



SZENT ISTVÁN EGYETEM
ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA



**A kórokozó és a gazdaszervezet
kölcönhatásának immunológiai
befolyásolása**

Doktori értekezés tézisei

Készítette:

Dr. Szathmáry Zsuzsanna,

Témavezető:

Dr. Stipkovits László

Budapest
2005

Irodalmi áttekintés

A természetes és a szerzett immunitás megindításában a "kórokozó felismerő receptor"-ok, (Pathogen recognition receptors = PRR) nagyon fontos szerepet játszanak. Ezek ismerik fel a kórokozó mikrobák konzervált molekula mintázatait (pathogen-associated molecular patterns = PAMPs). Ezek a receptorok számos sejttípuson megtalálhatók. A dendrikus sejteken (DS) lévő PRR-ok kulcsszerepet játszanak a szerzett immunválasz kialakításában. Rajtuk keresztül a DS-ek aktiválódnak, „felszabályozzák” a hisztokompatibilis komplex (MHC) és egyéb molekulák termelődését majd a perifériális szövetekből a limfoid szervekbe vándorolnak. Az antigén prezentálás következtében a naiv T sejtek kórokozó-specifikus T („Th1”, „Th2”, ill. „T regulátor”) sejtekké differenciálódnak. A Th1-Th2 egyensúlyt a DS-ek eredete, az érési folyamat stimulusa és a fertőzés helyén keletkező gyulladáshoz vezető mediátorok szabják meg. Ettől függ az, hogy a gazdaszervezet le tudja-e győzni a fertőzést vagy sem.

A kutatásaink célja az immunrendszer befolyásolása volt, amelyet kétféle módon közelítettünk meg: a PRR stimuláló anyagok eltávolításával, valamint egy kórokozót utánzó rendszer előállításával. Ez utóbbiban a kórokozókra jellemző molekuláris mintázatokat, mint például TLR 2, 3, 4, 9 és Nod2 aktiváló molekulákat valamint *M. gallisepticum*-ból tisztított antigént kötöttünk egy bakteriális méretű részecskére. Ezeket használtuk csirkékben *M. gallisepticum* fertőzési kísérletben, és *in vitro* dendritikus sejtekkel végzett kutatásokban.

Saját vizsgálatok

Az **első kísérletben** elvégeztük egy TLR4 agonista molekulának, az endotoxinnak az affinitás kromatográfiás eltávolítását különböző oldatokból. Az endotoxin koncentrációt LAL teszttel mértük. Bemutattuk az endotoxin kötést különböző oldatokból, mint például vízből, sóoldatból, és *Pseudomonas maltophilia* tenyészet szűrletéből. Megvizsgáltuk a rezin újrafelhasználhatóságát és azt, hogy a rezin a folyadék kémiai összetételét nem változtatja-e meg. A kísérlet eredményeként azt láttuk, hogy átlagosan 37 EU/ml endotoxint tartalmazó oldatot a rezin oszlopon átengedve az endotoxin szintet 0.011 EU/ml szint alá csökkent. A rezin így több mint 20,000 EU-t kötött meg ml-ként. A rezin nem változtatta meg az oldatok ionösszetételét és újrahasználható volt.

A **2. kísérlet** során bemutattuk a TLR agonista molekulákat, mint például, endotoxin (TLR4), peptidoglikán (TLR2/Nod2), lipopeptid (TLR2) és bakteriális DNS (TLR9) eltávolítását plazmából és vérből. Az endotoxin eltávolítását LAL teszttel követtük, míg az egyéb TLR aktiváló molekulák eltávolítását monocita aktivációs teszttel, amelyben TNF- α termelésének csökkenését mértük ELISA módszerrel. Az eredményeink igazolták, hogy ezen molekulák szintjének jelentős csökkentése mellett a vér alvadási paraméterei nem változtak. A vérben a sejtszám nem változott, hemolízis nem történt és a komplement rendszer nem aktiválódott jelentős mértékben.

A **3. kísérlet** során bemutattuk a mycoplasmák kötődését különböző affinitás kromatográfiás rezinekhöz a membránjukban található zsír és cukor molekulákon keresztül. A *Mycoplasma* koncentráció csökkenését tenyésztéssel követtük. Ezzel a technológiával 10^3 – 10^5 CFU/ml *Mycoplasma*-t lehetett eltávolítani a foetális borjúsavóból

anélkül, hogy a savó minősége, a szövettenyészetben való növekedést serkentő hatása, megváltozott volna.

A **4. kísérletben** igazoltuk, hogy a peptidoglikán és a bakteriális DNS együttes jelenléte lényegesen jobban stimulálja a monociták TNF- α és Tissue Faktor termelését, melyek szintjét ELISA módszerrel mértük. Az eredményeink azt mutatták, hogy amikor a peptidoglikánhoz (0.3-1.0 μ g) bakteriális DNS-t (5-15 μ g) adtunk a szinergikus hatás 10-15-szörösére emelkedett.

Az **5. kísérlet** során mesterséges „Mycoplasma mimikáló” részecskét előállítottunk elő. Vivő anyagként baktérium nagyságú (1-5 μ m) poliszacharid részecskéket választottunk, amelyek felületére több, Mycoplasmára jellemző, affinitás kromatográfiával tisztított antigént és annak kémiaiilag módosított (ConcanavalinA, Endoglikozidáz H, perjodát) változatait, valamint különböző PRR agonistákat (TLR2, 3, 4, 9 és Nod2) kötöttünk. Az így előállított anyagot fertőzési, valamint *in vitro* kísérletekben használtuk.

A **6. kísérlet** keretében több fertőzési kísérlet végeztünk csirkéken. Csoportonként 10 háromnapos csirkét szájon át kezeltünk, vagy az első napon (fertőzés előtt) vagy a 15-ik napon (fertőzés után). A csirkéket a 14 napon *M. gallisepticum* Rlow virulens törzs levestenyészetével fertőztünk. A 28. napon az állatokat kiírtottuk és kórbonctanilag vizsgáltuk, valamint a belső szervekből Mycoplasmát kíséreltünk meg visszaizolálni. A részecskék önmagukban semmiféle védelmet nem eredményeztek. A PRR ligandokkal ellátott részecskék antigén nélkül kb. 30% kal csökkentették a kórbonctani elváltozásokat és a Mycoplasma visszaizolálást a belső szervekből. Az affinitás kromatográfiával előállított natív antigén 10 μ g mennyiségben kb. 50-60%-os védettséget eredményezett. A

natív antigén 50µg koncentrációban 30-40%-os, a membrán a kontrollhoz képest viszont rosszabb eredményt adott. Ha a natív antigénhez PRR ligandokat tettünk, akkor a védettség kb. 70-80%-os volt. Amennyiben a Mycoplasma antigént kezeltük ConA-val, vagy endoH enzimmal, vagy perjordáttal és PRR ligandokat is kötöttünk a részecskékre, a védettség 90-100% volt és antigén dóziszfüggő védettséget kaptunk. Az eredményeink hasonlóan jók voltak mind a fertőzés előtt mind a fertőzés után kezelt csoportokban.

A **7. kísérletben** monocita, illetve IL-4 és GM-CSF kezeléssel előállított DS tenyészetekben a „Mycoplasma utánzó” részecskék hatására történő citokinek termelését vizsgáltuk. A TNF- α és IL-10 citokinek szintjét ELISA módszerrel mértük. A részecskéket fluoresceinnel jelöltük és a MHCII, valamint CD86 molekulák szintjének megemelkedésével igazoltuk, hogy a részecskék a dendritikus sejtekkel kölcsönhatnak. A részecskéken lévő ConA-val kezelt antigén 30 pg TNF- α és 15 pg IL-10 termelését váltotta ki. Ezzel szemben a ConA-val kezelt antigén, PRR stimulálókkal együtt 150 pg TNF- α és 7 pg IL-10 termelését eredményezte. A TNF- α és IL-10 aránya a ConA-val kezelt antigén PRR stimulálókkal kombinálva volt a legmagasabb. Ez az eredmény igazolta az *in vivo* kísérletekben látott pozitív eredményekkel.

Következtetések

A vizsgálataink első részében kimutattuk, hogy a bakteriális komponensek, mint például az endotoxin, peptidoglikán, bakteriális DNS, eltávolításával a gyulladáshoz vezető citokinek (TNF- α) és egyéb faktorok (Tissue factor) szintje a vérben és plazmában jelentősen csökkent. Ezzel kedvezően befolyásoltuk a természetes immunrendszer által kiváltott védekezési folyamatot. Ezen molekulák affinitás kromatográfiás eltávolítása egy új megközelítése ennek a problémának.

A kutatások második részében igazoltuk, hogy a *M. gallisepticum* antigénnek és PRR agonistáknak a kórokozó utánzó részecskére történő kémiai kötésével és ennek csirkékben való alkalmazásával a *M. gallisepticum* okozta kórbonctani elváltozásokat és a belső szervek kolonizációját jelentős mértékben csökkenteni lehetett. Azt is bizonyítottuk, hogy ezeknek a részecskéknek az adagolása kedvezően befolyásolja az immunrendszert nemcsak fertőzés előtt hanem a fertőzés után adva is. Ennek a részecskének a használata egy új módszer az immunrendszer befolyásolására.

Az irodalomban eddig ismertetett részecskéket (chitisan, Poly-DL-lactic acid, polyacryamide keményítő vagy dextrán, ISCOM, liposoma, stb.). Ezeknek egy részét kicsapós módszerrel készítették és így a körülmények korlátozzák, hogy milyen antigén és egyéb molekulák csapodnak ki együttesen a hordozóval. Az antigén molekulák az így képződött részecske belsejében vannak és a részecske sejt általi lebontása szükséges az antigénekhez való hozzáféréshoz. A PRR molekulákat nem lehet a részecske felszínére juttatni. A műanyag alapú dextrán vagy keményítő részecskék sejten belüli lebomlása és így a biokompatibilitás kérdéses.

Az általunk használt részecskék természetes polysaccharidból készültek így könnyen lebonthatók és biokompatibilisek. A különböző antigének és PRR molekulák az általunk használt részecskének a felszínén találhatóak. A kémiai kötés amit használtunk lehetővé teszi számos antigén és egyéb molekula egyidejű kötését, így biztosítja, hogy ugyanaz az antigén prezentáló sejt vegye fel mind az antigént mind a PRR stimuláló molekulát.

A részecskék biológiai hatását nem csupán állatkísérletekben, hanem jól jellemzett in vitro rendszerekben is, mint például monocita és dendritikus sejt tenyészetekben is.

Új kutatási eredmények

Sikeresen jelentős mennyiségű TLR4 agonistát (endotoxint) csökkentettük le oldatokban a mérhető határ szintje alá affinitás kromatográfiás módszerrel.

Sikeresen távolítottuk el a TLR 2, 4, 9 és Nod2 agonista molekulákat (lipoproteint, endotoxint, bakteriális DNS-t és peptidoglikánt) vérből és plazmából affinitás kromatográfiás módszerrel, anélkül, hogy negatívan befolyásoltuk volna a vér egyéb paramétereit.

Elsőnek alkalmaztuk az affinitás kromatográfiás eljárást mycoplasmák savóból és egyéb folyadékokból való eltávolítására. Bemutattuk, hogy ez az eljárás nem befolyásolta a savó minőségét.

Elsőként írtuk le a peptidoglikán és bakteriális DNS szinergista hatását a monocita tenyészetek TNF- α és Tissue faktor termelésére.

M. gallisepticum antigének és különböző kombinációjú PRR agonisták (TLR3,4,9, Nod2) felhasználásával, elsőként egy olyan kórokozót mimikáló részecskét állítottunk elő, amely csirkében *M. gallisepticum* fertőzési modellben tesztelve jelentősen csökkentette a mycoplasmák okozta kórbonctani elváltozásokat és a belső szervek fertőzöttségét.

Elsőként mutattuk ki, hogy az *M. gallisepticum* antigén post-transcriptionális módosításainak eltávolításával (ConA-, EndoH-, perjodát-kezelés, deacylálás) kedvezően tudtuk befolyásolni az immunválaszt. A kedvező immunválasz nemcsak akkor jelentkezett, ha a részecskéket fertőzés előtt adagoltuk, hanem a fertőzés után adva is.

Bemutattuk ezeknek az új részecskéknek a monocitákkal és dendritikus sejtekkel való kölcsönhatását, valamint azt hogy a PRR agonisták különböző kombinációja eltérő citokine termelést vált ki.

A témával kapcsolatban megjelent vagy közlésre elfogadott közlemények

Referált cikk:

Amoureux, M.C., Hegyi, E., Le, D., Grandics, P., Tong, H., **Szathmary, S.** (2004) A new method for removing endotoxin from plasma using hemocompatible affinity chromatography technology, applicable for extracorporeal treatment of septic patients. *J. Endotoxin Res.* 10:85-95.

Amoureux, M.C., Rajapakse, N., Hegyi, E., Le, D., Grandics, P., **Szathmary, S.** (2004) Endotoxin removal from whole blood by a novel adsorption resin: efficiency and hemocompatibility. *Int. J. Artif. Organs.* 27:480-487.

Amoureux, M.C., Rajapakse, N., **Szathmary, S.** (2005) Peptidoglycan and bacterial DNA synergistically induce inflammation and coagulation markers. *Mediators of Inflammation.* (in press)

Biró, J., Erdei, N., **Szathmary, S.**, Stipkovits, L. (2004) *Mycoplasma bovis* kimutatása különböző PCR módszerekkel. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 126:626-630.

Grandics, P., **Szathmary, S.**, Szathmary, Z., O'Neill, T. (1991) Integration of cell culture with continuous, on-line sterile downstream processing. *Ann. N Y. Acad. Sci.* 646:322-333.

Grandics, P., Szathmary, Z., **Szathmary, S.** (1990) A novel immunoaffinity chromatography system for the purification of therapeutic proteins. *Ann. NY. Acad. Sci.* 589:148-156.

Szathmary, S., Grandics, P. (1990) Bioreactor integration with downstream processing. *Nature Bio/technology.* 8:924-925.

Szathmary, S., Grandics, P. (1991) A method for purifying IgM, IgA, IgE, IgG1, and other monoclonal antibodies. *Am. Biotechnol. Lab.* 9:31-33.

Szathmary, S., Hegyi, E., Amoureux, M.C., Rajapakse, N., Chicorka, L., Szalai, G., Reszegi, K., Derbyshire, Z., Paluh, J., Dodson, B., Grandics, P. (2004) Characterization of the DialGuard Device for Endotoxin Removal in Hemodialysis. *Blood Purif.* 22:409-415.

Szathmary, S., Pitlik, E., Stipkovits, L. (2005) A Toll-like receptorok szerepe a szervezet védekező mechanizmusában. *Magyar Állatorvosok Lapja* (submitted)

Szathmary, S., Rajapakse, N., Székely, I., Pitlik, E., Biró, J., Erdei, N., Stipkovits, L. (2004) Binding of Mycoplasmas to Solid Phase Adsorbents. *Acta Vet. Hung.* (submitted)

Tamic, L., **Szathmary, S., Grandics, P., Markland, F.S. Jr. (1986)** The goat blood binder of triamcinolone acetonide does not interfere with glucocorticoid receptor purification from mammary tissue. *J. Recept. Res.* 6:475-487.

Folyóiratban megjelent absztrakt:

Amoureux, M.C., Rajapakse, N., Hegyi, E., Le, D., **Szathmary, S., Tong, H., George, N. and Grandics, P. (2003)** Endotoxin Removal From Human Plasma And Blood By A Hemocompatible, Affinity-Based Extracorporeal Technology For The Treatment Of Sepsis. *J. Am.Soc.Nephrology*, American Society of Nephrology Meeting, San Diego. Oral presentation

Amoureux, M.C., Rajapakse, N., Hegyi, E., Le, D., **Szathmary, S.**, Grandics, P. (2004) Bacterial toxins removal from human plasma and blood by a hemocompatible, affinity-based extracorporeal technology for the treatment of sepsis. J. Am.Soc.Nephrology. American Society of Nephrology Meeting, St Louis. Oral Presentation

Grandics, P., Amoureux, M.C., Rajapakse, N., Hegyi, E., Tong, H., George, N. and **Szathmary, S.**, (2003) Endotoxin-Free Dialysate Using DialGuardTM J.Am.Soc.Nephrology. American Society of Nephrology Meeting, San Diego. Oral Presentation

Szathmary, S., Amoureux, M.C., Chicorka, L., Hegyi, E., Tong, H. and Grandics, P. (2003) A novel method for producing sterile water for injection (WFI) on-line. J. Am. Soc. Nephrology. American Society of Nephrology Meeting, San Diego. Oral Presentation

Proceeding:

Stipkovits, L., Biro, J., **Szathmary, S.**, Klein, U. (2004) Sensitivity testing of mycoplasma pathogens to antimicrobials. Proceeding of IOM, Athens, USA. Poster

Szabo, I., **Szathmary, S.**, Stipkovits, L. (2004) Detection of maternal antibodies to M. hyopneumoniae in swine of farrowing-fattening type of farm. Proceeding of 18th Congress of IPDS. Hamburg. Poster

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Stipkovits Lászlónak, hogy bevezetett a mycoplasmaológia tudományába, megtanított, hogyan kell az állatkísérleteket megtervezni és precízen végrehajtani. Köszönöm az értékes szakmai megbeszéléseket. Köszönettel tartozom Dr. Harrach Balázsnak, az Intézet igazgatójának, mert lehetővé tette számomra, hogy az Intézetben végezhessem doktori munkámat. Köszönöm munkatársaimnak, Bíró Juditnak, Erdei Noéminek, Székely Ibolyának, Tuboly Jánosnének, Richter Istvánnének, Nandani Rajapakse-nek, Marie-Claude Amoureux-nak, Warren Chester-nek, James Harris-nek, Hung Tong-nak és Peter Grandics-nak kísérletekben nyújtott segítséget. Külön köszönöm Bacskó Tibornak és Hargittai Zoltán az állatkísérletekben nyújtott segítséget. Legvégül szeretném megköszönni a barátaimnak és a családomnak, különösen a lányomnak a megértését és a támogatását azokban a nehéz időkben, amikor hosszú napokat töltöttem a laborban a kísérletekkel, cikk- és téziséírással.