb képet a sejtekből kiszabadult utódvirionok számát meghatározó FFA teszt nyújtja. Ennek során a fertőzött sejtenyészetek felülúszójában mértük a RABV infektív titerét, ami csak a teljes értékű, fertőzőképes virionokat veszi figyelembe. Ezért fő megállapításainkat az antivirális szerek gátlóhatásáról az FFA módszerre alapoztuk. Ugyanazon mintákból qRT-PCR-rel a RABV-specifikus nukleinsavak mennyiségét is kimutattuk. Mivel ezzel a módszerrel főként az FFA eredmények megerősítése volt a célunk, az összehasonlíthatóság érdekében az RNS kópiaszámokat titer-ekvivalens TCID₅₀ értékekben fejeztük ki. A vírustiterek kvantitatív PCR-alapú közelítő számítását többféle vírusról is használják (Jonsson és mtsai, 2009; Gustafsson és mtsai, 2012). Az FFA tesztel összehasonlítva a PCR-rel meghatározott TCID₅₀-ekvivalens értékek a legtöbb esetben magasabbak voltak; főként a hatóanyagok magasabb koncentrációi mellett, amelyek erősebben gátolták a vírusszaporodást. Ez nem meglepő, tekintve, hogy a qRT-PCR módszer az összes vírus-eredetű nukleinsavat kimutatja a mintában, beleértve az mRNS-eket, replikációs intermediereket, inkomplett partikulák nukleinsavait is. A tesztelt hatóanyagok (és az IFN-kezelés következtében termelődött IFN-indukált fehérjék) különböző mechanizmussal fejtik ki gátlóhatásukat, gyakran a vírusréplikáció későbbi szakaszaiban. Így a szaporodásra képes utódvirionok kibocsájtása nagyobb mértékben csökkenhet, mint a vírusspecifikus RNS-ek mennyisége. Magasabb vírustiterek esetén (kb. 10⁶ TCID₅₀ felett) a két módszerrel kapott eredmények között már nem mutatkozott érdemi különbség (sőt, ritka esetekben az FFA teszt eredménye kissé meghaladta a PCR-rel számított titeret), mivel az amplifikáció nagyon magas templátkoncentráció mellett csökkent hatékonyságú lehet.

6.2. *In vivo* kísérleti szakasz

Az *in vitro* kísérleteken túl egérmodellben is vizsgáltunk veszettség elleni lehetséges kombinációs terápiákat. *In vivo* kutatómunkánk fő irányvonala az immunrendszer veszettségre adott káros válaszreakciójának csökkentése volt, többféle immunmoduláns hatóanyag kombinációjával. A későbbi kísérletekben a tesztelt, különféle gyulladáscsökkentő szereket RABV-specifikus ellenanyagokkal és az *in vitro* kísérleti szakaszban bizonyított gátlóhatású antivirális készítményekkel kombináltuk. Három állatkísérletet végeztünk el, különböző terápiás kombinációkkal különböző adagolási séma szerint kezelve veszettségvírussal fertőzött C57Bl/6 egereket. A fertőzéshez a fixált laboratóriumi CVS-11 helyett egy vad-típusú RABV törzset, a denevér eredetű SHBRV-18-at használtuk.

Az első kísérletben a terápiás kombinációt a sorafenib, az infliximab és az Ac-YVAD-cmk alkották, amelyek MAP kináz-, TNF- α -, illetve CASP-1-gátló szerek. Kutatási partnereink előkísérleteiben ezek a hatóanyagok – monoterápiában használva – elnyújtották a veszettség kórlefolását egérmodellben, ezáltal késleltették az elhullást, de megelőzni nem tudták (Smreczak és mtsai, 2019; Koraka és mtsai, 2019). Kísérletünkben a három gyulladáscsökkentő anyag kombinációja a kezelés időzítésétől függően – kimutatható toxikus hatás nélkül – 15-30%-kal csökkentette az elhullást vírusfertőzött egerekben. Bár jól látható a kezelés jótékony hatása, a túlélési arány különbsége a Fisher-próba szerint nem szignifikáns a kísérleti csoportok között. Ez az egerek fertőzéséhez használt relatív alacsony, LD₅₀ vírudózis következménye, mivel a víruskontroll csoport ennek megfelelő, kb. 50%-os mortalitása és 13-as csoportlétszám mellett a statisztikai próba ereje nem volt elegendő. Ha abból indulunk ki, hogy a víruskontroll csoport túlélési aránya az LD₅₀-hez igazodott, és ezt a fix értéket referenciának tekintjük, a statisztikai elemzést egzakt binomiális próbával is elvégezhetjük. Ez esetben a túlélési arány szignifikánsan magasabb a víruskontrollnál abban a csoportban, amelynek kezelését 96 órával a fertőzés után kezdtük, és a három terápiás csoportot összesítve is szignifikáns a kezelés hatása a túlélésre.

Érdekes módon a túlélési arány magasabb volt azokban a csoportokban, amelyekben a kombinációs kezelést később kezdtük: míg a pre-expozíciós terápiás séma mellett (-4h csoport) az egerek 61,5%-a élte túl a fertőzést, addig a két posztexpozíciós csoport (48h és 96h) eredménye 69,2% és 76,9% volt. Hasonló tendencia mutatkozott a KIR-ben mérhető RABV antigének mennyiségét immunhisztokémiai módszerrel vizsgálva: a kezelt csoportok között a legmagasabb antigénszintet a -4h csoportban, a legalacsonyabbat a 96h csoportban állapítottuk meg. Az IHK vizsgálatok értékelésekor ugyanakkor figyelembe kell venni, hogy az agy és gerincvelő csak néhány metszetét vizsgáltuk meg, így az eredmények nem feltétlenül reprezentatívak. Mivel a virális antigének szintjének összehasonlításakor a túlélő és vírustól mentes idegrendszerű állatokat nem vettük figyelembe, elmondható, hogy a később kezelni kezdett csoportok tagjaiban alacsonyabb volt a vírusterhelés akkor is, ha végül nem éltek túl a

betegséget. A jelenség magyarázata az lehet, hogy a gyulladáscsökkentő szerek kombinációját minden csoportban 8 napig adagoltuk, így a korábban megkezdett terápia korábban véget is ért. A túlélési görbékből látható, hogy az elhullások két nagyobb hullámban zajlottak le: a 7-8. napon, majd a 12-13. napon (**19. ábra**, ld. 5.2.1.2.). Ez utóbbi idején a -4h csoport már legalább 4 napja, a 48h csoport pedig 2 napja nem kapott kezelést. Megfigyelhető, hogy a 96h csoport esetében – amelynél a hatóanyagok adagolása a 12. napig tartott – ez a késői mortalitás nem jelentkezett.

A vírusszaporodás mértékét a KIR-ben qRT-PCR-rel is elemeztük. Mivel az *in vitro* kísérletekben használt, Wakeley és mtsai (2005) által leírt TaqMan próba az SHBRV-18 vírustörzsre nem bizonyult megfelelőnek (bár az amplifikáció sikeresen lezajlott – a termékek agaróz gél elektroforézissel jól láthatók voltak – a real-time PCR készülék nem adott értelmezhető eredményt), az egérkísérletek esetében a PCR módszert a próba mellőzésével, SyBR Green rendszerben használtuk. A RABV-specifikus nukleinsavak mennyiségében nem volt szignifikáns különbség az egyes (vírussal fertőzött) kísérleti csoportok között, mert az elpusztult egerek esetében terápiától függetlenül magas RNS-szintet mértünk, míg a túlélő állatok többsége negatív eredményt adott. A virális RNS mennyiségek hasonló szintje a csoportok között nem meglepő, tekintve, hogy a használt hatóanyagok elsődlegesen nem a vírusreplikációt gátolják, hanem a gazdaszervezet gyulladáscsökkentő válaszütemét befolyásolják.

Figyelemre méltó, hogy a túlélő egyedek közül négy agyában és gerincvelőjében, egy továbbinak pedig csak a gerincvelőjében sikerült kimutatni a RABV RNS-ét, bár jelentősen kisebb kópiaszámban, mint a humánus végpontot elért állatoknál. Ezeknek a PCR-pozitív túlélőknek a gerincvelőjében a virális antigének is kimutathatók voltak, az agy IHK-vizsgálata azonban csak egy esetben, a 48h csoport egy tagjánál adott pozitív eredményt. Ez utóbbi egér annak ellenére túlélte a fertőzést, hogy kialakultak nála a veszettség korai tünetei (klinikai pontozásos rendszer szerinti 1-es stádium: a bal hátsó láb bénulása). A tünetei később jelentkeztek (16. nap), és nem progrediáltak; a kórelfolyás megállt ezen a ponton. Jól ismert, hogy a vad-típusú RABV törzsek késleltetik a szervezet fertőzésre adott immunválaszát, többféle immun-elkerülő mechanizmus által (Katz és mtsai, 2017). Így feltételezhető, hogy a kombinációs kezelés a gyulladáscsökkentő folyamatok kordában tartásával késleltette az idegszöveti károsodást és a neuronok funkciózavarának elhatalmasodását. Ez időt adhatott az effektor limfociták megkésett belépéséhez a KIR-be, ami a vírusfertőzés kontrollálásának elsődleges feltétele (Hooper és mtsai, 2009; Li és mtsai, 2012). A néhány PCR-/IHK-pozitív egér túlélését tehát az magyarázhatja, hogy a gyulladáscsökkentő terápia támogatásával az immunrendszer időben megállította a fertőzés terjedését az idegrendszerben; még a tünetek megjelenése előtt, vagy kevéssel utána. A végzetes agyvelőgyulladás megelőzésében fontos szerepe van a neutralizáló ellenanyagoknak (Gnanadurai és mtsai, 2013; Miao és mtsai, 2017; Hooper és mtsai, 1998), ezért lényeges, hogy minden túlélő egérben igazoltuk a szerokonverziót. A vírus KIR-i jelenlétére

PCR/IHK vizsgálattal pozitív állatokban az átlagnál magasabb ellenanyag szintet mértünk.

A veszettség kórfolyamataiban a gyulladási folyamatok szerepe igen összetett, és mai napig nem minden részletében tisztázott (Chopy és mtsai, 2011b). Egyértelműnek tűnik, hogy a szervezet védekezésének fontos részét képezi a veszettség immunrendszer gyors válaszreakciója, ami gyulladási jelenségekkel jár. A periférián és az idegrendszeri fertőzés kezdeti fázisában a túlélés szempontjából előnyös a gyulladási kemokinek up-regulációja, ami kemotaktikus környezetet alakít ki, és a vírusszaporodás helyére vonzza az immunsejteket (Nakamichi és mtsai, 2004; Wang és mtsai, 2005). Az I-es és II-es típusú IFN-ok egymás hatását erősítve közvetlen antivirális hatást váltanak ki (Barkhouse és mtsai, 2015), egyes interleukinok termelődése pedig segíti az adaptív immunválasz korábbi aktivációját. Mindezek a folyamatok attenuált RABV-törzsek fertőzésekor kimutathatók, és megelőzik a vírus bejutását a KIR-be, vagy rövid időn belül megállítják az idegrendszeri fertőzést, mielőtt kontrollálhatatlanná válna.

Virulens, vad-típusú vírusoknál a fent leírt gyulladási válasz késik vagy elmarad (Wang és mtsai, 2005; Miao és mtsai, 2017). A megkésített immunreakció miatt a gyulladási folyamatok egy második hulláma kap nagyobb jelentőséget vad-típusú RABV esetében, ami már azt követően lép fel, hogy a vírus szétterjedt a KIR-ben (Niu és mtsai, 2011). Ez a késői kaszkád tartósan fennmarad, és súlyos neuronális funkciózavarokat okoz, amik a betegség tüneteinek elsődleges okai. Károsodik az idegsejtek citoskeletonja, ami a szinapszisok rendellenes működéséhez vezet (Li és mtsai, 2005); mitokondriális túlműködés következtében reaktív oxigénszármazékok szaporodnak fel (oxidatív stressz), axonális duzzanatot okozva (Kammouni és mtsai, 2015); a leszálló fertőzés fázisában pedig az idegrostok velőshüvelyei károsodnak, ami bénulásokat okoz (Mitrabhakdi és mtsai, 2005). A késői, destruktív gyulladási válasz fontos résztvevői a mikroglia sejtek, amelyek virulens RABV-fertőzésre az iNOS és TNF- α up-regulációjával reagálnak (Madhu és mtsai, 2016). A keletkezett nitrogén-oxidok és TNF- α károsítják az idegszövetet (Liao és mtsai, 2012; Ubol és mtsai, 2001; Solanki és mtsai, 2009), és más citokinek (IL-6, CCL5, CXCL10) is felszaporodnak, hozzájárulva a betegség végzetes kimeneteléhez (Niu és mtsai, 2011). Súlyosbítja a helyzetet a CASP-1 inflammoszómákban történő aktivációja, ami piroptotikus sejthalált okoz az idegrendszerben (Koraka és mtsai, 2018).

Az általunk használt hatóanyagok közül a sorafenib a Raf/MEK/ERK jelátvitel gátlásával csökkenti az iNOS, TNF- α és egyes kemokinek termelődését a mikroglia sejtekben, valamint *in vitro* eredményeink alapján közvetlenül gátolja a vírusreplikációt az idegsejtekben. Az infliximab a TNF- α elleni antitest, az Ac-YVAD-cmk pedig gátolja a CASP-1-et és ezáltal a piroptózist. Mindezek fontos részesei a RABV fertőzést követő második gyulladási hullámnak. Valószínű, hogy a három hatóanyag kombinációja ennek a késői gyulladási válasznak a mérséklése által növelte a túlélési esélyt a vad-típusú SHBRV-18 vírustörzsszel fertőzött egerekben. Bár a különböző időzítés szerint kezelt csoportok közti különbségek nem

voltak szignifikánsak; eredményeink arra utalnak, hogy a hosszabb ideig (a fertőzés utáni 10-12. napig) fenntartott terápia erősíti a védőhatást. Ez összhangban van feltételezésünkkel, hogy a fokozott túlélés főként a késői gyulladással szembeni enyhítésének köszönhető.

A kombinációs kezelés hatékonyságában egy másik mechanizmus is szerepet játszhat. Vad-típusú RABV fertőzésnél a KIR-be belépő limfociták (főként T sejtek) fokozott apoptózist szenvednek, mert a vírus indukálja a FasL szintézisét az idegsejtekben. Ez a molekula a limfociták Fas receptorához kötődve beindítja azok apoptózisát, ezáltal az adaptív immunválasz számottevően sérül (Baloul és mtsai, 2004). A FasL a TNF-csoportba tartozik, és kimutatták, hogy maga a TNF- α is aktiválhatja a Fas-függő kaszkádot (Suzuki és mtsai, 1999). A TNF- α -gátló infliximab tehát ellensúlyozhatja a folyamatot, hozzájárulva, hogy több T sejt maradjon működőképes az agyban. A FasL transzkripciójának szabályzásában alapvető szerepe van a MEKK1/JNK/c-Jun jelátviteli útnak, amely a MAPK-kaszkádok közé tartozik (Kavurma és Khachigian, 2003). Bár a sorafenib a MAPK-ok közül a Raf-ra van a legnagyobb hatással, kimutatták, hogy kisebb mértékben a JNK-t is gátolja (Vin és mtsai, 2014), és ezzel szintén megelőzheti az immunsejtek FasL/Fas-függő apoptózisát.

Természetesen nem valószínű, hogy az immunmoduláns kezelés önmagában elegendő a veszettség túléléséhez. Az agyi gyulladással szembeni folyamatok és az immunsejtek apoptózisának gátlása azonban értékes időt adhat az adaptív immunválasznak, hogy a KIR-be belépő B-limfociták és az általuk helyben termelt ellenanyagok eliminálják a fertőzést. Ez a megközelítés előnyös lehet az emberi veszettség kezelésében is, ahol a tapasztalatok azt mutatják, hogy ha sikerül kellőképpen lelassítani a betegség progresszióját, az immunrendszer leküzdheti a vírust (Jackson, 2013, de Souza és Madhusudana, 2014).

Az ellenanyagok védőhatásának jobb kiaknázása érdekében a második kísérletben a gyulladáscsökkentő kombinációt HRIG-el egészítettük ki. Az első kísérlet tapasztalatai alapján a kezelés időtartamát minden csoportnál 10 napra növeltük. A statisztikai próbák erősítése céljából a víruskontroll csoport létszámát megemeltük, és az egereket LD₁₀₀ vírusedménnyel fertőztük. A kombinációs terápia minden kezelt csoportban szignifikánsan csökkentette az elhullás arányát a víruskontrollhoz képest. A túlélési görbék statisztikai elemzése is megerősítette a kezelés hatékonyságát: a -4h és 48h csoportok görbéi szignifikánsan, míg a 96h csoporté azt megközelítő mértékben ($P=0,0610$) tértek el a víruskontrolltól. A -4h csoportban mindössze egy állat érte el a humánus végpontot, ami a terápia kiemelkedő védőhatását jelzi a veszettség okozta mortalitással szemben. Ennél a csoportnál az idegrendszeri RNS kópiaszámok is alacsonyabbak voltak a víruskontrollnál, de a többi kezelt csoport esetében nem voltak szignifikáns eltérések a qRT-PCR eredményekben.

A túlélési adatok az első kísérlethez képest ellentétes mintázatot mutattak: a korábban megkezdett kezelés mellett nagyobb arányban maradtak életben az egerek. A különbség

leginkább a pre- és posztexpozíciós adagolási sémák között mutatkozott meg; a 48h és 96h csoportok eredménye hasonló volt. A jelenség egyértelműen a HRIG szerepének tulajdonítható a kombinációban: nagy mennyiségű ellenanyag korai jelenléte erősen csökkent elhulláshoz vezet azáltal, hogy a RABV-t még a periférián neutralizálva megelőzi a vírus bejutását a KIR-be, vagy erősen csökkenti annak mértékét (Madhusudana és mtsai, 2013; Lebrun és mtsai, 2015). Ez a háttere annak is, hogy a sikeres humán PEP protolloknak fontos részét képezi a HRIG vagy ERIG beadása (Fooks és mtsai, 2017; WHO, 2013). Később indított kezelés esetén azonban az exogén HRIG jótékony hatása jelentősen csökken, a túlélési arány növekedésében így egyre inkább a MAPK-, TNF- α - és CASP-1-gátlók hatása dominálhat. Több kutatási eredmény bizonyítja, hogy a perifériás ellenanyagok bejutása az agyba korlátozott vad-típusú RABV fertőzés esetén, ezért a KIR-t már elért fertőzést nem tudják felszámolni (Huang és mtsai, 2014). A túlélést csak a KIR-be belépő B sejtek által *in situ* termelt ellenanyagok biztosíthatják kialakult idegrendszeri fertőzés esetén (Hooper és mtsai, 2009; Lebrun és mtsai, 2015).

Annak bizonyítására, hogy a -4h-s kezelési sémát követő nagyarányú túlélés nem kizárólag az ellenanyagoknak köszönhető, egy külön kontrollcsoportot is beiktattunk a kísérletbe: ennek tagjai HRIG monoterápiát kaptak, a -4h kezelési protokollt követve. A csoport túlélési aránya (76,9%) jelentősen meghaladta a víruskontrollét (11,5%), de alacsonyabb volt a kombinációval azonos időzítés szerint kezelt csoporténál (92,3%). Az eredmény megmutatja, hogy az immunmoduláns hatóanyagok hozzájárultak a védőhatáshoz, tehát a kombinációs kezelés hatékonyabb az ellenanyagok önálló használatánál.

A harmadik egérvizsgálathoz az volt a célunk, hogy maximalizáljuk a késői posztexpozíciós kezelés hatását a túlélésre. A modellezni kívánt humán esetek nagy részében ugyanis nincs lehetőség a gyógykezelés korai elindítására. Ennek megfelelően csak egyféle adagolási protokollt használtunk: az egerek kezelését a fertőzés után 96 órával kezdtük meg, amikor a vírus már nagy valószínűséggel elérte a KIR-t. A második kísérletben használt hatóanyagokon felül az *in vitro* vizsgálatokban a RABV replikációját sikeresen csökkentő vírusellenes szereket – I-es típusú IFN-okat, ribavirint és favipiravirt – is bevontuk a terápiás kombinációba. A kombinációs kezelés mellett mannitot is adtunk az egereknek a vér-agy-gát megnyitása céljából (Dufkova és mtsai, 2019). Ismert, hogy virulens RABV-fertőzésnél a vér-agy gát átjárhatósága eleinte csak kis mértékben fokozódik, majd az agyvelőgyulladás későbbi szakaszában számottevően megnő (Miao és mtsai, 2017). A vér-agy gát megnyitásától ezért a terapeutikumok, az immunsejtek és a perifériás ellenanyagok korábbi, nagyobb mértékű bejutását vártuk az idegrendszerbe, ami szerepet játszhat a túlélésben (Roy és Hooper, 2007).

Ebben a kísérletben nem tudtuk igazolni a kombináció veszettség elleni védőhatását, mert az alkalmazott kezelés toxikusnak bizonyult az egerekre. A toxicitást egyértelműen mutatja a hatóanyag-kontroll csoport hirtelen testtömegvesztése a kezelés megkezdésének napjától,

amit négy-öt nappal később a csoport tagjainak felében egyre súlyosbodó apátia, elfekvés és végül elhullás követett. A toxikus hatás a fertőzött-kezelt csoportban is látható volt. Amellett, hogy az alkalmazott kezelés egyáltalán nem segítette elő a túlélést, két elhullott egyed nem a veszettségre, hanem a hatóanyag-kontroll csoportban tapasztalt toxicitásra jellemző klinikai képet mutatott. A csoport többi tagjánál nehéz megállapítani a toxicitás szerepét az elhullásban, mert a testtömeg csökkenése a veszettségre is jellemző, és a legtöbb egérnél a veszettség okozta tünetek a fertőzést követő 6-7. nap körül jelentek meg, még a toxicitás látható jelei előtt. A fertőzött-kezelt állatok 100%-os mortalitásához képest a víruskontroll csoportban 84,6%-os elhullási arányt figyeltünk meg. Úgy tűnik tehát, hogy a toxicitás gyengítette az egerek általános állapotát és védekezőképességét a veszettség ellen.

Nehéz egyértelműen megállapítani a tapasztalt toxicitás okát, mert a parenchymás szervekben nem láttunk lényeges elváltozásokat, és a kombinációban szereplő hatóanyagok a felhasznált dózisban egyenként nem toxikusak. Ezt a gyulladáscsökkentő szerekre vonatkozóan az első és második kísérletre, míg a többi hatóanyag esetében szakirodalmi adatokra alapozva jelenthetjük ki (Iigo és mtsai, 1997; Oestereich és mtsai, 2014b; Gowen és mtsai, 2013). Kutatási partnereink eredményei szerint a vér-agy gát mannittal végzett megnyitása is biztonságos (Dufkova és mtsai, 2019). Valószínű tehát, hogy interakció lépett fel egyes komponensek között. Elképzelhető, hogy a rossz vízoldhatóságú sorafenib vivőanyagaként használt cremophor EL (CrEL) felületaktív adalék szerepet játszott a toxikus hatásban. Az első két állatkísérletben az *in vitro* kísérleti szakaszhoz hasonlóan DMSO-ban oldottuk fel a sorafenibet, azonban a szakirodalomban publikált vizsgálatok szinte mindegyikében a CrEL-t használták erre a célra (Liu és mtsai, 2006; Fendrich és mtsai, 2012; Sonntag és mtsai, 2014). Ennek fényében a harmadik kísérletre megváltoztattuk a protokollt. Más hatóanyagok használata mellett leírtak már a CrEL által okozott toxicitást és interakciókat (Gelderblom és mtsai, 2001). Elképzelhető tehát, hogy a CrEL inkompatibilis valamely általunk használt hatóanyaggal, ezért hasonló kombinációs terápiáknál érdemes a jövőben más segédanyagot választani a sorafenibhez.

Állatkísérleteink eredményeit összefoglalva elmondható, hogy a RABV fertőzés hatására fellépő káros immunreakció gátlása javítja a túlélés esélyét, vélhetően a KIR-ben kialakuló késői gyulladáshoz való válasz csökkentése által. A kezelést érdemes sokáig fenntartani, hogy időt adjon az adaptív immunitásnak és a neutralizáló ellenanyagoknak a fertőzés felszámolásához. RABV-specifikus ellenanyagok korai adminisztrációjával nagymértékben fokozható a kezelés jótékony hatása. Vírusreplikációt gátló szerek és a vér-agy gát megnyitása szintén segíthetik a túlélést, ennek bizonyítása azonban további vizsgálatokat igényel, amelyek során a toxikus interakciók elkerülésére külön figyelmet kell fordítani. Eredményeink hasznos adatokkal szolgálhatnak egy jövőbeli sikeres humán terápiás protokoll kidolgozásához.

7. Új tudományos eredmények

- 1) Elsőként igazoltuk a multikináz-gátló sorafenib jelentős *in vitro* antivirális hatását veszettségvírus ellen.
- 2) Elsőként vizsgáltuk interferonok egyéb antivirális hatóanyagokkal alkotott kombinációinak veszettség elleni *in vitro* hatását és igazoltuk, hogy az IFN- β sorafenibbel, ribavirinnel vagy favipiravirral kombinálva jelentősen gátolja a veszettségvírus replikációját.
- 3) Rámutattunk, hogy a ribavirin, a favipiravir és a sorafenib különböző kombinációinak alkalmazása veszettség esetén nem javasolható a köztük fellépő antagonizmus miatt.
- 4) Kimutattuk, hogy bizonyos gyulladáscsökkentő és citokinek gátló hatóanyagok (CASP-1-, MAP-kináz- és TNF- α -inhibitorok) kombinációja javítja a túlélési arányt veszettségvírussal fertőzött egerekben, feltehetőleg az idegrendszerben fellépő késői gyulladáscsökkentő válasz gátlása által.
- 5) Kimutattuk, hogy a CASP-1-, MAP-kináz- és TNF- α -gátló szerek kombinációja veszettség elleni ellenanyagokat tartalmazó hiperimmun savóval kiegészítve nagymértékben növeli a túlélést egérmódelben, és ez a védőhatás kifejezettebb, mint ami az ellenanyagok önálló alkalmazásával elérhető.

8. Irodalomjegyzék

- Abela-Ridder, B.; Knopf, L.; Martin, S.; Taylor, L.; Torres, G.; De Balogh, K.: **2016: the beginning of the end of rabies?** *Lancet Glob. Health*, 4. e780-e781, 2016.
- Ahmad, T.; Musa, T.H.; Jin, H.: **Rabies in Asian Countries: Where we are stand?** *Biomed. Res. Ther.*, 5. 2719-2720, 2018.
- Anindita, P.D.; Sasaki, M.; Okada, K.; Ito, N.; Sugiyama, M.; Saito-Tarashima, N.; Minakawa, N.; Shuto, S.; Otsuguro, S.; Ichikawa, S.; Matsuda, A.; Maenaka, K.; Orba, Y.; Sawa, H.: **Ribavirin-related compounds exert in vitro inhibitory effects toward rabies virus.** *Antiviral Res.*, 154. 1-9, 2018.
- Appolinario, C.M.; Jackson, A.C.: **Antiviral therapy for human rabies.** *Antivir. Ther.*, 20. 1-10, 2015.
- Appolinario, C.M.; Prehaud, C.; Allendorf, S.D.; de Paula Antunez, J.M.A.; Peres, M.G.; Lafon, M.; Megid, J.: **Ribavirin has an In vitro Antiviral Effect in Rabies Virus Infected Neuronal Cells but Fails to Provide Benefit in Experimental Rabies in Mice.** *J. Virol. Antivir.*, 2. 1-5, 2013.
- Ascioglu, S.; Leblebicioglu, H.; Vahaboglu, H., Chan, K.A.: **Ribavirin for patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever: a systematic review and meta-analysis.** *J. Antimicrob. Chemother.*, 66. 1215-1222, 2011.
- Baloul, L.; Camelo, S.; Lafon, M.: **Up-regulation of Fas ligand (FasL) in the central nervous system: a mechanism of immune evasion by rabies virus.** *J. Neurovirol.*, 10. 372-382, 2004.
- Banyard, A.C.; Mansfield, K.L.; Wu, G.; Selden, D.; Thorne, L.; Birch, C.; Koraka, P.; Osterhaus, A.D.M.E.; Fooks, A.R.: **Re-evaluating the effect of Favipiravir treatment on rabies virus infection.** *Vaccine*, 37. 4686-4693, 2019.
- Baranovich, T.; Wong, S.S.; Armstrong, J.; Marjuki, H.; Webby, R.J.; Webster, R.G.; Govorkova, E.A.: **T-705 (favipiravir) induces lethal mutagenesis in influenza A H1N1 viruses in vitro.** *J. Virol.*, 87. 3741-3751, 2013.
- Barkhouse, D.A.; Garcia, S.A.; Bongiorno, E.K.; Lebrun, A.; Faber, M.; Hooper, D.C.: **Expression of interferon gamma by a recombinant rabies virus strongly attenuates the pathogenicity of the virus via induction of type I interferon.** *J. Virol.*, 89. 312-322, 2015.

- Bauer, A.; Nolden, T.; Schröter, J.; Römer-Oberdörfer, A.; Gluska, S.; Perlson, E.; Finke, S.: **Anterograde glycoprotein-dependent transport of newly generated rabies virus in dorsal root ganglion neurons.** *J. Virol.*, 88. 14172-14183, 2014.
- Bausch, D.G.; Hadi, C.M.; Khan, S.H.; Lertora, J.J.: **Review of the literature and proposed guidelines for the use of oral ribavirin as postexposure prophylaxis for Lassa fever.** *Clin. Infect. Dis.*, 51. 1435-1441, 2010.
- Begeman, L.; Geurts van Kessel, C.; Finke, S.; Freuling, C.M.; Koopmans, M.; Müller, T.; Ruigrok, T.J.; Kuiken, T.: **Comparative pathogenesis of rabies in bats and carnivores, and implications for spillover to humans.** *Lancet Infect. Dis.*, 18. e147-e159, 2018.
- Ben Khalifa, Y.; Luco, S.; Besson, B.; Sonthonnax, F.; Archambaud, M.; Grimes, J.M.; Larrous, F.; Bourhy, H.: **The matrix protein of rabies virus binds to RelAp43 to modulate NF- κ B-dependent gene expression related to innate immunity.** *Sci Rep.*, 6. 39420, 2016.
- Besson, B.; Kim, S.; Kim, T.; Ko, Y.; Lee, S.; Larrous, F.; Song, J.; Shum, D.; Grailhe, R.; Bourhy, H.: **Kinome-Wide RNA Interference Screening Identifies Mitogen-Activated Protein Kinases and Phosphatidylinositol Metabolism as Key Factors for Rabies Virus Infection.** *mShare*, 4. e00047-19, 2019.
- Both, L.; van Dolleweerd, C.; Wright, E.; Banyard, A.C.; Bulmer-Thomas, B.; Selden, D.; Altmann, F.; Fooks, A.R.; Ma, J.K.: **Production, characterization, and antigen specificity of recombinant 62-71-3, a candidate monoclonal antibody for rabies prophylaxis in humans.** *FASEB J.*, 27. 2055-2065, 2013.
- Brambilla, R.; Ashbaugh, J.J.; Magliozzi, R.; Dellarole, A.; Karmally, S.; Szymkowski, D.E.; Bethea, J.R.: **Inhibition of soluble tumour necrosis factor is therapeutic in experimental autoimmune encephalomyelitis and promotes axon preservation and remyelination.** *Brain*, 134. 2736-2754, 2011.
- Broz, P.; Dixit, V.M.: **Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling.** *Nat. Rev. Immunol.*, 16. 407-420, 2016.
- Brzózka, K.; Finke, S.; Conzelmann, K. K.: **Identification of the rabies virus alpha/beta interferon antagonist: phosphoprotein P interferes with phosphorylation of interferon regulatory factor 3.** *J. Virol.*, 79. 7673-7681, 2005.
- Brzózka, K.; Finke, S.; Conzelmann, K. K.: **Inhibition of interferon signaling by rabies virus phosphoprotein P: activation-dependent binding of STAT1 and STAT2.** *J. Virol.*, 80. 2675-2683, 2006.

- Bussereau, F.; Ermine, A.: **Effects of heteropolyanions and nucleoside analogues on rabies virus: In vitro study of syntheses and viral production.** *Annales de l'Institut Pasteur/Virologie*, 134. 487-506, 1983.
- Cai, Q.; Yang, M.; Liu, D.; Chen, J.; Shu, D.; Xia, J.; Liao, X.; Gu, Y.; Cai, Q.; Yang, Y.; Shen, C.; Li, X.; Peng, L.; Huang, D.; Zhang, J.; Zhang, S.; Wang, F.; Liu, J.; Chen, L.; Chen, S.; Wang, Z.; Zhang, Z.; Cao, R.; Zhong, W.; Liu, Y.; Liu, L.: **Experimental Treatment with Favipiravir for COVID-19: An Open-Label Control Study.** *Engineering*, DOI: 10.1016/j.eng.2020.03.007, 2020.
- Caillet-Saguy, C.; Maisonneuve, P.; Delhommel, F.; Terrien, E.; Babault, N.; Lafon, M.; Cordier, F.; Wolff, N.: **Strategies to interfere with PDZ-mediated interactions in neurons: What we can learn from the rabies virus.** *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 119. 53-59, 2015.
- Chávez, J.H.; Leal, P.C.; Yunes, R.A.; Nunes, R.J.; Barardi, C.R.; Pinto, A.R.; Simões, C.M.; Zanetti, C.R.: **Evaluation of antiviral activity of phenolic compounds and derivatives against rabies virus.** *Vet. Microbiol.*, 116. 53-59, 2006.
- Choi B.; Hwang, Y.; Kwon, H.; Lee, E.S.; Park, K.S.; Bang, D.; Lee, S.; Sohn, S.: **Tumor necrosis factor alpha small interfering RNA decreases herpes simplex virus-induced inflammation in a mouse model.** *J. Dermatol. Sci.*, 52. 87-97, 2008.
- Chopy, D.; Detje, C.N.; Lafage, M.; Kalinke, U.; Lafon, M.: **The type I interferon response bridles rabies virus infection and reduces pathogenicity.** *J. Neurovirol.*, 17. 353-367, 2011a.
- Chopy, D.; Pothlichet, J.; Lafage, M.; Mégret, F.; Fiette, L.; Si-Tahar, M.; Lafon, M.: **Ambivalent role of the innate immune response in rabies virus pathogenesis.** *J. Virol.*, 85. 6657-6668, 2011b.
- Crotty, S.; Cameron, C.; Andino, R.: **Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis?** *J. Mol. Med. (Berl.)*, 80. 86-95, 2002.
- de Souza, A.; Madhusudana, S.N.: **Survival from rabies encephalitis.** *J. Neurol. Sci.*, 339. 8-14, 2014.
- Delhaye, S.; Paul, S.; Blakqori, G.; Minet, M.; Weber, F.; Staeheli, P.; Michiels, T.: **Neurons produce type I interferon during viral encephalitis.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103. 7835-7840, 2006.

- Descamps, V.; Helle, F.; Louandre, C.; Martin, E.; Brochet, E.; Izquierdo, L.; Fournier, C.; Hoffmann, T.W.; Castelain, S.; Duverlie, G.; Galmiche, A.; François, C.: **The kinase-inhibitor sorafenib inhibits multiple steps of the Hepatitis C Virus infectious cycle in vitro**. *Antiviral Res.*, 118. 93-102, 2015.
- Detje, C.N.; Lienenklaus, S.; Chhatbar, C.; Spanier, J.; Prajeeth, C.K.; Soldner, C.; Tovey, M.G.; Schlüter, D.; Weiss, S.; Stangel, M.; Kalinke, U.: **Upon intranasal vesicular stomatitis virus infection, astrocytes in the olfactory bulb are important interferon Beta producers that protect from lethal encephalitis**. *J. Virol.*, 89. 2731-2738, 2015.
- Dietzschold, B.; Li, J.; Faber, M.; Schnell, M.: **Concepts in the pathogenesis of rabies**. *Future Virol.*, 3. 481-490, 2008.
- Dorfmeier, C.L.; Lytle, A.G.; Dunkel, A.L.; Gatt, A.; McGettigan, J.P.: **Protective vaccine-induced CD4+ T cell-independent B cell responses against rabies infection**. *J. Virol.*, 86. 11533-11540, 2012.
- Dufkova, L.; Sirmarova, J.; Salat, J.; Honig, V.; Palus, M.; Ruzek, D.; Fooks, A.R.; Mansfield, K.L.; Tordo, N.; Jochmans, D.; Neyts, J.; Martina, B.; Koraka, P.; Osterhaus, A.D.M.E.: **Mannitol treatment is not effective in therapy of rabies virus infection in mice**. *Vaccine*, 37. 4710-4714, 2019.
- Enomoto, H.; Tao, L.; Eguchi, R.; Sato, A.; Honda, M.; Kaneko, S.; Iwata, Y.; Nishikawa, H.; Imanishi, H.; Iijima, H.; Tsujimura, T.; Nishiguchi, S.: **The in vivo antitumor effects of type I-interferon against hepatocellular carcinoma: the suppression of tumor cell growth and angiogenesis**. *Sci. Rep.*, 7. 12189, 2017.
- Falzarano, D.; de Wit, E.; Martellaro, C.; Callison, J.; Munster, V.; Feldmann, H.: **Inhibition of novel β coronavirus replication by a combination of interferon- α 2b and ribavirin**. *Sci. Rep.*, 3. 1686, 2013.
- Fendrich, V.; Maschuw, K.; Rehm, J.; Buchholz, M.; Holler, J.P.; Slater, E.P.; Bartsch, D.K.; Waldmann, J.: **Sorafenib Inhibits Tumor Growth and Improves Survival in a Transgenic Mouse Model of Pancreatic Islet Cell Tumors**. *Sci. World J.*, 2012:529151, 2012.
- Fernandes, E.R.; de Andrade, H.F.; Lancellotti, C.L.; Quaresma, J.A.; Demachki, S.; da Costa Vasconcelos, P.F.; Duarte, M.I.: **In situ apoptosis of adaptive immune cells and the cellular escape of rabies virus in CNS from patients with human rabies transmitted by *Desmodus rotundus***. *Virus Res.*, 156. 121-126, 2011.

- Finke, S.; Conzelmann, K.K.: **Dissociation of rabies virus matrix protein functions in regulation of viral RNA synthesis and virus assembly**. J. Virol., 77. 12074-12082, 2003.
- Finke, S.; Mueller-Waldeck, R.; Conzelmann, K.K.: **Rabies virus matrix protein regulates the balance of virus transcription and replication**. J. Gen. Virol., 84. 1613-1621, 2003.
- Fooks, A.R.; Banyard, A.C.; Horton, D.L.; Johnson, N.; McElhinney, L.M.; Jackson, A.C.: **Current status of rabies and prospects for elimination**. Lancet, 384. 1389-1399, 2014.
- Fooks, A.R.; Cliquet, F.; Finke, S.; Freuling, C.; Hemachudha, T.; Mani, R.S.; Nadin-Davis, S.; Picard-Meyer, E.; Wilde, H.; Banyard, A.C.: **Rabies**. Nat. Rev. Dis. Primers, 3. 17091, 2017.
- Forró B.; Bányai K.; Sós E.; Hornyák Á.: **A denevérvészesség aktuális helyzete Magyarországon**. Magyar Állatorv. Lapja, 140. 485-494, 2018.
- Forró B.; Marton Sz.; Kecskeméti S.; Hornyák Á.; Bányai K.: **Vaccine-associated rabies in red fox, Hungary**. Vaccine, 37. 3535-3538, 2019.
- Furuta, Y.; Gowen, B.B.; Takahashi, K.; Shiraki, K.; Smee, D.F.; Barnard, D.L.: **Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor**. Antiviral Res., 100. 446-454, 2013.
- Gallegos, K.M.; Drusano, G.L.; D'Argenio, D.Z.; Brown, A.N.: **Chikungunya Virus: In Vitro Response to Combination Therapy With Ribavirin and Interferon Alfa 2a**. J. Infect. Dis., 214. 1192-1197, 2016.
- Gao, M.; Duan, H.; Liu, J.; Zhang, H.; Wang, X.; Zhu, M.; Guo, J.; Zhao, Z.; Meng, L.; Peng, Y.: **The multi-targeted kinase inhibitor sorafenib inhibits enterovirus 71 replication by regulating IRES-dependent translation of viral proteins**. Antiviral Res., 106. 80-85, 2014.
- Garcia, S.A.; Lebrun, A.; Kean, R.B.; Hooper, D.C.: **Clearance of attenuated rabies virus from brain tissues is required for long-term protection against CNS challenge with a pathogenic variant**. J. Neurovirol., 24. 606-615, 2018.
- Gelderblom, H.; Verweij, J.; Nooter, K.; Sparreboom, A.: **Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation**. Eur. J. Cancer, 37. 1590-1598, 2001.

- Gerhold, R.W.; Jessup, D.A.: **Zoonotic diseases associated with free-roaming cats.** *Zoonoses Public Health*, 60. 189-195, 2013.
- Gluska, S.; Zahavi, E.E.; Chein, M.; Gradus, T.; Bauer, A.; Finke, S.; Perlson, E.: **Rabies Virus Hijacks and accelerates the p75NTR retrograde axonal transport machinery.** *PLoS Pathog.*, 10. e1004348, 2014.
- Gnanadurai, C.W.; Zhou, M.; He, W.; Leyson, C.M.; Huang, C.T.; Salyards, G.; Harvey, S.B.; Chen, Z.; He, B.; Yang, Y.; Hooper, D.C.; Dietzchold, B.; Fu, Z.F.: **Presence of virus neutralizing antibodies in cerebral spinal fluid correlates with non-lethal rabies in dogs.** *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 7. e2375, 2013.
- Gowen, B.B.; Juelich, T.L.; Sefing, E.J.; Brasel, T.; Smith, J.K.; Zhang, L.; Tigabu, B.; Hill, T.E.; Yun, T.; Pietzsch, C.; Furuta, Y.; Freiberg, A.N.: **Favipiravir (T-705) inhibits Junin virus infection and reduces mortality in a guinea pig model of argentine hemorrhagic fever.** *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 7:e2614, 2013.
- Gustafsson, R.K.; Engdahl, E.E.; Fogdell-Hahn, A.: **Development and validation of a Q-PCR based TCID50 method for human herpesvirus 6.** *Virol. J.*, 9. 311, 2012.
- Hanlon, C.A.: **Rabies in terrestrial animals.** In: *Rabies (3rd Edition)*. Szerk.: Jackson, A.C. Academic Press, 2013. 179–213.
- Hart, B.J.; Dyal, J.; Postnikova, E.; Zhou, H.; Kindrachuk, J.; Johnson, R.F.; Olinger, G.G.; Frieman, M.B.; Holbrook, M.R.; Jahrling, P.B.; Hensley, L.: **Interferon- β and mycophenolic acid are potent inhibitors of Middle East respiratory syndrome coronavirus in cell-based assays.** *J. Gen. Virol.*, 95. 571-577, 2014.
- Healy, D.M.; Brookes, S.M.; Banyard, A.C.; Núñez, A.; Cosby, S.L.; Fooks, A.R.: **Pathobiology of rabies virus and the European bat lyssaviruses in experimentally infected mice.** *Virus Res.*, 172. 46–53, 2013.
- Hemachudha, T.; Ugolini, G.; Wacharapluesadee, S.; Sungkarat, W.; Shuangshoti, S.; Laothamatas, J.: **Human rabies: neuropathogenesis, diagnosis, and management.** *Lancet Neurol.*, 12. 498-513, 2013.
- Hensley, L.E.; Fritz, L.E.; Jahrling, P.B.; Karp, C.L.; Huggins, J.W.; Geisbert, T.W.: **Interferon-beta 1a and SARS coronavirus replication.** *Emerg. Infect. Dis.*, 10. 317-319, 2004.
- Himmelsbach, K.; Hildt, E.: **The kinase inhibitor Sorafenib impairs the antiviral effect of interferon α on hepatitis C virus replication.** *Eur. J. Cell Biol.*, 92. 12-20, 2013.

- Himmelsbach, K.; Sauter, D.; Baumert, T.F.; Ludwig, L.; Blum, H.E.; Hildt, E.: **New aspects of an anti-tumour drug: sorafenib efficiently inhibits HCV replication.** Gut, 58. 1644-1653, 2009.
- Hooper, D.C.; Morimoto, K.; Bette, M.; Weihe, E.; Koprowski, H.; Dietzschold, B.: **Collaboration of antibody and inflammation in clearance of rabies virus from the central nervous system.** J. Virol., 72. 3711-3719, 1998.
- Hooper, D.C.; Phares, T.W.; Fabis, M.J.; Roy, A.: **The production of antibody by invading B cells is required for the clearance of rabies virus from the central nervous system.** PLoS Negl. Trop. Dis., 3. e535, 2009.
- Hu, S.C.; Hsu, C.L.; Lee, M.S.; Tu, Y.C.; Chang, J.C.; Wu, C.H.; Lee, S.H.; Ting, L.J.; Tsai, K.R.; Cheng, M.C.; Tu, W.J.; Hsu, W.C.: **Lyssavirus in Japanese Pipistrelle, Taiwan.** Emerg. Infect. Dis., 24. 782-785, 2018.
- Huang, C.T.; Li, Z.; Huang, Y.; Zhang, G.; Zhou, M.; Chai, Q.; Wu, H.; Fu, Z.F.: **Enhancement of bloodbrain barrier permeability is required for intravenously administered virus neutralizing antibodies to clear an established rabies virus infection from the brain and prevent the development of rabies in mice.** Antiviral Res., 110. 132-141, 2014.
- Huang, J.; Zhang, Y.; Huang, Y.; Gnanadurai, C.W.; Zhou, M.; Zhao, L.; Fu, Z.F.: **The ectodomain of rabies virus glycoprotein determines dendritic cell activation.** Antiviral Res., 141. 1-6, 2017.
- Iigo, M.; Moriyama, M.; Suzuki, I.; Tsuda, H.: **Markedly induced asialoGM1+CD8+ T cell production and enhancement of antimetastatic activity by interferon beta with folic or folinic acid.** Cancer Immunol. Immunother., 44. 65-69, 1997.
- Jackson, A.C. (szerk.): **Research Advances in Rabies.** Academic Press, 2011.
- Jackson, A.C., Wunner, H. (szerk.): **Rabies. 2nd edition.** Academic Press, 2007.
- Jackson, A.C.: **Current and future approaches to the therapy of human rabies.** Antiviral Res., 99. 61-67, 2013.
- Jackson, A.C.: **Rabies virus infection: an update.** J. Neurovirol., 9. 253-258, 2003.
- Johnson, N.; Phillpotts, R.; Fooks, A.R.: **Airborne transmission of lyssaviruses.** J. Med. Microbiol., 55. 785-790, 2006a.

- Johnson, N.; McKimmie, C.S.; Mansfield, K.L.; Wakeley, P.R.; Brookes, S.M.; Fazakerley, J.K.; Fooks, A.R.: **Lyssavirus infection activates interferon gene expression in the brain.** J. Gen. Virol., 87. 2663-2667, 2006b.
- Jonsson, N.; Gullberg, M.; Lindberg, A.M.: **Real-time polymerase chain reaction as a rapid and efficient alternative to estimation of picornavirus titers by tissue culture infectious dose 50% or plaque forming units.** Microbiol. Immunol., 53. 149-154, 2009.
- Jorgensen, I.; Miao, E.A.: **Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens.** Immunol. Rev., 265. 130-142, 2015.
- Kammouni, W.; Wood, H.; Saleh, A.; Appolinario, C.M.; Fernyhough, P.; Jackson, A.C.: **Rabies virus phosphoprotein interacts with mitochondrial Complex I and induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress.** J. Neurovirol., 21. 370-382, 2015.
- Kang, T.H.; Park, Y.; Bader, J.S.; Friedmann, T.: **The housekeeping gene hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) regulates multiple developmental and metabolic pathways of murine embryonic stem cell neuronal differentiation.** PLoS One, 8. e74967, 2013.
- Kärber, G.: **Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.** Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie, 162. 480-483, 1931.
- Katz, I.S.S.; Guedes, F.; Fernandes, E.R.; Dos Ramos Silva, S.: **Immunological aspects of rabies: a literature review.** Arch. Virol., 162. 3251-3268, 2017.
- Kavurma, M.M.; Khachigian, L.M.: **Signaling and transcriptional control of Fas ligand gene expression.** Cell Death Differ., 10. 36-44, 2003.
- Kip, E.; Nazé, F.; Suin, V.; Vanden Berghe, T.; Francart, A.; Lamoral, S.; Vandenabeele, P.; Beyaert, R.; Van Gucht, S.; Kalai, M.: **Impact of caspase-1/11, -3, -7, or IL-1 β /IL-18 deficiency on rabies virus-induced macrophage cell death and onset of disease.** Cell Death Discov., 3. 17012, 2017.
- Klingen, Y.; Conzelmann, K.K.; Finke, S.: **Double-labeled rabies virus: live tracking of enveloped virus transport.** J. Virol., 82. 237-245, 2008.
- Knowles, D.P.: **Rhabdoviridae.** In: *Fenner's Veterinary Virology (4th Edition)*. Szerk.: Maclachlan, N.J.; Dubovi, E.J. Academic Press, 2011. 327–341.

- Koraka, P.; Martina, B.E.E.; Smreczak, M.; Orłowska, A.; Marzec, A.; Trebas, P.; Roose, J.M.; Begeman, L.; Gerhauser, I.; Wohlsein, P.; Baumgärtner, W.; Zmudzinski, J.F.; Osterhaus, A.D.M.E.: **Inhibition of caspase-1 prolongs survival of mice infected with rabies virus**. *Vaccine*, 37. 4681-4685, 2019.
- Koraka, P.; Martina, B.E.E.; van den Ham, H.J.; Zaaraoui-Boutahar, F.; van Ijcken, W.; Roose, J.; van Amerongen, G.; Andeweg, A.; Osterhaus, A.D.M.E.: **Analysis of Mouse Brain Transcriptome After Experimental Duvenhage Virus Infection Shows Activation of Innate Immune Response and Pyroptotic Cell Death Pathway**. *Front. Microbiol.*, 9. 397, 2018.
- Kuzmin, I.V.; Botvinkin, A.D.: **The behaviour of bats *Pipistrellus pipistrellus* after experimental inoculation with rabies and rabies-like viruses and some aspects of pathogenesis**. *Myotis*, 34. 93–99, 1996.
- Lackay, S.N.; Kuang, Y.; Fu, Z.F.: **Rabies in small animals**. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 38. 851-861, 2008.
- Lafon, M.: **Rabies virus receptors**. *J. Neurovirol.*, 11. 82-87, 2005.
- Lafon, M.; Mégret, F.; Meuth, S.G.; Simon, O.; Velandia Romero, M.L.; Lafage, M.; Chen, L.; Alexopoulou, L.; Flavell, R.A.; Prehaud, C.; Wiendl, H.: **Detrimental contribution of the immuno-inhibitor B7-H1 to rabies virus encephalitis**. *J. Immunol.*, 180. 7506-7515, 2008.
- Lebrun, A.; Portocarrero, C.; Kean, R.B.; Barkhouse, D.A.; Faber, M.; Hooper, D.C.: **T-bet Is Required for the Rapid Clearance of Attenuated Rabies Virus from Central Nervous System Tissue**. *J. Immunol.*, 195. 4358-4368, 2015.
- Leroy, M.; Pire, G.; Baise, E.; Desmecht, D.: **Expression of the interferon-alpha/beta-inducible bovine Mx1 dynamin interferes with replication of rabies virus**. *Neurobiol. Dis.*, 21. 515-521, 2006.
- Li, J.; Ertel, A.; Portocarrero, C.; Barkhouse, D.A.; Dietzschold, B.; Hooper, C.; Faber, M.: **Postexposure treatment with the live-attenuated rabies virus (RV) vaccine TriGAS triggers the clearance of wild-type RV from the central nervous system (CNS) through the rapid induction of genes relevant to adaptive immunity in CNS tissues**. *J. Virol.*, 86. 3200-3210, 2012.

- Li, J.; McGettigan, J.P.; Faber, M.; Schnell, M.J.; Dietzschold, B.: **Infection of monocytes or immature dendritic cells (DCs) with an attenuated rabies virus results in DC maturation and a strong activation of the NF κ B signaling pathway.** *Vaccine*, 26. 419-426, 2008.
- Li, X.Q.; Sarmiento, L.; Fu, Z.F.: **Degeneration of neuronal processes after infection with pathogenic, but not attenuated, rabies viruses.** *J. Virol.*, 79. 10063-10068, 2005.
- Liao, P.H.; Hsu, Y.H.; Yang, H.H.; Wang, M.H.; Chen, L.K.: **Involvement of extraneural tissues and upregulation of inducible nitric oxide synthase after experimental infection with rabies virus in BALB/c mice and LEW/SsN rats.** *Pathol. Int.*, 62. 619-627, 2012.
- Lieu, K.G.; Brice, A.; Wiltzer, L.; Hirst, B.; Jans, D.A.; Blondel, D.; Moseley, G.W.: **The rabies virus interferon antagonist P protein interacts with activated STAT3 and inhibits Gp130 receptor signaling.** *J. Virol.*, 87. 8261-8265, 2013.
- Liu, L.; Cao, Y.; Chen, C.; Zhang, X.; McNabola, A.; Wilkie, D.; Wilhelm, S.; Lynch, M.; Carter, C.: **Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5.** *Cancer Res.*, 66. 11851–11858, 2006.
- Liu, X.; Zhang, Z.; Ruan, J.; Pan, Y.; Magupalli, V.G.; Wu, H.; Lieberman, J.: **Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores.** *Nature*, 535. 153-158, 2016.
- Luco, S.; Delmas, O.; Vidalain, P.O.; Tangy, F.; Weil, R.; Bourhy, H.: **RelAp43, a member of the NF- κ B family involved in innate immune response against Lyssavirus infection.** *PLoS Pathog.*, 8. e1003060, 2012.
- Luo, Z.; Tian, D.; Zhou, M.; Xiao, W.; Zhang, Y.; Li, M.; Sui, B.; Wang, W.; Guan, H.; Chen, H.; Fu, Z.F.; Zhao, L.: **λ -Carrageenan P32 Is a Potent Inhibitor of Rabies Virus Infection.** *PLoS One*, 10. e0140586, 2015.
- Madhu, B.P.; Singh, K.P.; Saminathan, M.; Singh, R.; Shivasharanappa, N.; Sharma, A.K.; Malik, Y.S.; Dhama, K.; Manjunatha, V.: **Role of nitric oxide in the regulation of immune responses during rabies virus infection in mice.** *VirusDisease*, 27. 387-399, 2016.
- Madhusudana, S.N.; Ashwin, B.Y.; Sudarshan, S.: **Feasibility of reducing rabies immunoglobulin dosage for passive immunization against rabies: results of In vitro and In vivo studies.** *Hum. Vaccin. Immunother.*, 9. 1914-1917, 2013.

- Maier, T.; Schwarting, A.; Mauer, D.; Ross, R.S.; Martens, A.; Kliem, V.; Wahl, J.; Panning, M.; Baumgarte, S.; Müller, T.; Pfefferle, S.; Ebel, H.; Schmidt, J.; Tenner-Racz, K.; Racz, P.; Schmid, M.; Strüber, M.; Wolters, B.; Gotthardt, D.; Bitz, F.; Frisch, L.; Pfeiffer, N.; Fickenscher, H.; Sauer, P.; Rupprecht, C.E.; Roggendorf, M.; Haverich, A.; Galle, P.; Hoyer, J.; Drosten, C.: **Management and outcomes after multiple corneal and solid organ transplantations from a donor infected with rabies virus.** Clin. Infect. Dis., 50. 1112-1119, 2010.
- Mani, R.S.; Damodar, T.; S, D.; Domala, S.; Gurung, B.; Jadhav, V.; Konanki, R.; Lingappa, L.; Loganathan, S.K.; Salagare, R.; Tambi, P.: **Case Reports: Survival from Rabies: Case Series from India.** Am. J. Trop. Med. Hyg., 100. 165-169, 2019.
- Manjunatha, V.; Singh, K.P.; Saminathan, M.; Singh, R.; Shivasharanappa, N.; Umeshappa, C.S.; Dhama, K.; Manjunathareddy, G.B.: **Inhibition of MEK-ERK1/2-MAP kinase signalling pathway reduces rabies virus induced pathologies in mouse model.** Microb. Pathog., 112. 38-49, 2017.
- Masatani, T.; Ito, N.; Shimizu, K.; Ito, Y.; Nakagawa, K.; Sawaki, Y.; Koyama, H.; Sugiyama, M.: **Rabies virus nucleoprotein functions to evade activation of the RIG-I-mediated antiviral response.** J. Virol., 84. 4002-4012, 2010.
- Mégret, F.; Prehaud, C.; Lafage, M.; Moreau, P.; Rouas-Freiss, N.; Carosella, E.D.; Lafon, M.: **Modulation of HLA-G and HLA-E expression in human neuronal cells after rabies virus or herpes virus simplex type 1 infections.** Hum. Immunol., 68. 294-302, 2007.
- Mehta, S.; Roy, S.; Mukherjee, S.; Yadav, N.; Patel, N.; Chowdhary, A.: **Exogenous interferon prolongs survival of rabies infected mice.** Virusdisease, 26. 163-169, 2015.
- Mendenhall, M.; Russell, A.; Juelich, T.; Messina, E.L.; Smee, D.F.; Freiberg, A.N.; Holbrook, M.R.; Furuta, Y.; de la Torre, J.C.; Nunberg, J.H.; Gowen, B.B.: **T-705 (favipiravir) inhibition of arenavirus replication in cell culture.** Antimicrob. Agents Chemother., 55. 782-787, 2011.
- Messenger, S.L.; Smith, J.S.; Rupprecht, C.E.: **Emerging epidemiology of bat-associated cryptic cases of rabies in humans in the United States.** Clin. Inf. Dis., 35. 738-747, 2002.
- Miao, F.M.; Zhang, S.F.; Wang, S.C.; Liu, Y.; Zhang, F.; Hu, R.L.: **Comparison of immune responses to attenuated rabies virus and street virus in mouse brain.** Arch. Virol., 162. 247-257, 2017.

- Michaelis, M.; Paulus, C.; Löschmann, N.; Dauth, S.; Stange, E.; Doerr, H.W.; Nevels, M.; Cinatl, J.: **The multi-targeted kinase inhibitor sorafenib inhibits human cytomegalovirus replication.** Cell Mol. Life Sci., 68. 1079-1090, 2011.
- Mitrabhakdi, E.; Shuangshoti, S.; Wannakrairo, P.; Lewis, R.A.; Susuki, K.; Laothamatas, J.; Hemachudha, T.: **Difference in neuropathogenetic mechanisms in human furious and paralytic rabies.** J. Neurol. Sci., 238. 3-10, 2005.
- Molnár V.; Pálfi V.; Beregi A.; Molnár Z.: **Denevérveszétség hazai kimutatása: Esetismertetés.** Magyar Állatorv. Lapja, 130. 629-634, 2008.
- Morgenstern, B.; Michaelis, M.; Baer, P.C.; Doerr, H.W.; Cinatl, J.: **Ribavirin and interferon-beta synergistically inhibit SARS-associated coronavirus replication in animal and human cell lines.** Biochem. Biophys. Res. Commun., 326. 905-908, 2005.
- Morimoto, K.; Patel, M.; Corisdeo, S.; Hooper, D.C.; Fu, Z.F.; Rupprecht, C.E.; Koprowski, H.; Dietzschold, B.: **Characterization of a unique variant of bat rabies virus responsible for newly emerging human cases in North America.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 28. 5653-5658, 1996.
- Mumtaz, N.; Phil, M.; van Kampen, J.J.A.; Reusken, C.B.E.M.; Boucher, C.A.B.; Koopmans, M.P.G.: **Zika Virus: Where Is the Treatment?** Curr. Treat. Options Infect. Dis., 8. 208-211, 2016.
- Munkácsy M.; Sedlák M.: **Humán Lyssa esetek Borsod-Abaúj-Zemplén megyében.** Budapesti Közegészségügy, 28. 49-50, 1996.
- Murphy, J.; Sifri, C.D.; Pruitt, R.; Hornberger, M.; Bonds, D.; Blanton, J.; Ellison, J.; Cagnina, R.E.; Enfield, K.B.; Shiferaw, M.; Gigante, C.; Condori, E.; Gruszynski, K.; Wallace, R.M.: **Human Rabies – Virginia, 2017.** Morb. Mort. Weekly Rep., 67. 1410-1414, 2019.
- Müller, T.; Bätza, H.J.; Beckert, A.; Bunzenthal, C.; Cox, J.H.; Freuling, C.M.; Fooks, A.R.; Frost, J.; Geue, L.; Hoeflechner, A.; Marston, D.; Neubert, A.; Neubert, L.; Revilla-Fernández, S.; Vanek, E.; Vos, A.; Wodak, E.; Zimmer, K.; Mettenleiter, T.C.: **Analysis of vaccine-virus-associated rabies cases in red foxes (Vulpes vulpes) after oral rabies vaccination campaigns in Germany and Austria.** Arch. Virol., 154. 1089-1091, 2009a.
- Müller, T.; Dietzschold, B.; Ertl, H.; Fooks, A.R.; Freuling, C.; Fehlner-Gardiner, C.; Kliemt, J.; Meslin, F.X.; Rupprecht, C.E.; Tordo, N.; Wanderler, A.I.; Kieny, M.P.: **Development of a mouse monoclonal antibody cocktail for post-exposure rabies prophylaxis in humans.** PLoS Negl. Trop. Dis., 3. e542, 2009b.

- Nadeem, M.; Panda, P.K.: **Survival in human rabies but left against medical advice and death followed – Community education is the need of the hour.** J. Family Med. Prim. Care, 9. 1736-1740, 2020.
- Naesens, L.; Guddat, L.W.; Keough, D.T.; van Kuilenburg, A.B.; Meijer, J.; Vande Voorde, J.; Balzarini, J.: **Role of human hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase in activation of the antiviral agent T-705 (favipiravir).** Mol. Pharmacol., 84. 615-629, 2013.
- Nakamichi, K.; Inoue, S.; Takasaki, T.; Morimoto, K.; Kurane, I.: **Rabies virus stimulates nitric oxide production and CXC chemokine ligand 10 expression in macrophages through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2.** J. Virol., 78. 9376-9388, 2004.
- Nakamichi, K.; Saiki, M.; Sawada, M.; Takayama-Ito, M.; Yamamuro, Y.; Morimoto, K.; Kurane, I.: **Rabies virus-induced activation of mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB signaling pathways regulates expression of CXC and CC chemokine ligands in microglia.** J. Virol., 79. 11801-11812, 2005.
- Niu, X.; Tang, L.; Tseggai, T.; Guo, Y.; Fu, Z.F.: **Wild-type rabies virus phosphoprotein is associated with viral sensitivity to type I interferon treatment.** Arch. Virol., 158. 2297-2305, 2013.
- Niu, X.; Wang, H.; Fu, Z.F.: **Role of chemokines in rabies pathogenesis and protection.** Adv. Virus Res., 79. 73-89, 2011.
- Nokireki, T.; Tammiranta, N.; Kokkonen, U.M.; Kantala, T.; Gadd, T.: **Tentative novel lyssavirus in a bat in Finland.** Transbound Emerg. Dis., 65. 593-596, 2018.
- Oestereich, L.; Lüdtke, A.; Wurr, S.; Rieger, T.; Muñoz-Fontela, C.; Günther, S.: **Successful treatment of advanced Ebola virus infection with T-705 (favipiravir) in a small animal model.** Antiviral Res., 105. 17-21, 2014a.
- Oestereich, L.; Rieger, T.; Lüdtke, A.; Ruibal, P.; Wurr, S.; Pallasch, E.; Bockholt, S.; Krasemann, S.; Muñoz-Fontela, C.; Günther, S.: **Efficacy of Favipiravir Alone and in Combination With Ribavirin in a Lethal, Immunocompetent Mouse Model of Lassa Fever.** J. Infect. Dis., 213. 934-938, 2016.
- Oestereich, L.; Rieger, T.; Neumann, M.; Bernreuther, C.; Lehmann, M.; Krasemann, S.; Wurr, S.; Emmerich, P.; de Lamballerie, X.; Ölschläger, S.; Günther, S.: **Evaluation of antiviral efficacy of ribavirin, arbidol, and T-705 (favipiravir) in a mouse model for Crimean-Congo hemorrhagic fever.** PLOS Negl. Trop. Dis., 8. e2804, 2014b.

- OIE (World Organisation for Animal Health): **Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses)** (3.1.17. fejezet). In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Párizs, 2018.
- Palumbo, E.: **Pegylated Interferon and Ribavirin Treatment for Hepatitis C Virus Infection.** Ther. Adv. Chronic Dis., 2. 39-45, 2011.
- Paolicelli, D.; Drenzo, V.; Trojano, M.: **Review of interferon beta-1b in the treatment of early and relapsing multiple sclerosis.** Biologics, 3. 369-376, 2009.
- Park, C.H.; Kondo, M.; Inoue, S.; Noguchi, A.; Oyamada, T.; Yoshikawa, H.; Yamada, A.: **The istopathogenesis of paralytic rabies in six-week-old C57BL/6J mice following inoculation of the CVS-11 strain into the right triceps surae muscle.** J. Vet. Med. Sci., 68. 589-595, 2006.
- Phares, T.W.; Kean, R.B.; Mikheeva, T.; Hooper, D.C.: **Regional differences in blood-brain barrier permeability changes and inflammation in the apathogenic clearance of virus from the central nervous system.** J. Immunol., 176. 7666-7675, 2006.
- Piccinotti, S.; Whelan, S.P.: **Rabies Internalizes into Primary Peripheral Neurons via Clathrin Coated Pits and Requires Fusion at the Cell Body.** PLoS Pathog., 12. e1005753, 2016.
- Pires de Mello, C.P.; Tao, X.; Kim, T.H.; Bulitta, J.B.; Rodriguez, J.L.; Pomeroy, J.J.; Brown, A.N.: **Zika Virus Replication Is Substantially Inhibited by Novel Favipiravir and Interferon Alpha Combination Regimens.** Antimicrob. Agents Chemoter., 62. e01983-17, 2017.
- Pitoia, F.; Jerkovich, F.: **Selective use of sorafenib in the treatment of thyroid cancer.** Drug Des. Devel. Ther., 10. 1119-1131, 2016.
- Pleschka, S.: **RNA viruses and the mitogenic Raf/MEK/ERK signal transduction cascade.** Biol. Chem., 389. 1273-1282, 2008.
- Pollin, R.; Granzow, H.; Köllner, B.; Conzelmann, K.K.; Finke, S.: **Membrane and inclusion body targeting of lyssavirus matrix proteins.** Cell Microbiol., 15. 200-212, 2013.
- Préhaud, C.; Lay, S.; Dietzschold, B.; Lafon, M.: **Glycoprotein of nonpathogenic rabies viruses is a key determinant of human cell apoptosis.** J. Virol., 77. 10537-10547, 2003.

- Rabuffetti, M.; Sciorati, C.; Tarozzo, G.; Clementi, E.; Manfredi, A.A.; Beltramo, M.: **Inhibition of caspase-1-like activity by Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-chloromethyl ketone induces long-lasting neuroprotection in cerebral ischemia through apoptosis reduction and decrease of proinflammatory cytokines.** J. Neurosci., 20. 4398-4404, 2000.
- Randall, R.E.; Goodbourn, S.: **Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures.** J. Gen. Virol., 89. 1-47, 2008.
- Rigopoulos, D.; Korfitis, C.; Gregoriou, S.; Katsambas, A.D.: **Infliximab in dermatological treatment: beyond psoriasis.** Expert Opin. Biol. Ther., 8. 122-133, 2008.
- Roche, S.; Gaudin, Y.: **Evidence that rabies virus forms different kinds of fusion machines with different pH thresholds for fusion.** J. Virol., 78. 8746-8752, 2004.
- Roy, A.; Hooper, D.C.: **Lethal silver-haired bat rabies virus infection can be prevented by opening the blood-brain barrier.** J. Virol., 81. 7993-7998, 2007.
- Roy, A.; Phares, T.W.; Koprowski, H.; Hooper, D.C.: **Failure to open the blood-brain barrier and deliver immune effectors to central nervous system tissues leads to the lethal outcome of silver-haired bat rabies virus infection.** J. Virol., 81. 1110-1118, 2007.
- Rupprecht, C.; Kuzmin, I.; Meslin, F.: **Lyssaviruses and rabies: current conundrums, concerns, contradictions and controversies.** F1000Res., 6. 184, 2017.
- Sarmiento, L.; Li, X.Q.; Howerth, E.; Jackson, A.C.; Fu, Z.F.: **Glycoprotein-mediated induction of apoptosis limits the spread of attenuated rabies viruses in the central nervous system of mice.** J. Neurovirol., 11. 571-581, 2005.
- Schnell, M.J.; McGettigan, J.P.; Wirblich, C.; Papaneri, A.: **The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain.** Nat. Rev. Microbiol., 8. 51-61, 2010.
- Senba, K.; Matsumoto, T.; Yamada, K.; Shiota, S.; Iha, H.; Date, Y.; Ohtsubo, M.; Nishizono, A.: **Passive carriage of rabies virus by dendritic cells.** Springerplus, 2. 419, 2013.
- Shiple, R.; Wright, E.; Selden, D.; Wu, G.; Aegerter, J.; Fooks, A.R.; Banyard, A.C.: **Bats and Viruses: Emergence of Novel Lyssaviruses and Association of Bats with Viral Zoonoses in the EU.** Trop. Med. Infect. Dis., 4. E31, 2019.
- Siddiqui, M.A.; Scott, L.J.: **Infliximab: a review of its use in Crohn's disease and rheumatoid arthritis.** Drugs, 65. 2179-2208, 2005.

- Smreczak, M.; Marzec, A.; Orłowska, A.; Trębas, P.; Reichert, M.; Kycko, A.; Koraka, P.; Osterhaus, A.D.M.E.; Żmudziński, J.F.: **The effect of selected molecules influencing the detrimental host immune response on a course of rabies virus infection in a murine model.** *Vaccine*, 37. 4715-4723, 2019.
- Solanki, A.; Radotra, B.D.; Vasishta, R.K.: **Correlation of cytokine expression with rabies virus distribution in rabies encephalitis.** *J. Neuroimmunol.*, 217. 85-89, 2009.
- Sonntag, R.; Gassler, N.; Bangen, J.M.; Trautwein, C.; Liedtke, C.: **Pro-apoptotic Sorafenib signaling in murine hepatocytes depends on malignancy and is associated with PUMA expression in vitro and in vivo.** *Cell Death Dis.*, 5: e1030, 2014.
- Spearman, C.: **The method of “Right and wrong cases” (constant stimuli) with Gauss’ formulae.** *British Journal of Psychology*, 2. 227-242, 1908.
- Srinivasan, A.; Burton, E.C.; Kuehnert, M.J.; Rupprecht, C.; Sutker, W.L.; Ksiazek, T.G.; Paddock, C.D.; Guarner, J.; Shieh, W.J.; Goldsmith, C.; Hanlon, C.A.; Zoretic, J.; Fischbach, B.; Niezgoda, M.; El-Feky, W.H.; Orciari, L.; Sanchez, E.Q.; Likos, A.; Klintmalm, G.B.; Cardo, D.; LeDuc, J.; Chamberland, M.E.; Jernigan, D.B.; Zaki, S.R. et al.: **Transmission of rabies virus from an organ donor to four transplant recipients.** *N. Engl. J. Med.*, 352. 1103-1111, 2005.
- Sugiura, N.; Uda, A.; Inoue, S.; Kojima, D.; Hamamoto, N.; Kaku, Y.; Okutani, A.; Noguchi, A.; Park, C.H.; Yamada, A.: **Gene expression analysis of host innate immune responses in the central nervous system following lethal CVS-11 infection in mice.** *Jpn. J. Infect. Dis.*, 64. 463-472, 2011.
- Suja, M.S.; Mahadevan, A.; Madhusudana, S.N.; Shankar, S.K.: **Role of apoptosis in rabies viral encephalitis: a comparative study in mice, canine, and human brain with a review of literature.** *Patholog. Res. Int.*, 2011. 374286, 2011.
- Suzuki, A.; Tsutomi, Y.; Shimizu, M.; Matsuzawa, A.: **Another cell death induction system: TNF-alpha acts as a ligand for Fas in vaginal cells.** *Cell Death Differ.*, 6. 638-643, 1999.
- Takeuchi, A.; Eto, M.; Tatsugami, K.; Yamada, H.; Oki, T.; Kiyoshima, K.; Yoshikai, Y.; Naito, S.: **Mechanism of synergistic antitumor effect of sorafenib and interferon- α on treatment of renal cell carcinoma.** *J. Urol.*, 184. 2549-2556, 2010.
- Te, H.S.; Randall, G.; Jensen, D.M.: **Mechanism of action of ribavirin in the treatment of chronic hepatitis C.** *Gastroenterol Hepatol (N. Y.)*, 3. 218-225, 2007.

- Terryn, S.; Francart, A.; Lamoral, S.; Hultberg, A.; Rommelaere, H.; Wittelsberger, A.; Callewaert, F.; Stohr, T.; Meerschaert, K.; Ottevaere, I.; Stortelers, C.; Vanlandschoot, P.; Kalai, M.; Van Gucht, S.: **Protective effect of different anti-rabies virus VHH constructs against rabies disease in mice.** PLOS One, 9. e109367, 2014.
- Thoulouze, M.I.; Lafage, M.; Schachner, M.; Hartmann, U.; Cremer, H.; Lafon, M.: **The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus.** J. Virol., 72. 7181-7190, 1998.
- Tordo, N.; Poch, O.; Ermine, A.; Keith, G.; Rougeon, F.: **Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negative-strand RNA viruses.** Virology, 165. 565-576, 1988.
- Tuffereau, C.; Bénéjean, J.; Blondel, D.; Kieffer, B.; Flamand, A.: **Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus.** EMBO J., 17. 7250-7259, 1998.
- Ubol, S.; Sukwattanapan, C.; Maneerat, Y.: **Inducible nitric oxide synthase inhibition delays death of rabies virus-infected mice.** J. Med. Microbiol., 50. 238-242, 2001.
- Uzé, G.; Monneron, D.: **IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family.** Biochimie, 89. 729-734, 2007.
- Varga J.; Rusvai M.; Fodor L.: **A háziállatok fertőző betegségei.** MÁOK, 2018.
- Velandia-Romero, M.L.; Castellanos, J.E.; Martínez-Gutiérrez, M.: **In vivo differential susceptibility of sensory neurons to rabies virus infection.** J. Neurovirol., 2013. [Epub ahead of print]
- Vidy, A.; El Bougrini, J; Chelbi-Alix, M.K.; Blondel, D.: **The nucleocytoplasmic rabies virus P protein counteracts interferon signaling by inhibiting both nuclear accumulation and DNA binding of STAT1.** J. Virol., 81. 4255-4263, 2007.
- Vin, H.; Ching, G.; Ojeda, S.S.; Adelman, C.H.; Chitsazzadeh, V.; Dwyer, D.W.; Ma, H.; Ehrenreiter, K.; Baccharini, M.; Ruggieri, R.; Curry, J.L.; Ciurea, A.M.; Duvic, M.; Busaidy, N.L.; Tannir, N.M.; Tsai, K.Y.: **Sorafenib suppresses JNK-dependent apoptosis through inhibition of ZAK.** Mol. Cancer Ther., 13. 221-229, 2014.

- Wakeley, P.R.; Johnson, N.; McElhinney, L.M.; Marston, D.; Sawyer, J.; Fooks, A.R.: **Development of a real-time, TaqMan reverse transcription-PCR assay for detection and differentiation of lyssavirus genotypes 1, 5, and 6.** *J. Clin. Microbiol.*, 43. 2786-2792, 2005.
- Walker, P.J.; Siddell, S.G.; Lefkowitz, E.J.; Mushegian, A.R.; Dempsey, D.M.; Dutilh, B.E.; Harrach, B.; Harrison, R.L.; Hendrickson, R.C.; Junglen, S.; Knowles, N.J.; Kropinski, A.M.; Krupovic, M.; Kuhn, J.H.; Nibert, M.; Rubino, L.; Sabanadzovic, S.; Simmonds, P.; Varsani, A.; Zerbini, F.M.; Davison, A.J.: **Changes to virus taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2019).** *Arch. Virol.*, 164. 2417-2429, 2019.
- Wallace, R.M.; Undurraga, E.A.; Blanton, J.D.; Cleaton, J.; Franka, R.: **Elimination of Dog-Mediated Human Rabies Deaths by 2030: Needs Assessment and Alternatives for Progress Based on Dog Vaccination.** *Front. Vet. Sci.*, 4. 9, 2017.
- Wang, Z.W.; Sarmiento, L.; Wang, Y.; Li, X.Q.; Dhingra, V.; Tseggai, T.; Jiang, B.; Fu, Z.F.: **Attenuated rabies virus activates, while pathogenic rabies virus evades, the host innate immune responses in the central nervous system.** *J. Virol.*, 79. 12554-12565, 2005.
- Ward, L.A.; Massa, P.T.: **Neuron-specific regulation of major histocompatibility complex class I, interferon-beta, and anti-viral state genes.** *J. Neuroimmunol.*, 58. 145-155, 1995.
- Westover, J.B.; Sefing, E.J.; Bailey, K.W.; Van Wettere, A.J.; Jung, K.; Dagley, A.; Wandersee, L.; Downs, B.; Smee, D.F.; Furuta, Y.; Bray, M.; Gowen, B.B: **Lowdose ribavirin potentiates the antiviral activity of favipiravir against hemorrhagic fever viruses.** *Antiviral Res.*, 126. 62–68, 2016.
- Wilhelm, S.M; Adnane, L.; Newell, P.; Villanueva, A.; Llovet, J.M.; Lynch, M.: **Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling.** *Mol. Cancer Ther.*, 7. 3129-3140, 2008.
- Willoughby, R.E.; Tieves, K.S.; Hoffman, G.M.; Ghanayem, N.S.; Amlie-Lefond, C.M.; Schwabe, M.J.; Chusid, M.J.; Rupprecht, C.E.: **Survival after treatment of rabies with induction of coma.** *N. Engl. J. Med.*, 352. 2508–2514, 2005.

- Woo, A.S.J.; Kwok, R.; Ahmed, T.: **Alpha-interferon treatment in hepatitis B**. *Ann. Transl. Med.*, 5. 159, 2017.
- World Health Organization: **Oral Vaccination of Dogs Against Rabies** (szerk.: Meslin, F.) WHO, 2007.
- World Health Organization: **WHO Expert Consultation on Rabies, Second Report**. WHO Technical Report Series, no. 982. 2013.
- Wu, B.; Ma, Q.; Khatibi, N.; Chen, W.; Sozen, T.; Cheng, O.; Tang, J.: **Ac-YVAD-CMK Decreases Blood-Brain Barrier Degradation by Inhibiting Caspase-1 Activation of Interleukin-1 β in Intracerebral Hemorrhage Mouse Model**. *Transl. Stroke Res.*, 1. 57-64, 2010.
- Yamada, K.; Noguchi, K.; Komeno, T.; Furuta, Y.; Nishizono, A.: **Efficacy of Favipiravir (T-705) in Rabies Postexposure Prophylaxis**. *J. Infect. Dis.*, 213. 1253-1261, 2016.
- Yang, Y.; Huang, Y.; Gnanadurai, C.W.; Cao, S.; Liu, X.; Cui, M.; Fu, Z.F.: **The inability of wild-type rabies virus to activate dendritic cells is dependent on the glycoprotein and correlates with its low level of the de novo-synthesized leader RNA**. *J. Virol.*, 89. 2157-2169, 2015.
- Zampieri, N.; Jessell, T.M.; Murray, A.J.: **Mapping sensory circuits by anterograde transsynaptic transfer of recombinant rabies virus**. *Neuron*, 81. 766-778, 2014.
- Zeiler, F.A.; Jackson, A.C.: **Critical Appraisal of the Milwaukee Protocol for Rabies: This Failed Approach Should Be Abandoned**. *Can. J. Neurol. Sci.*, 43. 44-51, 2016.
- Zhang, R.; Liu, C.; Cao, Y.; Jamal, M.; Chen, X.; Zheng, J.; Li, L.; You, J.; Zhu, Q.; Liu, S.; Dai, J.; Cui, M.; Fu, Z.F.; Cao, G.: **Rabies viruses leader RNA interacts with host Hsc70 and inhibits virus replication**. *Oncotarget*, 8. 43822-43837, 2017.

9. Tudományos közlemények

9.1. A doktori értekezés témájában, lektorált és impakt faktoral bíró tudományos folyóiratban megjelent közlemények

Marosi A.: Új ismeretek a veszettség kórfejlődéséről és immunológiájáról. Magyar Állatorv. Lapja, 141. 607-622, 2019. IF: 0,196

Marosi A.; Dufkova, L.; Forró B.; Felde O.; Erdélyi K.; Širmanova, J.; Palus, M.; Hönig, V.; Salát, J.; Tikos R.; Gyuranecz M.; Růžek, D.; Martina, B.E.E.; Koraka, P.; Osterhaus, A.D.M.E.; Bakonyi T.: **Combination therapy of rabies-infected mice with inhibitors of pro-inflammatory host response, antiviral compounds and human rabies immunoglobulin.** Vaccine, 37. 4724-4735, 2019. IF: 3,285

Marosi A.; Forgách P.; Gyuranecz M.; Sulyok K.M.; Bakonyi T.: **Evaluation of in vitro inhibitory potential of type-I interferons and different antiviral compounds on rabies virus replication.** Vaccine, 37. 4663-4672, 2019. IF: 3,285

9.2. A doktori értekezés témájában tartott előadások tudományos konferenciákon

Marosi A.; Forgách P.; Felde O.; Forró B.; Gyuranecz M.; Erdélyi K.; Bakonyi T.: **Veszettsg elleni kombinált antivirális kezelés vizsgálata egérmodellben.** Szent-Iványi – Binder Nap, Magyar Zoonózis Társaság. 2017.10.04.

Marosi A.; Forgách P.; Felde O.; Forró B.; Gyuranecz M.; Bakonyi T.: **Modellkísérletek a veszettsg elleni antivirális terápiára.** Virologiai Nap, Magyar Mikrobiológiai Társaság. 2017.04.04.

Marosi A.; Forró B.; Felde O.; Erdélyi K.; Gyuranecz M.; Bakonyi T.: **Veszettsg vírussal fertőzött egerek kombinációs kezelése gyulladáscsökkentő és vírusellenes hatóanyagokkal.** Akadémiai Beszámolók. 2017.01.24.

Marosi A.; Pásztor A.; Forgách P.; Sulyok K.M.; Gyuranecz M.; Bakonyi T.: **Antivirális hatóanyagok veszettsg vírus szaporodását gátló hatásának *in vitro* vizsgálata egér neuroblastoma sejtvonalban.** Akadémiai Beszámolók. 2016.01.26.

9.3. A doktori értekezés témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények

Valkó A.; Marosi A.; Cságola A.; Farkas R.; Rónai Zs.; Dán Á.: **Frequency of diarrhoea-associated viruses in swine of various ages in Hungary.** Acta Vet. Hung., 67. 140-150, 2019. IF: 1,042

Boros Á.; László Z.; Pankovics P.; Marosi A.; Albert M.; Cságola A.; Bíró H.; Fahsbender, E.; Delwart, E.; Reuter G.: **High prevalence, genetic diversity and a potentially novel genotype of Sapelovirus A (Picornaviridae) in enteric and respiratory samples in Hungarian swine farms.** J. Gen. Virol., DOI: 10.1099/jgv.0.001410, 2020. IF: 2,809

Pászti-Gere E.; Szekér K.; Csibrik-Németh E.; Csizinszky R.; Marosi A.; Palócz O.; Farkas O.; Galfi P.: **Metabolites of Lactobacillus plantarum 2142 Prevent Oxidative Stress-Induced Overexpression of Proinflammatory Cytokines in IPEC-J2 Cell Line.** Inflammation, 35. 1487-1499, 2012. IF: 1,747

Tóthné Schranz E.; Szörényi Á.; Marosi A.: **Primer multiplex chondrosarcoma (chondrosarcomatosis) gabonasikló [Elaphe (Pantherophis) guttata] májában: Esetismertetés.** Magyar Állatorv. Lapja, 134. 349-352, 2012. IF: 0,201

Marosi A.; Juhász A.; Győrffy A.: **Placentáció eleve szülő pikkelyes hüllőknél 1. rész.** Magyar Állatorv. Lapja, 133. 182-189, 2011. IF: 0,201

Marosi A.; Juhász A.; Győrffy A.: **Placentáció eleve szülő pikkelyes hüllőknél 2. rész.** Magyar Állatorv. Lapja, 133. 242-250, 2011. IF: 0,201

Fehér O.; Forgách P.; Marosi A.; Malik P.; Nagy A.; Takács M.; Kutasi O.: **A nyugat-nílusi vírus és más flavivírusok aktivitása Magyarországon.** Akadémiai beszámoló. 2020.01.21.

Pászti-Gere E.; Marosi A.; Szeker K.; Csibrik-Nemeth E.; Csizinszky R.; Jakab Cs.; Farkas O.; Galfi P.: **Az oxidatív stressz által előidézett citokin génexpresszió változás IPEC-J2 bélhámsejtekben.** TECAN Tudományos Szimpózium, Mikrobiológiai Szekció. 2012.01.31.

Köszönetnyilvánítás

Egy olyan nagy lélegzetű munka, mint egy doktori értekezés elkészítéséhez vezető úton nem kevés segítségére, támogatásra és útmutatásra van szükség. Nem volt ez másként esetemben sem; sokaknak tartozom köszönettel azért, hogy a kutatómunkámat eredményesen végezhettem és ez a dolgozat elkészülhetett.

Elsőként nem is fordulhatnék máshoz, mint témavezetőmhöz és mentoromhoz, Bakonyi Tamáshoz, aki bevezetett a virológia világába és rám bízta ezt az izgalmas, de sok kihívást jelentő kutatási témát. Pótolhatatlan iránymutatást, de sok önállóságot is adott, hogy kibontakoztathassam érdeklődésem és saját utamat a kutatómunkában.

Sok köszönet illeti a Virologia Csoport tagjait, elsősorban Forgách Petrát, akitől szakmailag és emberileg is nagyon sokat tanultam az elmúlt évek során, és akihez minden helyzetben fordulhatok kérdéseimmel. A másik fontos támaszom Bakonyi Győző, akinek kivételes segítőkészsége számtalan nehéz helyzetet oldott meg. Hofbauer Gyöngyi és Kaposi Tamásné Magdi biztosították a hátteret a sejtekkel való munkához, és a jó hangulatot a laborban. Rusvai Miklós sokat segített virológiai szemléletem kialakításában és a diagnosztikai munkában való tapasztalatszerzésben. Szakdolgozó és TDK-s hallgatóimmal – Tikos Rékával és Marte Kristiansennel – nagyon élveztem a közös munkát. Köszönet illeti Tanszékvezetőnket, Fodor Lászlót, aki befogadott a Járványtani Tanszék családjába. A korábbi és jelenlegi tanszéki kollégák közül ki kell emeljem Gerényi Dórát és Bíró Nikolettát, akik segítettek eligazodni a papírmunka útvesztőjében, valamint Tóth Gergelyt, Sárközi Ritát, Lőrincz Mártát, Valkó Annát, Makrai Lászlót, Herbák Józsefnét és Halasi Terézt.

Tanszékem mellett doktori munkám másik fő pillérét az Állatorvos-tudományi Kutatóintézet adta: az *in vitro* kísérletek nem valósulhattak volna meg Pásztor Alexandra, az egérkísérletek pedig Forró Barbara és Stammné Felde Orsolya segítségével, akik saját témájuk mellett vettek részt az én kutatásomban is. A Zoonotikus Bakteriológia és Mycoplasmatológia Csoport vezetőjének, Gyuranecz Miklósnak, és számos tagjának: Kreizinger Zsuzsának, Görföl-Sulyok Kingának és Gróznér Dénesnek is köszönettel tartozom.

A NÉBIH-ÁDI virológiai laborjából Hornyák Ákostól sokat tanultam a veszélyességről és más vírusokról. Juhász Tamás is több alkalommal volt a segítségemre. Erdélyi Károlynak kulcsfontosságú szerepe volt abban, hogy az immunhisztokémiai vizsgálatok megvalósultak.

Hálával tartozom az ASKLEPIOS konzorcium minden tagjának a nagyszerű nemzetközi együttműködésért; különösen az angliai Weybridge-ben történt látogatásomat lehetővé tevő Anthony Fooks-nak, Ashley Banyardnak és Karen Mansfieldnek. Kiemelném továbbá a projekt résztvevői közül Penelope Korakát, Lucie Dufkovát, Daniel Ruzeket és Dirk Jochmanst is.

Végül pedig családomat illeti köszönet, igazán értük érdemes dolgozni és élni.