

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**ANTIVIRÁLIS ÉS
GYULLADÁSCSÖKKENTŐ
HATÓANYAGOK VESZETTSÉG ELLENI
HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA
SEJTKULTÚRÁBAN ÉS
EGÉRMODELLBEN**

dr. Marosi András

Témavezető: Dr. Bakonyi Tamás



ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
Állatorvostudományi Doktori Iskola

Budapest, 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

Előzmények és célkitűzés

A veszettség vírus okozta, világszerte elterjedt zoonotikus betegség, amely fertőzött állatok nyála közvetítésével, harapás útján terjed. A *Rhabdoviridae* család *Lyssavirus* nemzetségébe tartozó veszettségvírus (RABV) közel 100%-os letalitású agy- és gerincvelőgyulladást okoz bármely emlős állatfajban és emberekben is.

A veszettségnek három eltérő járványtani ciklusát különböztetjük meg. Az urbánus (városi) veszettséget az emberi települések közelében élő kóbor kutyák tartják fenn, és ezek jelentik a fő fertőzési forrást emberek számára. Az évente világszerte előforduló 50-150 ezer humán haláleset több mint 99%-a kutya eredetű. Az urbánus veszettség Afrika és Ázsia legtöbb országában jelen van, a legmagasabb esetszámban Indiában. Az emberi veszettség felszámolása fontos globális cél, amelyhez a kutyák vakcinázása mellett az egészségügyi és laboratóriumi infrastruktúra fejlesztése, valamint a lakosság tudatosságának növelése is lényeges.

A szilvatikus (erdei) ciklus rezervoárjai vadon élő húsevő fajok (pl. róka, farkas, mosómedve, sakál stb.), amelyek alkalmanként fertőzhetnek kutyákat, macskákat vagy embereket. Ezt a járványformát Nyugat- és Közép-

Európában, továbbá Észak-Amerika területén orális vakcinázással sikerült visszaszorítani, de Ázsiában és Kelet-Európában nagyon elterjedt. A harmadik járványtani forma a denevérvészesség, amely a denevérek kolóniáiban cirkulál, és amelyet az amerikai kontinensen a RABV, míg az Óvilágban egyéb *Lyssavirus* genotípusok okoznak.

A vészesség ellen hatékony vakcinák állnak rendelkezésre, amelyeket egyrészt emberek preventív vagy posztexpozíciós profilaxisára (PrEP és PEP), másrészt állatok immunizálására vesznek igénybe. A széleskörben használt inaktivált vakcinák védelmet nyújtanak a betegség kialakulása ellen akár röviddel a fertőzést követően megkezdett oltási sorozat esetén is, mivel a veleszületett immunrendszer és a gyorsan kialakuló ellenanyag-válasz megakadályozhatja a vírus nagy dózisban való bejutását az idegrendszerbe (főként hiperimmun savóval végzett lokális beszűrés mellett). A központi idegrendszert (KIR) elért fertőzés esetén azonban nem tudják megelőzni a klinikai tünetek kialakulását és a végzetes kimenetelt. Nem ismert olyan gyógykezelési eljárás sem, ami már kialakult tünetekkel járó vészességnél számottevő esélyt adna a túlélésre.

Nemzetközi együttműködésben megvalósult kutatómunkánk célja ezért olyan hatóanyagok és kombinációs kezelések keresése és vizsgálata volt, amelyek a veszettség okozta agyvelőgyulladás gyógykezelésében hatásosak lehetnek. A vizsgálatokba bevont szereket a veszettség kórfejlődésének sejtszintű folyamataira és korábbi kísérleti eredményekre alapozva választottuk ki.

Munkánk első szakaszában a veszettségvírus szaporodását igazoltan vagy vélhetően gátló szerek hatását tanulmányoztuk sejtenyészetben. 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.

Anyag és módszer

In vitro kísérleti szakasz

Vizsgálataink *in vitro* szakaszába öt vírusellenes készítményt vontunk be. Az I-es típusú interferonok (IFN) közé tartozó rekombináns egér IFN- α és - β mellett a nukleozid analóg ribavirin és favipiravir, valamint a mitogén-aktivált protein (MAP) kináz gátló sorafenib hatását vizsgáltuk a RABV replikációjára, egér neuroblastoma (N2a) sejtvonalon. A sejtek laktát-dehidrogenáz aktivitását mérő citotoxicitás vizsgálat alapján a kísérletekhez a hatóanyagok négy nem sejtkárosító koncentrációját választottuk ki. Az antivirális szerek önálló hatásának vizsgálata után azok kombinációival is kezeltünk vírushordozó N2a sejteket. Minden kombinációt két hatóanyag alkotott, egy alacsonyabb és egy magasabb koncentrációban. A kombinációs kísérletekben az IFN-ok közül csak az IFN- β -t használtuk.

A vírusellenes effektust három különböző módszerrel határoztuk meg. Az eljárás mindegyik esetben a sejtek fertőzésével kezdődött, amihez a RABV fix laboratóriumi CVS-11 törzsét használtuk, 0,1 MOI multiplicitással. 1 óra adszorpció után a vírustartalmú tápfolyadékot a vizsgált hatóanyagokat megfelelő koncentrációban tartalmazó friss tápfolyadékra cseréltük.

48 óra elteltével a sejttenyészetek felülúszóit összegyűjtöttük FFA és qRT-PCR vizsgálatok céljából (ld. később), majd a vizsgálati lemezt 80%-os acetonnal fixáltuk és immunfluoreszcens festést alkalmaztunk a RABV nukleoproteinjének kimutatása érdekében. A sejttenyészetek fertőzöttségének mértékét (fluoreszcens sejtek aránya) inverz fluoreszcens mikroszkópban vizsgáltuk (szemikvantitatív becslés).

Az eltávolított felülúszókban a RABV infekzív titerét fluoreszcens fókusz módszert (FFA) alkalmazva határoztuk meg: a mintákat 4 ismétlésben, 10-es alapon titráltuk N2a sejteken, majd 48 óra után fixáltuk és fluoreszcensen festettük a lemezeket. Az eredményt a Spearman-Kärber módszerrel számítottuk, és TCID₅₀/ml-ben fejeztük ki. Ugyanazon felülúszó mintákból az RNS-t kromatográfiás módszerrel kivontuk, és megállapítottuk a RABV RNS kópiaszámát TaqMan rendszerű kvantitatív reverz transzkripció (qRT-) PCR-rel. Az eredményeket TCID₅₀-ekvivalens értékekre számítottuk át az FFA eljárással való jobb összehasonlíthatóság érdekében.

A hatályos Európai Unió jogszabályokat követve az élő vírussal való munkavégzés 3-as biológiai biztonsági szintű (BSL-3) laboratóriumban zajlott.

In vivo kísérleti szakasz

Az *in vivo* kísérleteket egérmodellen végeztük: hathetes nőstény, SPF (specified pathogen free) státuszú C57Bl/6 egereket helyeztünk el BSL-3 állatházban. Az egerek veszettség okozta szenvedésének enyhítése érdekében meghatároztuk a humánus végpontot (teljes testre kiterjedő súlyos görcsrohamok), amelyet elérve az állat eutanáziára kerül. Ez a veszettség kórlefolyásának követésére általunk használt 5 pontos klinikai pontozásos rendszer 3. stádiumának felel meg.

Munkánk során három egérxísérletet végeztünk el. Az egereket denevér eredetű vad-típusú RABV törzssel (SHBRV-18) fertőztük: a vírust a bal hátsó láb izmaiba oltottuk izoflurán narkózisban. Naponta kétszer ellenőriztük klinikai állapotukat és testtömegüket. Az állatokat szoftveres randomizációval rendeltük különböző kísérleti csoportokhoz: a fertőzött-kezelt csoportok mellett nem kezelt víruskontroll és nem fertőzött hatóanyag-kontroll csoportokat alakítottunk ki. A víruskontroll csoportoknál a hatóanyagokat, míg a hatóanyag-kontroll csoportoknál a vírusszuspenziót foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldat (PBS) helyettesítette.

Az első kísérletben a fertőzés LD₅₀ vírudózissal történt. Az egereket intraperitoneálisan (ip.), 8 napon át

naponta egyszer kezeltük sorafenibet (MAP-kináz-gátló), infliximabot (tumor-nekrózis faktor [TNF]- α elleni antitest) és Ac-YVAD-cmk-t (caspase-1 [CASP-1] gátló peptid) tartalmazó gyulladáscsökkentő kombinációval. A kezelést egy csoportban a fertőzés napján (4 órával előtte; -4h csoport), másik két csoportban pedig 2, illetve 4 nappal azután (48h és 96h csoport) kezdtük meg. A kísérletben összesen 70 egyed vett részt.

A második kísérletben a vírusdózis LD₁₀₀ volt. Az első kísérlet során használt kombinációt RABV elleni humán ellenanyagokkal (HRIG) egészítettük ki. A kezelések időzítése az első kísérletnek megfelelően történt, kivéve, hogy a kombinációt 10 napon át adagoltuk. A HRIG szerepének tisztázása érdekében egy HRIG monoterápiával kezelt kontrollcsoportot is felállítottunk. A teljes állatlétszám n=96 volt.

A harmadik kísérletben (n=39) a kombinációt az *in vitro* szakaszban használt antivirális szerekkel (I-es típusú IFN-ok, ribavirin, favipiravir) is kiegészítettük. A terápia csak egyféle időzítés szerint zajlott, 4 nappal a fertőzés után elindítva. A napi kezeléseket fél órával 25%-os mannitot adtunk be az egereknek (ip.) a vér-agy gát ideiglenes megnyitása céljából.

A humánus végpontot elért egereket, majd a kísérletek végén (fertőzéstől számított 28. nap) az összes addig túlélő egyedet extermináltuk, és az agyból, a gerincvelőből és parenchymás szervekből mintát vettünk virológiai és immunhisztokémiai (IHK) vizsgálatokra.

A kísérleti egerek agy- és gerincvelő mintáiban az SHBRV-18 eredetű virális RNS mennyiségét SyBR Green qRT-PCR módszerrel határoztuk meg. Az idegrendszer különböző területein a RABV-specifikus antigének (nukleoprotein) jelenlétét és szintjét is vizsgáltuk, immunhisztokémiai eljárással. Az elkészült metszetek hematoxylinnal és eozinnal történő festésével pedig a vírusszaporodást kísérő gyulladáshoz vezető jeleket kerestük.

Szerológiai vizsgálat céljából az első kísérlet végéig túlélő vírusfertőzött egerekből vért vettünk: fluoreszcens vírusneutralizáció próbával mértük a veszettség elleni neutralizáló ellenanyagok mennyiségét.

Eredmények

In vitro kísérleti szakasz

Eredményeink szerint valamennyi vizsgált antivirális szer gátolja a veszettségvírus replikációját N2a sejtekben, és ez a hatás koncentrációfüggő. Az I-es típusú IFN-ok közül az IFN- β vírusellenes aktivitása jelentősen meghaladta az

IFN- α -ét; továbbá a két IFN 1:1 arányú keverékének hatását is felülmúlta. FFA teszt alapján a legmagasabb vizsgált koncentráció (10 IU/ml) mellett az IFN- β 5,75 nagyságrenddel (\log_{10}) csökkentette a vírustitert a kezeletlen víruskontrollhoz képest, míg az IFN- α 3,5 \log_{10} csökkenést okozott. A legalacsonyabb koncentráció (0,01 IU/ml) mellett az IFN-ok gátlóhatása már nem volt számottevő.

A ribavirin és a favipiravir eredménye egymáshoz hasonló volt, bár magasabb koncentrációkban (10 és 1 $\mu\text{g/ml}$) a ribavirin vírusellenes hatását kifejezettebbnek találtuk a favipiravirénál. A két nukleozid analóg az IFN- β -nál jóval kevésbé, nagyjából az IFN- α -hoz hasonló mértékben csökkentette a RABV titerét.

A sorafenib rendkívül hatékony vírusellenes hatóanyagoknak bizonyult: a két magasabb koncentráció (50 és 5 μM) a titerértékek 5,75, illetve 5,37 \log_{10} csökkenését váltotta ki. Előbbi megegyezik az IFN- β maximális gátlóhatásával. A két alacsonyabb koncentráció (0,5 és 0,05 μM) jóval kisebb mértékben gátolta a RABV replikációját.

A tesztanyagok különböző kombinációi közül azok, amelyekben az IFN- β -t kombináltuk valamely másik antivirális szerrel, az önálló hatóanyagokhoz képest

fokozott mértékű, de nem szinergisztikus gátlóhatást váltottak ki a vírusszaporodásra. A legerősebb effektust az IFN- β + sorafenib kombinációnál állapítottuk meg. Az 1 IU/ml IFN- β kombinációja 5 μ M sorafenibbel még az egyedi hatóanyagok tízszer magasabb koncentrációjánál is nagyobb mértékben csökkentette a vírustiterek: a (logaritmikus) relatív gátlóhatás 77,19% volt. Ez az érték azonos dózisban egyedül használt IFN- β -nál (1 IU/ml) 48,07%, míg önálló 5 μ M sorafenibnél 68,90% volt.

Az IFN- β ribavirinnel vagy favipiravirral alkotott kombinációja is jelentős hatásnövekedést okozott az egyedi komponensekhez képest, bár meglepő módon ennek mértékét főként az (önálló hatóanyagként hatékonyabb) IFN- β helyett a ribavirin, illetve a favipiravir koncentrációja befolyásolta.

A ribavirin + favipiravir, ribavirin + sorafenib és a favipiravir + sorafenib kombinációk erős antagonizmust mutattak. Azon felül, hogy együttes gátlóhatásuk alulmúlta az azonos koncentrációban használt külön hatóanyagokét, bizonyos esetekben még a kezeletlen kontrollhoz képest sem csökkentették a vírusreplikációt.

Az eddig részletezett FFA eredményekkel azonos trendeket találtunk qRT-PCR módszerrel és a fertőzőtségi arány szemikvantitatív vizsgálatával is, bár a

számszerű eredmények a módszerek eltérő jellegéből adódóan (a vírusreplikáció különböző stádiumairól tájékoztatnak) különböztek. A PCR módszer megbízhatósága a nagyon magas, míg a fertőzöttségi arány vizsgálata a nagyon alacsony vírusrészek mellett nem érte el az FFA eljárásét. A qRT-PCR kópiaszámokból kalkulált titerek (a legmagasabb vírusrészek kivételével) meghaladták az FFA-val meghatározott értékeket.

In vivo kísérleti szakasz – 1. kísérlet

Az első egérkísérletben a MAP-kináz-, TNF- α - és CASP-1-gátló szereket tartalmazó terápiás kombináció nem váltott ki toxikus hatást az egerekre, a hatóanyag-kontroll csoportok egyedei egészségesek maradtak, testtömegük nem csökkent. A vírussal fertőzött csoportokban azok az állatok, amelyekben a klinikai tünetek megjelentek, gyors és nagymértékű testtömegvesztést mutattak, a kiszáradás, anorexia, és a súlyos görcsrohamok miatt.

A veszettség első jelei a fertőzés utáni 6. napon jelentek meg a víruskontroll csoportban, majd a következő naptól a fertőzött-kezelt csoportokban is. A betegség a vírussal beoltott bal hátsó láb remegésével vagy bénulásával kezdődött, majd ezt általában fél napon belül

egyre súlyosbodó tonico-clonicus görcsök követték. Amikor a görcsrohamok a teljes testre kiterjedtek és igen intenzívvé váltak (humánus végpont), az egereket leöltük.

A víruskontroll csoport túlélési aránya (6/13 egyed) a használt LD₅₀ vírudózisnak megfelelő volt. A kezelt csoportokban magasabb arányú túlélést figyeltünk meg: a pre-expozíciós (-4h) csoportban 8, a 48h csoportban 9, míg a 96h csoportban 10 egér élte túl a kísérletet. Az elhullások két nagyobb hullámban zajlottak le: a fertőzést követő 7-9., majd a 12.-13. napok között.

A veszettség miatt leölt egerek idegrendszerében qRT-PCR vizsgálattal kivétel nélkül nagy mennyiségű virális RNS-t mutattunk ki; kezelési csoporttól függetlenül. A fertőzést túlélő állatok közül négynek az agya és a gerincvelője, egy továbbiak pedig csak a gerincvelője szintén pozitív eredményt adott; igaz, az elhullott egerekhez képest jóval alacsonyabb kópiaszámban.

Ezen PCR-pozitív túlélő egyedek gerincvelőjében IHK módszerrel a RABV nukleoproteinjének jelenlétét is kimutattuk, agyuk viszont (egy kivétellel) negatív volt. A humánus végpontot elért egerek idegrendszerében (gerincvelő, agytörzs, kisagy- és nagyagyvelő) jelentős számú fertőzött idegsejtet láttunk, amelyek jelenlétét gyulladási jelek (mononuclearis sejtes beszűrődés)

kísérték. A PCR-rel pozitívnak bizonyult összes egeret figyelembe véve összehasonlítottuk az agyi és gerincvelői antigénmennyiségeket a kezelési csoportok között. A túlélési aránnyal azonos mintázatot találtunk: a később megkezdett kezelésű csoportokban egyre alacsonyabb fertőzöttség mutatkozott a központi idegrendszerben.

A kísérlet végéig túlélő egerek vérsavó mintáin elvégzett vírusneutralizációs próba igazolta a szerokonverziót mindegyik RABV-fertőzött állat esetében. Az átlagos védőtiter 0,61 IU/ml volt, amely meghaladja a WHO által meghatározott, biztos védettséget jelentő szintet (0,5 IU/ml). A PCR-/IHK-vizsgálatokkal pozitív eredményű túlélő egerek ellenanyag-titere az átlagnál magasabb volt (1,09 IU/ml).

A 48h séma szerint kezelt csoportban egy egér tünetei a többi megbetegedett állathoz képest jóval később, a 16. napon alakultak ki, és a veszettség kórlefolyása esetében a korai stádiumban (bal hátsó láb bénulása) leállt. Az egér a kísérlet végéig életben maradt; az utolsó napokban a veszettség miatt addigra lecsökkent testtömege is növekedésnek indult. Agyában és gerincvelőjében mind a RABV RNS-ét, mind a virális antigéneket sikerült kimutatni, vérében az átlagnál több (0,87 IU/ml) neutralizáló ellenanyag volt.

In vivo kísérleti szakasz – 2. kísérlet

A második egérikísérletben sem volt toxikus a kezeléshez használt kombináció, amely a gyulladáscsökkentő hatóanyagok mellett veszettség elleni antitesteket (HRIG-et) is tartalmazott. A megbetegedett állatokban a kórlefolyás és a testtömegváltozások az első kísérlethez hasonlóan alakultak.

Az oltóvírus LD₁₀₀-ra beállított dózisa következtében a víruskontroll csoport majdnem minden tagja elhullott (3/26 túlélő egér). A kombinációs kezelés védőhatása jelentős volt: a -4h csoportban 12/13, a 48h csoportban 7/13, a 96h csoportban 6/13 lett a túlélési arány. A csak HRIG-et kapott kontrollcsoportban (-4h kezelési séma) 13-ból 10 egér élte túl a fertőzést.

A virális RNS-ek mennyiségét tekintve csak a -4h csoport tért el szignifikánsan a víruskontrolltól. A túlélő állatok közül csak egynél – a víruskontroll csoport egy tagjánál – kaptunk pozitív PCR eredményt, az agyat és a gerincvelőbet vizsgálva is.

In vivo kísérleti szakasz – 3. kísérlet

A második kísérletben használt kombináció kiegészítése az *in vitro* szakaszban bizonyítottan hatékony antivirális szerekkel nem segítette elő a veszettség túlélését. A

hatóanyag-kontroll csoport testtömeg-csökkenése a 4. naptól (kezelés megkezdésének napja), és későbbi több mint 50%-os elhullása aspecifikus tünetek mellett egyértelműen azt jelzi, hogy a kombináció toxikus hatású volt. A fertőzött-kezelt csoport két tagja szintén a toxicitásra jellemző tüneteket mutatott elhullása előtt, és a csoportnál tapasztalt 100%-os mortalitás meghaladta a víruskontroll csoportét (84,6%).

A veszettség miatt leölt egerekben csoporttól függetlenül magas virális RNS- és antigénszintet találtunk az idegrendszerben. A víruskontroll csoport két túlélő tagjánál is pozitív PCR és IHK eredményt kaptunk, míg a fertőzött-kezelt csoport két toxicitás miatt elhullott egyedében csak a RABV RNS-ét sikerült kimutatni, az vírusantigéneket nem.

Megbeszélés

In vitro kísérleti szakasz

A RABV, replikációja során számos különböző módon gátolja az immunrendszer működését. Ezen mechanizmusok közül az egyik legnagyobb jelentőségű az I-es típusú IFN-ok szintézisének gátlása. Az endogén IFN-termelés kiiktatása ellenére a vírus érzékeny az exogén IFN-okra; ezt N2a sejtvonalon végzett kísérleteink

eredménye is bizonyítja. Igazoltuk, hogy az IFN- β RABV replikációt gátló hatása jelentősen meghaladja az IFN- α -ét. Eredményeink szerint a két I-es típusú IFN kombinálásával nem fokozható a vírusellenes hatás, aminek oka, hogy azonos sejtfelszíni receptorhoz kötődnek (IFNAR-1/-2).

A ribavirin RABV elleni *in vitro* hatása korábbi vizsgálatokból ismert, ezt eredményeink megerősítették. A szintén nukleozid analóg favipiravir gátlóhatását a ribavirinnél kisebb mértékűnek találtuk; szemben több, más RNS vírusokra vonatkozó kutatási eredménnyel. A favipiravir a sejtekben foszforibozilációval alakul aktív formába, azonban ennek a konverziós lépésnek a hatékonysága különféle sejttípusokban eltérő. Más sejtvonalban vizsgálva vagy a molekula aktív metabolitját használva lehetséges, hogy az általunk kimutatott mérsékelt hatás növelhető.

A sorafenib alapvetően daganatellenes szer, de gátolja több vírus szaporodását is. Bizonyítottuk, hogy a RABV replikációját nagymértékben csökkenti; anitivirális hatása az általunk vizsgált hatóanyagok közül a legmagasabb volt. A sorafenib számos MAP-kináz kaskádot blokkol, de a Raf/MEK/ERK jelátviteli útra van legnagyobb hatással. A veszettség sejtszintű

kórfolyamataiban a Raf/MEK/ERK reakcióút fontos szerepet játszik, gátlása befolyásolja a vírusfehérjék szintézisét és a nukleinsav-replikációt is.

A veszettség elleni antivirális kezeléseket felmérő legtöbb kutatásban csak egyedi hatóanyagokat vizsgálnak. Fontos célunk volt, hogy a RABV replikációját gátló szerek kombinációinak hatását is elemezzük. Kimutattuk, hogy fokozott gátlóhatás érhető el, ha az IFN- β -t sorafenibbel, ribavirinnel, vagy favipiravirral kombináljuk, bár szinergista kölcsönhatást nem tudtunk igazolni. Az IFN- β + sorafenib kombináció különösen hatékony volt, de az együttes hatásmechanizmus felderítése (irodalmi adatok híján) további vizsgálatokat igényel.

I-es típusú IFN-ok ribavirinnel vagy favipiravirral alkotott kombinációjának RNS vírusok elleni jelentős antivirális aktivitását már többször leírták, de a hatásnövekedés mértéke az alkotó komponensekhez képest eltérő volt. Vizsgálataink szerint az IFN- β RABV elleni hatása enyhén fokozható ribavirin vagy favipiravir hozzáadásával, és a hatás mértékét a nukleozid analógok koncentrációja limitálja.

A ribavirin + favipiravir kombináció vérzéscsillós lázat okozó vírusok ellen erős szinergizmust mutat, azonban más vírusok (pl. Zika vírus) esetében antagonizmusról

számoltak be a kombinációt használva. Eredményeink alapján a RABV esetében is az antagonista interakció a jellemző. Bár a két hatóanyag hatásmechanizmusa több szempontból átfedő, ami megmagyarázhatja az antagonizmust; a ribavirin egy másik hatása (intracelluláris GTP-szint csökkentése az IMPDH enzim gátlása révén) fokozhatja a favipiravir beépülését a virális RNS kópiákba, erősítve annak gátlóhatását. Valószínűleg a ribavirin által kiváltott egyes folyamatok hangsúlya eltér különböző vírusfertőzések esetén, ami a kombinált hatást a szinergizmus vagy az antagonizmus felé billentheti.

A sorafenib kombinációja ribavirinnel vagy favipiravirral erős antagonizmust mutatott; feltehetőleg a sorafenib által gátolt MAP kinázok valamelyike szükséges a nukleozid analógok metabolizmusához vagy hatásához.

In vivo kísérleti szakasz

In vivo kutatómunkánk fő célkitűzése az immunrendszer veszettségre adott káros reakciójának csökkentése volt, immunmoduláns hatóanyagok kombinációjával.

Az első kísérletben MAP kináz-, TNF- α -, illetve CASP-1-gátló szerekkel kezeltük a RABV SHBRV-18 törzsével fertőzött egereket. A kombináció segítségével az elhullás mértékét – a kezelés időzítésétől függően –

15-30%-kal sikerült csökkenteni. Az alacsony csoportlétszámok miatt azonban a kezelt csoportok víruskontrolltól való eltérése csak abban az esetben statisztikailag szignifikáns, ha a víruskontroll csoport LD_{50} vírudózishoz igazodó túlélési arányát fix referenciaértéknek tekintjük (egzakt binomiális próba).

Érdekes módon a túlélési arány annál magasabb volt, minél később kezdtük a kombinációs kezelést. Hasonló tendencia mutatkozott a KIR-ben mérhető RABV antigének mennyiségét IHK módszerrel vizsgálva: a legmagasabb antigénszintet a -4h csoportban, míg a legalacsonyabbat a 96h csoportban állapítottuk meg. A jelenség magyarázata, hogy a gyulladáscsökkentő szerek kombinációját 8 napon át adagoltuk, így a korábban megkezdett terápia korábban véget is ért, azonban a tovább fenntartott kezelés megelőzhette a későbbi (12-13. nap) elhullásokat.

A túlélő egerek közül négy agyában és gerincvelőjében, egy további pedig csak a gerincvelőjében sikerült kimutatni a RABV RNS-ét PCR-rel, és ezeknek az egyedeknek a gerincvelőjében a virális antigének is kimutathatók voltak. Az agy IHK-vizsgálata azonban csak egy túlélő állatnál adott pozitív eredményt, amelynél a veszettség kórlefolyása a korai szakaszban megállt.

A vad-típusú RABV törzsek késleltetik az immunválaszt immun-elkerülő mechanizmusok által, de a kombinációs kezelés a gyulladós folyamatok kordában tartásával időt adhatott a B-limfociták megkésett belépéséhez a KIR-be, amelyek lokális ellenanyagtermeléssel képesek felszámolni az agyi fertőzést. A néhány PCR-/IHK-pozitív egér esetében az immunrendszer a gyulladáscsökkentő terápia támogatásával megállíthatta a fertőzés terjedését még a tünetek megjelenése előtt, vagy kevéssel utána.

A veszettség kórfolyamataiban a gyulladós folyamatok két szakaszban zajlanak: a korai hullám a periférián az expozíciót követő azonnali veleszületett, majd adaptív immunválasz, ami segíti a túlélést, de csak attenuált RABV törzsekre jellemző. A kemotaktikus környezet, az IFN-ok, dendritikus sejtek, és a termelődő ellenanyagok együttműködése megelőzi a vírus bejutását a KIR-be, vagy hamar leállítja az idegrendszeri fertőzést. Vad-típusú törzseknél a gyulladós folyamatok egy második, káros hulláma kap szerepet, amely már a tömeges vírusreplikáció időszakában indul el. Ennek a késői kaszkádnak fontos résztvevői a mikroglia sejtek; az általuk termelt nitrogén-oxidok és TNF- α idegrendszeri károsodásokat okoznak. A programozott sejthalált okozó jelátviteli utak közül CASP-1-vezérelt piroptózis az

idegsejteket, a FasL/Fas mechanizmus által serkentett apoptózis pedig az agyba áramló immunsejteket pusztítja.

A sorafenib a Raf/MEK/ERK kaszkád gátlásával csökkenti a nitrogén-oxidok, TNF- α és a FasL szintézisét, az infliximab a TNF- α elleni antitest, az Ac-YVAD-cmk pedig gátolja a CASP-1-et és ezáltal a piroptózist. A három hatóanyag kombinációja tehát a késői gyulladásos válasz enyhítése által növelhette a túlélés esélyét a vad-típusú SHBRV-18 vírustörzzsel fertőzött egerekben. Ez összhangban van megfigyelésünkkel, hogy a hosszabb ideig fenntartott kezelés magasabb túlélési arányt és csökkent idegrendszeri vírusterhelést eredményez.

A második kísérletben a HRIG hozzáadása a kombinációhoz szinte teljesen megszüntette az elhullást a kezelés azonnali megkezdése esetén (-4h csoport), mivel a nagy mennyiségű ellenanyag korai jelenléte a RABV-t még a periférián neutralizálva megelőzhetette a vírus bejutását a KIR-be, vagy erősen csökkenthette annak mértékét. Ugyanakkor, ha kizárólag HRIG-el kezeltük az egereket, alacsonyabb túlélést tapasztaltunk, ami arra utal, hogy a gyulladáscsökkentő hatóanyagok is hozzájárulnak a védőhatáshoz. Később indított kezelés esetén azonban a HRIG jótékony hatása jelentősen csökken, mert vad-típusú RABV fertőzése esetén

korlátozott a perifériás ellenanyagok bejutása az agyba. A túlélési arány kisebb mértékű, de szignifikáns növekedésében így egyre inkább a MAPK-, TNF- α - és CASP-1-gátlók hatása dominálhatott.

A harmadik kísérletben az *in vitro* szakaszban hatékony antivirális szerekekkel (IFN-ok, ribavirin, favipiravir) egészítettük ki a kombinációt. A hatóanyagok, immunsejtek és perifériás ellenanyagok KIR-be való nagyobb mértékű bejutása érdekében vér-agy gát megnyitó kezelést is alkalmaztunk (mannit). A kezelés veszteség elleni védőhatását ebben az esetben nem tudtuk igazolni, mert a kombináció toxikusnak bizonyult az egerekre. Mivel az egyedi összetevők a felhasznált koncentrációban nem toxikusak, bizonyos hatóanyagok vagy segédanyagok között interakció léphetett fel. Ennek bizonyításához és részleteinek felderítéséhez azonban további vizsgálatok szükségesek.

Állatkísérleteink rámutatnak, hogy a RABV fertőzés hatására fellépő késői gyulladási válasz gátlása javítja a túlélés esélyét. A kezelést érdemes sokáig fenntartani, hogy időt adjon az adaptív immunitásnak a fertőzés felszámolásához. Ellenanyagok korai adagolása tovább fokozza a védőhatást. Eredményeink hasznos adatokkal szolgálhatnak a humán veszteség jövőbeli terápiájához.

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 gyulladáshoz vezető kaszkádokat és citokineket gátló hatóanyagok (CASP-1-, MAP-kináz- és TNF- α -inhibitorok) kombinációja javítja a túlélési arányt veszettségvírussal fertőzött egerekben, feltehetőleg az idegrendszerben fellépő késői gyulladáshoz vezető 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 egérmodellben, és ez a védőhatás kifejezettebb, mint ami az ellenanyagok önálló alkalmazásával elérhető.

Az értekezés témájában született publikációk

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

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

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.

Egyéb lektorált publikációk

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.

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.

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.

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

Marosi A.; Juhász A.; Gyórfy A.: **Placentáció eleve szülő pikkelyes hüllőknél 1-2. rész.** Magyar Állatorv. Lapja, 133. 182-189; 242-250, 2011.

Köszönetnyilvánítás

Elsőként köszönettel tartozom témavezetőmnek, Bakonyi Tamáshoz, aki bevezetett a virológia világába és rám bízta ezt az izgalmas, de kihívást jelentő kutatási témát.

Köszönet illeti Virologia Csoportunk tagjait: Forgách Petrát, Bakonyi Győzöt, Hofbauer Gyöngyit és Kaposi Tamásné. Köszönöm Rusvai Miklós, Fodor László, Gerényi Dóra, Bíró Nikoletta és a Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék korábbi és jelenlegi dolgozóinak segítségét, szakdolgozó hallgatóim lelkesedését.

Köszönettel tartozom az Állatorvos-tudományi Kutatóintézetből Forró Barbara, Stammné Felde Orsolya, Pásztor Alexandra, Görföl-Sulyok Kinga, Kreizinger Zsuzsa, Gyuranecz Miklós, és sok más kolléga segítségéért. Sokat köszönhetek a NÉBIH-ÁDI kötelékéből Erdélyi Károlynak és Hornyák Ákosnak. Hálával gondolok az ASKLEPIOS konzorcium tagjaira, kiemelve Karen Mansfieldet, Anthony Fooks-ot, Ashley Banyardot, Penelope Korakát, Lucie Dufkovát, Daniel Ruzeket és Dirk Jochmanst.

Végül hálásan köszönöm családom kitartását és türelmét; igazán értük érdemes dolgozni és élni.