

Állatorvostudományi Egyetem
Élettani- és Biokémiai Tanszék, Biokémiai Osztály



**A chicken heterophil peptide-1
gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata
csirke eredetű májsejttenyészeteken**

Készítette:

Sebők Csilla

Témavezetők:

Dr. Neogrady Zsuzsanna

Állatorvostudományi Egyetem, Élettani és Biokémiai Tanszék,
egyetemi docens

Oláhné Dr. Orbán Kata

Állatorvostudományi Egyetem, Élettani és Biokémiai Tanszék,
tanszéki állatorvos

Budapest, 2019

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	2
Bevezetés	3
Irodalmi áttekintés	4
Az antimikrobiális szerek története	4
Az antimikrobiális peptidek	5
Felépítésük és általános jellemzésük	6
Hatásmechanizmusuk	6
Endotoxin-ellenes hatásuk részletes ismertetése	8
Antibiotikum-rezisztencia a baromfitartás területén	10
Chicken heterophil peptide-1 (CHP-1)	10
Célkitűzés	12
Anyag és módszer	13
Sejtmodellek létrehozása	13
A sejtek izolálása	13
Sejtek lerakása és inkubálása	15
Sejtek kezelése	16
Mérések	17
A sejtek metabolikus aktivitásának vizsgálata	17
A H ₂ O ₂ szint mérése	17
Az interleukin-6 koncentráció mérése	18
Statisztika	19
Eredmények	20
A CCK-8 teszt eredményei	20
Az Amplex Red teszt eredményei	21
Az IL-6 koncentráció mérésének eredményei	23
Megbeszélés	25
Összefoglalás	28
Summary	30
Köszönetnyilvánítás	32
Irodalomjegyzék	33

Rövidítések jegyzéke

AMP: Antimikrobiális peptid

BSA: Bovine serum albumin, szarvasmarha szérum albumin

CCK-8: Cell count kit-8

CD14: Cluster of differentiation-14

CHP-1: Chicken heterophil peptide-1

DNS: Dezoxiribonukleinsav

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

FBS: Foetal bovine serum, szarvasmarha magzati szérum

MRSA: Meticillin-rezisztens Staphylococcus aureus

HIV: Humán immundeficiencia vírus

IL-6: Interleukin-6

LBP: LPS-binding protein, LPS-kötő fehérje

LPS: Lipopoliszacharid

LTA: Lipoteikólsav

M-PER: Mammalian protein extraction reagent, Emlős fehérje kivonó reagens

NADP⁺: Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

NE: Nemzetközi Egység

PBS: Phosphate buffered saline, foszfát pufferelt sóoldat

TNF- α : Tumor nekrozis faktor- α

TLR: Toll-like receptor

Bevezetés

A patogén baktériumok egyre növekvő rezisztenciája az antibiotikumokkal szemben napjaink egyik legégetőbb problémájának tekinthető. Hatékony antibiotikumok nélkül ma könnyen viaszorítható betegségek válhatnak ismét végzetessé, évtizedek óta gyógyítható bakteriális fertőzések okozhatnak súlyos betegségeket. Jelenlegi vélemények szerint az antibiotikum-rezisztencia 2050-ben több halálos áldozatot fog követelni, mint a rákos megbetegedések. Mindezek mellett nem elhanyagolható a gazdasági kár, melyet az egyre nagyobb léptékben terjedő antibiotikum-rezisztencia okozhat a haszonállattartásban, így az állatgyógyászat területén is fontos feladattá vált ezen probléma megoldása.

A rezisztencia terjedésében talán a legnagyobb szerepet a humán-, és az állatgyógyászat túlzott mértékű és sokszor helytelen antibiotikum-használata játssza. Így rendkívül fontossá vált az állatorvosok továbbképzése és felvilágosítása mellett olyan vegyületek kutatása, melyek részben vagy egészben helyettesíthetik az antibiotikumok használatát. Ilyenek a kutatásunk alapjául választott antimikrobiális peptidok (továbbiakban AMP-k), melyek a veleszületett immunrendszer részét képezik, és az eddigi eredmények alapján rendkívül ígéretes jelöltek lehetnek a bakteriális fertőzések és a legtöbb esetben velük együtt kialakuló gyulladásos kórképek kezelésében.

Jelen munkánk során a napjainkban legnagyobb számban tartott haszonállat, a háziyúk megbetegedéseinek kezelésére kívánunk egy lehetséges AMP-t találni és azt vizsgálni. Ennek érdekében a chicken heterophil peptide-1 (továbbiakban CHP-1) gyulladáscsökkentő hatását vizsgáltuk csirke eredetű májsejttenyészeteken. A gyulladást a Gram-negatív baktériumok sejtfalában megtalálható lipopoliszacharidokkal (továbbiakban LPS) indukáltuk, majd a CHP-1 gyulladáscsökkentő hatásának mértékét az oxidatív stressz szintjének, illetve az interleukin-6 (IL-6) koncentrációjának mérésével határoztuk meg.

Irodalmi áttekintés

Az antimikrobiális szerek története

Már az ókori Egyiptomban és Görögországban is alkalmaztak kezdetleges, antimikrobiális hatású kezeléseket: penészgombával és különböző növényi részekkel kezelték a sérüléseket, hogy ezzel akadályozzák meg a sebek elfertőződését (Forrest, 1982). Ez azonban koránt sem bizonyult tökéletes módszernek. Az első, gyógyszerként alkalmazható antimikrobiális hatású szerek felfedezése az orvostudomány talán legnagyobb mérföldkövének tekinthető, hiszen számos azelőtt halálosnak bizonyult betegség vált gyógyíthatóvá, emberek milliói menekültek meg ma már kontrollálható, de akkor súlyos következményekkel járó bakteriális fertőzésektől.

Az első antimikrobiális hatású anyag a salvarsan volt, melyet ma arzenamin néven ismerünk. Paul Ehrlich fedezte fel 1910-ben, majd sikeresen alkalmazta a szifilisz és tripanosomiasis kezelésére (Zaffiri et al., 2012).

Azonban a fent említett szer nem az antibiotikumok csoportjába tartozik: antimikrobiális hatású kemoterapeutikumnak tekinthető, hiszen mikroba ellenes hatással rendelkezik, azonban nem más mikroorganizmusok állítják elő (Waksman, 1947). Az első valódi antibiotikumot, a penicillint Alexander Fleming fedezte fel 1928-ban. Felfedezése egy véletlen megfigyelésen alapult: észlelte, hogy a *Staphylococcus spp.* tenyészeteket tartalmazó petri-csészékben több mikroorganizmus, köztük egy penészgomba, mint később kiderült, a *Penicillium notatum* indult növekedésnek, és körülötte egy sávban nem nőttek baktériumtelepek. Ebből Fleming (1929) arra következtetésre jutott, hogy a penészgomba termel valamiféle anyagot, ami a baktériumok növekedését gátolni képes. A penicillint gyógyászati célokra azonban, többek között a gyártási nehézségek miatt csak az 1940-es években kezdték el alkalmazni (Zaffiri et al, 2012).

Az elkövetkező években számos antibiotikum-csoportot fedeztek fel, s ezt követően egyre kevesebb halálos áldozatot követeltek a bakteriális fertőzések. A rezisztencia kialakulásának veszélyeire már maga Fleming is felhívta a figyelmet, ámde az emberek mégis felelőtlenül, aludozírozva, sokszor indokolatlanul alkalmazták a különféle antibiotikumokat. A rezisztencia első példáját, a baktériumok által termelt penicillináz (más néven β -laktamáz) enzimet azonban már 1940-ben felfedezték

(Abraham et al., 1940), ami arra utalt, hogy vannak olyan baktériumok, amelyek eredendően rezisztensek bizonyos antibiotikumokra.

Az évek során egyre több antibiotikummal szemben fedeztek fel rezisztenciát: napjainkban mintegy húszezer rezisztenciagén több, mint négyszáz típusát tartják számon (Liu és Pop, 2009). A *Staphylococcus aureus* baktérium ebből a szempontból talán klinikailag a legfontosabb kórokozónak tekinthető. A szulfonamidokkal szemben igen gyorsan ellenállóvá vált, de az 1950-es évektől kezdve penicillináz enzimet termelő törzseit is felfedezték (Saga és Yamaguchi, 2009). 1960-ban kifejlesztették a penicillináz-stabil meticillint, azonban a baktérium már egy évvel később, 1961-ben rezisztenssé vált vele szemben, és így kialakult a ma már széles körben ismert meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Jevons, 1961). Ez a baktérium pedig csupán egy példa a rengeteg rezisztens kórokozó közül: ma már találkozhatunk olyan baktériummal is, mely minden általunk ismert antibiotikummal szemben rezisztens. Például egy 2004-es kutatásban, melyben tüdőátültetésen átesett betegeket vizsgáltak, megállapították, hogy az ötvennégy betegből elhunyt tizenegy közül hat halálát pánrezisztens kórokozó okozta (Dobbin et al., 2004)

A fenti okok miatt tehát belátható, hogy az emberiség kénytelen új antimikrobiális hatású vegyületek kutatásába kezdeni. Munkánk célja is ehhez köthető, hiszen minél több információt szerzünk az antimikrobiális peptidok alapvető tulajdonságairól, annál nagyobb eséllyel alkalmazhatjuk őket a jövőben bakteriális megbetegedések gyógykezelése céljából.

Az antimikrobiális peptidok

Az AMP-k olyan kis méretű, kationos peptidok, melyek védő hatást fejtenek ki a különféle mikroorganizmusokkal szemben nemcsak a gerinces élőlények (köztük az ember), hanem a rovarok, a puhatestűek, a halak és a növények esetében is (Lehrer és Ganz, 1999). Annak ellenére, hogy a veleszületett immunrendszer részeként működnek és genetikailag igen hosszú időre vezethető vissza a létezésük, alig két évtizede fedezték fel termelődésüket állatokban (Hancock és Lehrer, 1998). Máig több, mint 1500 AMP molekula került leírásra, melyekről egy részletes összefoglaló adatbázis érhető el a <http://aps.unmc.edu/AP/main.php> weboldalon.

Felépítésük és általános jellemzésük

A kationos AMP-k olyan gének által kódolt fehérjék, melyek 12-50, legalább 50%-ban hidrofób aminosavból állnak, köztük nagy mennyiségű lizint és arginint tartalmaznak (Hancock és Lehrer, 1998). Felépítésük alapján léteznek diszulfid-hidakat tartalmazó béta-redők, amfipatikus alfa-hélixek, illetve ezek kombinációiból létrejött struktúrák egyaránt (Hancock és Scott, 2000).

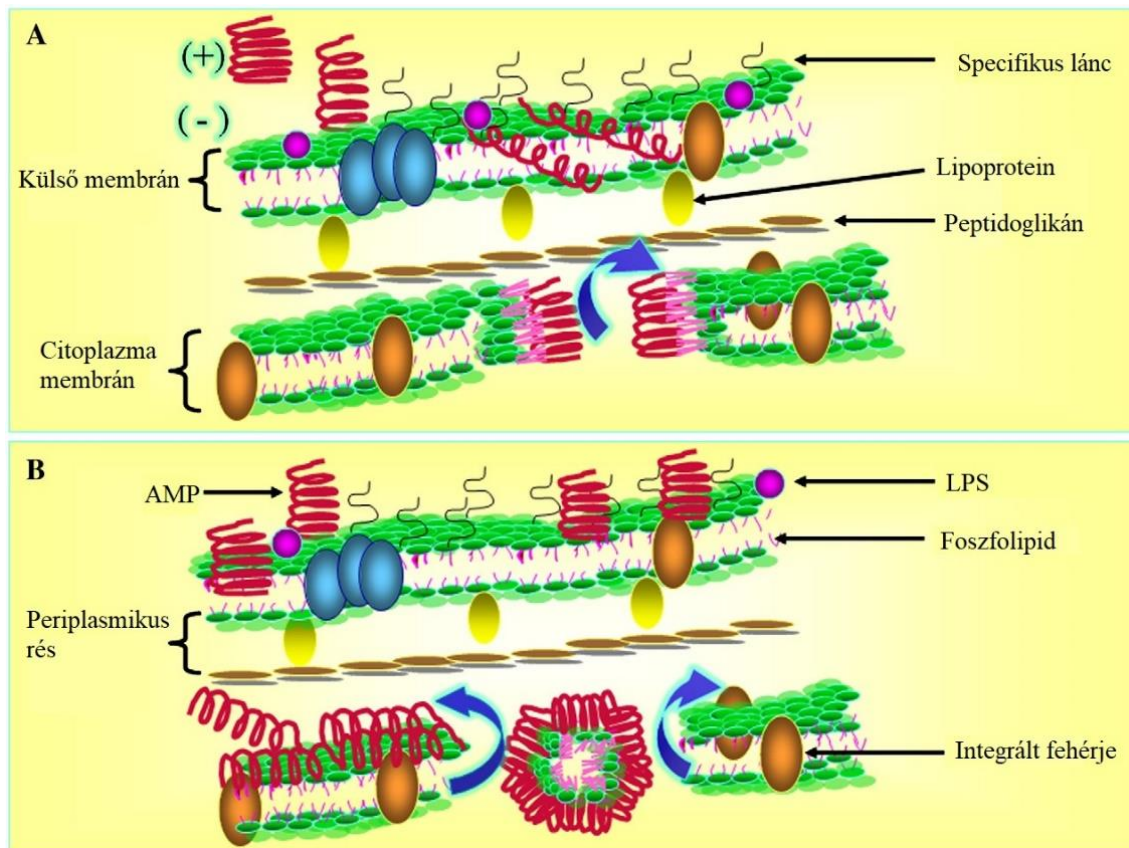
Az AMP-k rendkívül széles antimikrobiális spektrummal rendelkeznek: hatékonyak Gram-negatív és -pozitív baktériumok, gombák, paraziták, rákos sejtek, valamint burkos vírusok (mint például a humán immundeficiencia-vírus, a HIV is) ellen egyaránt. Természetesen nem mindegyik AMP rendelkezik az összes felsorolt tulajdonsággal, általában csak néhány mikroorganizmus ellen képesek hatásukat kifejteni (Hancock és Scott, 2000).

Legfőképp a külvilággal érintkező szövetekben termelődnek, úgymint a bőrben és a nyálkahártyákon, mivel a szervezet itt találkozik először a kórokozókkal. Ezen kívül megtalálhatóak még a csontvelőben és a here szövetében, valamint a fehérvérsejtekben egyaránt. A neutrofil granulociták granulumjaiban például ezek a legnagyobb arányban előforduló fehérjék (Hancock és Lehrer, 1998).

Elsőként antimikrobiális tulajdonságukat fedezték fel, de ma már ismert, hogy endotoxin-ellenes, immunmodulátor, gyulladáscsökkentő (Scott et al., 2000), valamint angiogenetikus hatással is rendelkeznek (Yang et al., 2002), továbbá szerepük van a sebgyógyulás gyorsításában is (Hancock és Lehrer, 1998).

Hatásmechanizmusuk

Az AMP-k antimikrobiális hatásukat több ponton, egy komplex rendszerben fejtik ki. A Gram-negatív baktériumok ellen kifejtett hatásuk ennek megfelelően összetett mechanizmuson alapul. Elsőként a peptidek önmagukat juttatják át a sejt falon: a tudomány mai állása szerint ennek kétféle módja létezik. Az első a „barrel stave”, vagyis „hordóléc”-modell írja le. Ennek során a fehérjék pozitív töltésüknél fogva a negatív töltésű sejt falhoz kötődnek, majd ezen átjutva pórust képeznek a sejt membrán hidrofób részébe ágyazódva. A másik lehetőség a „carpet model”, vagyis szőnyeg modell, amikor az AMP-k a negatív töltésű foszfolipidekhez kötődnek, így felbontják a lipid kettősréteg szerkezetét, ezáltal pórust képezve a külvilág felé (Guaní-Guerra et al., 2010). A kétféle folyamatot az 1. ábra szemlélteti.



1. ábra: Az antimikrobális peptidek sejtbe jutásának mechanizmusa (Guani-Guerra et al., 2010)
 A: „barrel stave” modell, B: „carpet” modell

A csatornák megváltoztatják a transzmembrán potenciált, és ez, valamint az általuk okozott permeabilitási zavar sok esetben elegendőnek bizonyul a baktérium elpusztítására. Azonban máskor, mivel a csatornák csak rövid ideig maradnak fenn (Wu et al., 1999), a rajtuk keresztül bejutott peptidek okoznak működési zavart a sejtben belüli polianionos molekulákhoz, például a DNS-hez kötődve (Zhang et al., 1999). Kiemelendő továbbá a kationos peptidek azon tulajdonsága is, mely által képesek potenciózni egyes antibiotikumok hatását, hiszen az általuk képzett csatornákkal segítik bejutásukat a baktériumok belsejébe (Hancock és Scott, 2000).

A fenti mechanizmus kevés lehetőséget ad AMP rezisztencia kialakulására a baktériumok számára. A PhoP/PhoQ rendszer (egyes baktériumok két elemből álló szabályozó rendszere) mutációja révén elérhető ugyan bizonyos fokú ellenállás, azonban ez is csak a minimális gátló koncentráció emelkedését vonja maga után, valódi rezisztencia kialakulására nem ad lehetőséget. Eredendően rezisztens kórokozókról is csak elvétve számol be a szakirodalom: ilyen például a *Burkholderia cepacia*, mely speciális, külső membránrétege segítségével védekezik az AMP-k ellen, valamint a *Proteus* és *Serratia* fajok, melyek proteáz enzimjeikkel képesek lebontani bizonyos

kationos peptideket (Hancock és Scott, 2000). Azonban a fenti baktériumok kórokozó képessége az állatok vagy az emberek számára elhanyagolható, így e kórokozók rezisztenciája nem jelent igazi problémát a gyógyászati célú felhasználás szempontjából.

Az AMP-k ezen kívül hatékony mechanizmussal rendelkeznek a bakteriális fertőzések következtében kialakuló endotoxin-sokk megelőzésében is. Képesek megkötni a Gram-negatív baktériumok falában található lipopoliszacharidokat, illetve a Gram-pozitív baktériumokban található lipoteikólsavat (továbbiakban LTA-t). Ezen kívül blokkolják az LPS kötődését az LPS-kötő proteinhez (LPS-binding protein, továbbiakban LBP), így megakadályozzák a makrofágok aktiválódását és ezáltal a káros, gyakran sokkos állapothoz vezető gyulladási folyamatok létrejöttét (Scott et al., 2000). Az LPS és az LTA szerepére a gyulladási folyamatokban, valamint az AMP-k ez ellen ható mechanizmusára a későbbiekben térek ki részletesebben.

Látható tehát, hogy az AMP-k több előnyös tulajdonsággal is rendelkeznek, mely megfelelő jelöltté teszi őket az antibiotikumok helyettesítésére irányuló kutatásokban. Széles antimikrobiális spektrummal rendelkeznek, az ellenük kialakuló rezisztencia csekély, gyorsan képesek elpusztítani a patogén mikrobákat, valamint szinergizmust mutatnak több ismert antibiotikummal is.

Endotoxin-ellenes hatásuk részletes ismertetése

Ismert, hogy a szervezetre nem csak az élő, szaporodó baktériumok, hanem a belőlük felszabaduló sejtalkomponensek is képesek káros hatást kifejteni. Ezek a molekulák a baktériumok elpusztulásakor és szétesésekor szabadulnak fel, amely jelenség nagyobb arányban fordul elő például antibiotikus kezelést követően. Ekkor a szervezet súlyosan károsodhat a gyulladási folyamatok következményeként, így belátható, hogy az antibiotikumok használata közel sem jelent tökéletes megoldást a bakteriális fertőzések kezelésében.

Ma már jól ismertek a Gram-negatív baktériumok sejtfalát alkotó, gyulladáskeltő hatással rendelkező anyagok, az LPS-ek, melyeket endotoxinoknak is nevezünk. Ezen kívül fontos megemlíteni a Gram-pozitív baktériumok sejtfalát alkotó LTA-t is, amely talán kevésbé ismert, de az LPS-hez nagyon hasonló mechanizmuson keresztül aktiválja az immunrendszer sejtjeit (Heumann et al., 1994). A szervezet rendkívül érzékeny mechanizmussal rendelkezik az LPS felismerésére: emberekben már nanogrammos mennyiség bejuttatása is szeptikus sokk tüneteit válthatja ki (Michie et al., 1988).

Az LPS először a májban termelődő LBP-hez kapcsolódik, majd ehhez kötődve jut el a véráramon keresztül a különböző sejtek, például monociták és makrofágok felületén található CD14 receptorokhoz. Ez a kötődés utána egy intracelluláris jelátviteli folyamatot indít el a Toll-like receptorokon (TLR) keresztül az immunsejtekben, mely végül gyulladáscsökkentő citokinek (például interleukin-6 és tumor nekrozis faktor- α , vagyis TNF- α) termelődéséhez vezet (Ulevitch és Tobias, 1999). Az LTA szintén a CD14-en és a TLR-eken keresztül képes aktiválni a makrofágokat (Heumann et al., 1998).

Az AMP-k a már korábban említett módon képesek kötődni az LPS-hez, azon folyamat részeként, mely a sejtbe jutásukat is elősegíti. Bebizonyították, hogy egyes AMP-k kifejezett affinitással rendelkeznek az LPS-ek irányába (Scott et al., 1999).

Ezen kívül kimutatták, hogy a kationos AMP-k szerkezetüktől függetlenül képesek blokkolni az LPS kötődését az LBP-hez. Ezáltal megakadályozzák az LPS kötődését a CD14 receptorhoz, és gátolják a szervezet számára káros reakciókhoz vezető gyulladáscsökkentő citokinek termelődését. Kutatások bizonyították, hogy állati eredetű AMP-k csökkenteni képesek LPS-sel kezelt, egér eredetű makrofág sejtvonal (RAW 264.7) TNF- α és IL-6 termelését (Scott et al., 2000).

Az AMP-k affinitása az LTA iránt jóval kisebb, mint az LPS irányába, de a Gram-pozitív baktériumok ellen kifejtett hatásuk nem áll korrelációban ezen affinitás mértékével. Kimutatták, hogy az AMP-k szignifikánsan csökkentik az LTA-val kezelt egér eredetű makrofág sejtvonal (RAW 264.7) TNF- α és IL-6 termelését is (Hancock and Scott, 2000).

A szervezet számára rendkívüli fontossággal bír a máj védekező képessége Gram-negatív baktériumok ellen. Ezek főként a bélrendszerből felszívódva, a portális keringésen keresztül érik el a májat, azonban más bemeneti kapun keresztül is eljuthatnak a szervhez. Kimutatták, hogy az egészséges állatok számára intravénásan adagolt LPS nagy része percekben belül eltűnt a keringésből, és a májban akkumulálódott (Mathison és Ulevitch, 1979). A májba jutott LPS szintén az LBP-hez kötődik: ez szállítja a májban fellelhető speciális makrofágok, a Kupffer-sejtek felületén található CD14-receptorhoz. Ezen keresztül a TLR-4 aktiválja az immunsejtek citokin-termelését, valamint reaktív oxigén-gyökök képződését. Ezen folyamatok súlyos májkárosodáshoz vezethetnek, mely a szervezet számára végzetes következményekkel járhat (Su, 2002).

Összességében az AMP-k nem csupán antibakteriális, de gyulladáscsökkentő hatásuk miatt is potenciális jelöltté válhatnak a bakteriális fertőzések kezelésében. Antibiotikumokkal együtt alkalmazva nem csupán potenciózzák azok hatását, de a

széteső baktériumok sejtfalából felszabaduló sejtfolkomponensek által kiváltott gyulladási folyamatok kialakulását is képesek megakadályozni. Ezek alapján sokkal komplexebb védelmi rendszert nyújthatnak mind az emberek, mind az állatok számára, mint az önállóan alkalmazott antibiotikumok.

Antibiotikum-rezisztencia a baromfitartás területén

Napjaink élelmiszeriparában a baromfitartásnak kiemelkedő szerep jut. A legnagyobb számban tenyésztett haszonállat a csirke: a világon több, mint 90 millió tonna csirkehúst termelnek évente (Agyare et al., 2018), Magyarország baromfihús exportja pedig 2018-ban 139 ezer tonna volt (Vadkerti-Tóth, 2018).

A baromfiágazat jelentős mértékben használ antibiotikumokat, melyek egy része a humán orvoslás számára is nagy jelentőséggel bír. Ezek előírásoktól eltérő és túlzó használata az egyre nagyobb léptéket öltő antibiotikum-rezisztencia gyors terjedéséhez vezetett, és bár egyre több szabályozást dolgoztak ki ezek mérséklésére, úgy tűnik, az igyekezetek nem bizonyulnak elegendőnek. A ma termelt antibiotikumok mintegy 60 %-a a haszonállattartásban kerül felhasználásra (Van Boeckel et al., 2015).

Az antibiotikumok hatástalanná válása egyrészt hatalmas gazdasági károkhoz vezethet, hiszen a baromfitartók képtelenné válnának állataik bakteriális fertőzésekkel szembeni védelmére, másrészt az állatok rezisztens kórokozói az emberekbe kerülve átvihetik rezisztencia-génjeiket humán patogén baktériumokra. Ez megtörténhet a teljes lakosságot tekintve a kereskedelembe kerülő nyers termékeken keresztül, vagy a baromfival érintkező dolgozók rezisztens baktériumokkal történő fertőződése révén (Agyare et al., 2018).

Látható tehát, hogy mind gazdasági, mind humán egészségügyi szempontból rendkívüli fontossággal bír új, az antibiotikumok helyettesítésére használható vegyületek kutatása. Eddigi eredmények alapján megfelelő jelöltnek tűnnek az AMP-k, jelen munkánkban közülük a CHP-1-et vizsgáltuk.

Chicken heterophil peptide-1 (CHP-1)

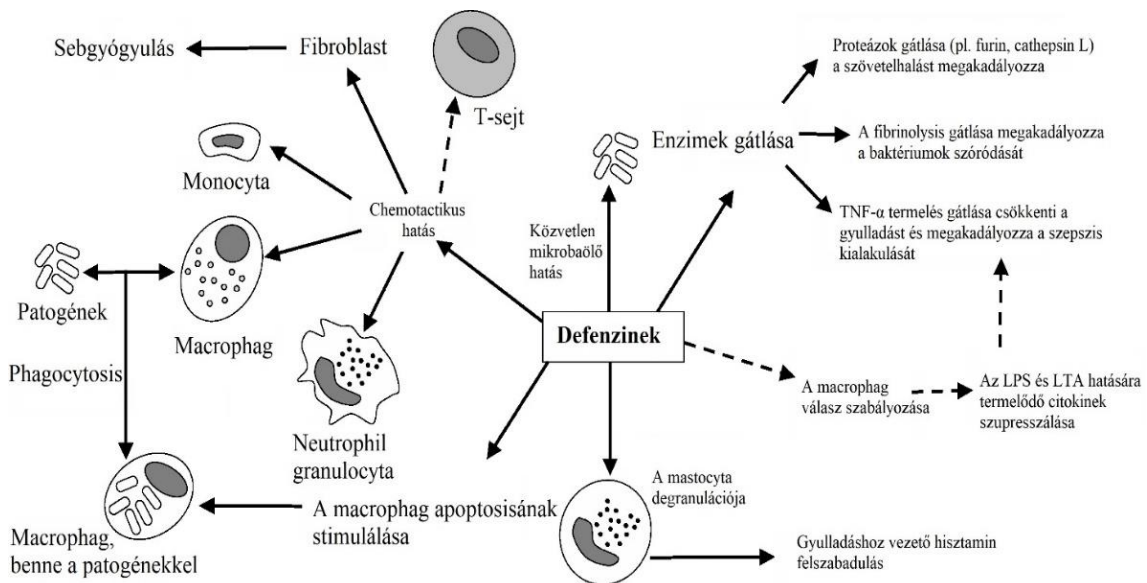
Az általunk vizsgált antimikrobiális hatású peptid, a CHP-1 a csirkék heterofil granulocitáiban termelődik. A heterofil granulociták olyan polimorfonukleáris makrofágok, melyek a madarakban feladatukat tekintve megfelelnek az emlősök neutrofil granulocitáinak. A gyulladás akut, exsudatív fázisában elsődleges szerepük van, elsőként

akkumulálódnak a gyulladás helyszínén. Ezen kívül az LPS is kemotaktikus hatással van rájuk (Harmon, 1998).

A heterofil granulociták által kiváltott gyulladásos reakció a sérülés helyén sokban különbözik az emlősök neutrofil granulociták által vezérelt reakciójától. Madarakban jellemző a heterofil granulomák képződése, mely során a nekrotizált heterofilok összegyűlve sajtos jellegű gyulladást alakítanak ki, és epitheloid makrofágok valamint rostos kötőszövet által határolódnak el a környezettől (Montali, 1988). Különlegességük, hogy hiányzik belőlük a mieloperoxidáz rendszer, tehát nem képesek oxidatív szabadgyököket felszabadítani a fagocitózis során. Épp ezért kiemelt jelentőségük van a bennük fellelhető egyéb védekező rendszereknek – mint például a granulumjaikban található AMP-knek, ahogy a CHP-1-nek is (Evans et al., 1995).

Az általunk vizsgált CHP-1-et a defenzinek, ezen belül a β -defenzinek közé soroljuk, melyek ciszteinben gazdag, β -redőzött felépítésű molekulák. Hat ciszteint tartalmaznak, melyek három pár diszulfid-hidat alkotnak (Sugiarto és Yu, 2004).

Antimikrobiális spektrumuk széles: Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok, valamint protozoonok, néhány gombafaj és burkos vírusok, például a HIV ellen is hatékonyak (Sugiarto és Yu, 2004). Effektívnek bizonyultak *Candida albicans*, *Salmonella* Enteritidis, *Campylobacter jejuni*, *Bordetella avium*, *Escherichia coli* és *Salmonella* Typhimurium ellen egyaránt (Evans et al., 1995). A defenzinek további hatásmechanizmusát a 2. ábra szemlélteti.



2. ábra: A defenzinek hatásmechanizmusa (Sugiarto és Yu, 2004)

Célkitűzés

Napjainkban mind a humán-, mind az állatgyógyászat területén egyre nagyobb problémát jelent a fokozott mértékben terjedő antibiotikum-rezisztencia. Nem kivétel ez alól a jelenleg legnagyobb számban tartott haszonállat, a csirke sem, mely állatfajra az antibiotikum-rezisztencia többrétű veszélyforrást jelent. Egyrészt, hatalmas gazdasági károkkal járhat, ha a különféle patogén baktériumok rezisztenssé válnak az általunk ismert antibiotikumokkal szemben, másrészt különös veszélyt jelent a rezisztencia gének átjutása humán patogén kórokozókba a baromfihús, tojás, vagy a gondozók állatokkal való kontaktusa által. Mindezek alapján belátható, hogy többek között a baromfitartás területén is egyre lényegesebbé válik az antibiotikum-felhasználás csökkentése, valamint olyan gyógyszerek kutatása, melyek a jövőben részben vagy egészben helyettesíthetik az antibiotikumokat.

Erre a célra lehetséges alternatívát jelenthetnek az AMP-k, melyek bizonyított mikrobaellenes hatásuk mellett ígéretesek lehetnek a gyulladási folyamatok, köztük az LPS és LTA által kiváltott szeptikus sokk megelőzésében és kezelésében egyaránt.

Munkánk során a CHP-1 gyulladáscsökkentő tulajdonságait kívántuk vizsgálni csirke eredetű májsejttenyészeteken. Kísérletünk során arra kérdésre igyekeztünk választ találni, hogy a CHP-1 hogyan befolyásolja a gyulladási folyamatokat csirke eredetű primer májsejt monokultúrákon, illetve 2:1 arányú májsejt – nem parenchymális sejt kultúrákon. Ez utóbbi sejtaránnyal a májban zajló, súlyos fokú gyulladási állapotra jellemző sejtösszetételt kívántuk modellezni. A kutatómunka keretében 1, 10 és 50 µg/ml koncentrációban alkalmazott LPS-sel váltottunk ki gyulladási folyamatot, melyet CHP-1 0,5 és 5 µg/ml koncentrációban történő felhasználásával igyekeztünk mérsékelni. A sejtek metabolikus aktivitását CCK-8 teszttel, az oxidatív stressz mértékét Amplex Red módszerrel, illetve az IL-6 szintet csirke specifikus szendvics ELISA-val határoztuk meg.

Reményeink szerint kutatásunk alapvető információkkal szolgálhat a CHP-1 *in vitro* hatásairól, és elősegítheti a jövőbeli, állatgyógyászati felhasználására irányuló törekvéseket.

Anyag és módszer

Sejtmodellek létrehozása

A sejtek izolálása

Munkánk során a sejtmodellek létrehozásához egy 3 hetes, hímváru, Ross-308 típusú hibrid brojlercsirkét használtunk fel. A sejtizolálás az állat megérkezését követően azonnal megtörtént, így az Állatorvostudományi Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának álláspontja szerint külön állatvédelmi engedélyre nem volt szükség.

A továbbiakban felhasznált azon vegyszereket, ahol a gyártó nincs feltüntetve, a Sigma-Aldrich vállalattól (St. Louis, Missouri, Egyesült Államok) szereztük be.

Az állatot először szén-dioxid segítségével bódítottuk, majd ezt követően dekapitáltuk, kivéztettük és az előkészített asztalon hátfekvésben rögzítettük. A hasi tollazatot eltávolítottuk, majd a hasüreget a bőr etanollal történő fertőtlenítése után tompa fejtéssel megnyitottuk. Ezt követően a *vena gastropancreaticoduodenalis*-on keresztül kanuláltuk a portális rendszert 22G méretű vénakanul felhasználásával. Ezen keresztül vezettük a perfúziós folyadékokat a májba 30 ml/perc áramlási sebességgel. Mindeközben a szívbe, a jobb pitvaron ejtett bemetszésen át egy üvegkanul vezetünk a perfúziós rendszer elfolyó ágának kialakítására, melynek segítségével a későbbiekben a kollagenáz tartalmú oldattal történő perfúziós lépés során megvalósítható az oldat gyűjtése és ismételt felhasználása.

Az *in situ* perfúzió során háromlépcsős rendszert alkalmaztunk. Ez előtt a sejtek izolálásához használt valamennyi oldatot 40°C hőmérsékletre melegítettük, valamint közvetlenül felhasználás előtt Carbogennel (összetétel: 95% O₂, 5% CO₂; 1 l/perc áramlási sebesség) buborékolattuk át. A folyamat harmadik lépése során az újra felhasznált kollagenáz oldat hőmérsékletét folyamatosan ellenőriztük, és végig 40°C-on tartottuk.

A perfúzió során felhasznált oldataink a következők voltak:

1. 150 ml EGTA-tartalmú (0,5 mmol/l) HANKS-puffer
2. 150 ml HANKS-puffer
3. 100 ml HANKS-puffer: 100 mg IV. típusú kollagenáz (Serva, Duisburg, Németország), 7 mmol/l CaCl₂, 7 mmol/l MgCl₂ kiegészítéssel

A HANKS-puffer elkészítése során a HANKS törzsoldatot tízszeresére hígítottuk steril desztillált vízzel, majd 4,7 ml 7,5 %-os NaHCO_3 oldatot adtunk hozzá 1000 ml hígított pufferhez.

Az EGTA-tartalmú HANKS-puffer összeállítása során 150 ml HANKS-pufferhez annyi EGTA-t adtunk hozzá, hogy a végkoncentráció 0,5 mmol/l legyen. Az EGTA egy magnézium- és kalciumionokra specifikus kelátképző anyag, ami az utóbbiak megkötésével elősegíti a sejtkapcsolatok fellazítását, ezáltal könnyebbé téve a szövet szétesését és a sejtek izolálását.

Első lépésként a máj átmosását és vértelenítését végeztük el EGTA-tartalmú HANKS-puffer segítségével. Következőként a máj állományát EGTA-mentes HANKS-pufferrel is átmostuk, mivel az utolsó lépésben használt kollagenázoldat csak magnézium- és kalciumionok jelenlétében képes kifejteni a hatását, s ezeket az EGTA megkötötte. A harmadik lépésben használt kollagenáz enzimet tartalmazó oldat feladata a sejtek közötti extracelluláris mátrix bontása. A kollagenázzal történő emésztést addig folytattuk, ameddig a májon meg nem jelent a jellegzetes, a parenchyma szétesését jelző márványszerű rajzolat.

Ezt követően a májat kiemeltük és steril főzőpohárba helyeztük, a további munkafolyamatokat pedig jégen végeztük, steril fülke alatt. Felnyitottuk a Glisson-tokot, majd a májat 50 ml bovine serum albuminnal (BSA, 2,5%) kiegészített, előzetesen Carbogennel átbuborékolgatott HANKS-pufferben szuszpendáltuk. A kapott sejtszuspenziót háromrétegű steril gézlapon szűrtük át a sejtaggregátumok és az emésztetlenül maradt interstitium eltávolítása végett, majd a BSA-tartalmú HANKS-pufferben 45 percig jégben állni hagytuk. Ez utóbbi lépés célja a sejtek elkülönülésének támogatása és összecsapódásuknak meggátolása volt.

A sejtszuspenzióból háromlépéses centrifugálás segítségével végeztük el a májsejteket tartalmazó frakció izolálását. Első lépésként a BSA-val kiegészített HANKS-pufferben, 100 g gyorsulási értéken, 3 percig centrifugáltuk a sejtszuspenziót. A kapott felülúszót (minden lépés során) steril edényben gyűjtöttük össze, a kapott üledéket Williams' Medium E tápfolyadékban reszuspendáltuk, majd ismét 100 g-n, 3 percen át centrifugáltuk. A harmadik lépés során a kapott üledéket újfent Williams' Medium E-ben reszuspendáltuk és az első két lépésben ismertetett módon centrifugáltuk, így végül 20 ml hepatocitákban gazdag sejtszuspenziót kaptunk.

Ezt követte a sejtek életképességének vizsgálata, melyet Bürker-kamrában, tripánkékes festéssel végeztünk. Ennek során 200 μl tömény sejtszuspenzióhoz 800 μl

Williams' Medium E-t adtunk, majd az így kapott hígított szuszpenzió 200 µl-éhez adtunk hozzá 200 µl tripánkéket. Ez a festék csak a károsodott sejtfalon képes átjutni, ennek alapján a késsel festődött sejteket életképtelennek, a nem festődötteket életképesnek ítéltük meg. A sejtszuszenziót akkor tekintettük alkalmasnak a sejttenyészet kialakítására, ha abban az élő sejtek aránya meghaladta a 90 %-ot. Amennyiben az életképességet megfelelőnek ítéltük, a tömény sejtszuszenziót 10^6 sejt/ml koncentrációra állítottuk be, valamint a ko-kultúra kialakításához a hepatocita szuszpenziót tovább hígítottuk.

Ez után a nem-parenchymalis sejtek, azaz túlnyomórészt Kupffer-sejtek izolálása következett differenciáló centrifugálás segítségével. Ezt a műveletet a hepatociták tisztítása során kapott felülúszóból végeztük. Ennek során az említett felülúszókat először 350 g-n, 10 percig, majd az így kapott új felülúszókat tiszta centrifugacsőbe átöntve 800 g-n újabb 10 percig centrifugáltuk. A második centrifugálást követően kapott üledéket 5 ml Williams' Medium E-ben reszuszpendáltuk. Ez után ebben az esetben is vizsgáltuk a sejtek életképességét tripánkékes festés segítségével, Bürker-kamrában, a hepatocitáknál ismertetett módon. Egyetlen különbség adódott, hogy az alacsonyabb sejtszám miatt ebből a sejtszuszenzióból 200 µl-t mértünk be 200 µl Williams Medium E-be. Amennyiben a sejtek életképességét megfelelőnek találtuk, a tömény sejtszuszenziót szintén 10^6 sejt/ml koncentrációra állítottuk be, majd a ko-kultúra elkészítéséhez tovább hígítottuk.

Sejtek lerakása és inkubálása

A sejtek lerakását kétféle, előzetesen I-es típusú kollagénnel bevont, 6- és 96-lyukú tenyésztőedényen (Greiner Bio-One, Mosonmagyaróvár, Magyarország) végeztük. A kétféle sejtípust felhasználva az összes sejtszám tekintetében megegyező, a felhasznált sejtek arányában különböző sejttenyészeteket alakítottunk ki. Egyrészt létrehoztunk a májsejt-szuszenzióból monokultúrákat, ezen felül kombinációjukból 2:1 arányú májsejt:nem-parenchymalis sejt ko-kultúrákat alakítottunk ki.

Az említett ko-kultúrák létrehozása során először a nem-parenchymalis sejtek kerültek lerakásra, melyek 20 perc alatt kitapadtak a tenyésztőedényekre, majd ezt követően leszívtuk a tápfolyadékot és rámértük a lyukakra a ko-kultúrák kialakítása céljából létrehozott hepatocita sejtszuszenziót.

A kialakított sejttenyészeteket steril termosztátban, 5 % CO₂ és közel 100% relatív páratartalom mellett, 37 °C-on inkubáltuk. A tápfolyadékot a sejtek lerakását követő 4. órában cseréltük először, majd ezután 24 órán át inkubáltuk őket, melynek végére tenyészeink összefüggővé váltak.

A sejtek izolálása és inkubálása során használt tápfolyadék összetétele a következő volt:

- Williams' Medium E, kiegészítve:
 - 0,22 % NaHCO₃
 - 50 mg/l gentamicin
 - 2 mmol/l glutamin
 - 5 % foetal bovine serum (FBS, csak az első 24 órában tartalmazta a tápfolyadék)
 - 4 µg/l dexametazon
 - 20 NE/l inzulin

Sejtek kezelése

A 24 órás inkubációs idő letelte után megkezdtük a sejttenyészetek kezelését. A gyulladós állapot kialakítása céljából *Salmonella enterica ssp. enterica ser. Typhimurium* eredetű LPS-sel kezeltük a sejt kultúrákat, melynek köszönhetően modellezni tudtuk a Gram-negatív baktériumok sejt felszámazékainak sejtekre gyakorolt károsító hatását. A mono- és ko-kultúrák tápfolyadékait 0, 1, 10, és 50 µg/ml koncentrációra egészítettük ki az említett gyulladáskeltő ágenssel.

A gyulladós folyamatok mérséklése érdekében az LPS-tartalmú tápfolyadékokat CHP-1-el (MyBioSource, San Diego, USA) 0, 0,5 és 5 µg/ml koncentrációra egészítettük ki.

A kiegészített tápfolyadékokat minden esetben három párhuzamos sejttenyészetre mértük rá, majd 8 órán keresztül inkubáltuk őket. Az inkubációs idő letelte után a 6-lyukú lemezekon kialakított sejttenyészetek tápfolyadékából mintákat vettünk, majd azokat feldolgozásukig -80°C-on tároltuk. A 6- és 96-lyukú tenyésztőedényeken maradt sejteket először Phosphate Buffered Saline (PBS) felhasználásával átmostuk, majd M-PER lizáló reagenst mértünk rájuk, mellyel 5 percig rázogattuk az edényeket. A lizált sejtek fehérjekoncentrációját Pierce-féle BCA módszerrel (Pierce™ BCA Protein Assay Kit,

Thermo Scientific, Waltham, USA) felhasználásával határoztuk meg. Erre azért volt szükség, mert a későbbi mérések eredményeit a lizált sejtek fehérjekoncentrációjára standardizáltuk, ezzel igyekeztünk elkerülni, hogy az egyes sejttenyészetek esetlegesen eltérő sejtszáma befolyásolja eredményeinket.

Mérések

A sejtek metabolikus aktivitásának vizsgálata

A sejtek metabolikus aktivitásának vizsgálatát Cell Counting Kit-8 (CCK-8) teszttel végeztük. Ennek alapja, hogy a metabolikusan aktív sejtek által termelt redukált koenzimekről származó hidrogén felvételével a reagensben található WST-8 színeképző anyag narancssárga WST-8-formazánná alakul át. Esetünkben ennek a vizsgálatnak az eredményét nem a sejtszám változásával azonosítottuk, hanem a metabolikus aktivitás mértékével, mivel tenyészeinket mivel rövid inkubációs időnk alatt a sejtosztódás mértéke elhanyagolható.

A vizsgálat során a mintavételezést követően a 96-lyukú lemezekre 100 µl friss tápfolyadékot mértünk lyukanként, melyekhez hozzáadtunk 10 µl CCK-8 reagenst. Két óra 37°C hőmérsékleten történő inkubáció után, 450 nm hullámhosszon olvastuk le az abszorbancia értékeket Multiskan GO 3.2 leolvasó segítségével.

A H₂O₂ szint mérése

A tápfolyadékban levő H₂O₂ mennyiségének meghatározását a kezelt sejttenyészetekről leszívott sejtmentes tápfolyadékból Amplex Red módszerrel végeztük el. Ennek lényege, hogy a reagensben található tormaperoxidáz enzim hatására a sejtek által termelt hidrogén-peroxiddal azonos mennyiségű fluoreszcens rezorufin képződik, melynek fluoreszcencia-intenzitása 585 nm hullámhosszon mérhető. A reakcióhoz Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit-et használtunk, melyet a Thermo Fisher-től (Waltham, USA) szereztünk be.

A méréshez felhasznált oldatokat a gyártó utasításai szerint készítettük el, majd 96 lyukú lemezen végeztük a vizsgálatot. Először bemértünk 50-50 µl-t a mintákból, a standard és a kontroll oldatokból is, majd ráértünk 50-50 µl-t a gyártó utasításait követve, frissen elkészített Amplex Red reagensből. Ezt követően 30 percig,

szobahőmérsékleten, fénytől védett helyen inkubáltuk a lemezt. Az inkubációs idő letelte után a Gyógyszertani és Méregtani Tanszéken található Victor X2 Multilabel Plate Reader segítségével olvastuk le a fluoreszcencia értékeket. Beállításainkban az excitációs maximum 570 nm, az emissziós maximum pedig 585 nm volt.

Az interleukin-6 koncentráció mérése

Az IL-6 koncentrációjának meghatározását a kezelt sejttenyészetekről leszívott sejtmentes tápfolyadékokból csirke specifikus szendvics ELISA módszer segítségével határoztuk meg.

A szendvics ELISA előnye a direkt ELISA-val szemben, hogy kétféle ellenanyag is részt vesz a reakcióban, és mindkettő specifikus a keresett antigénre, így érzékenyebb módszernek tekinthető. Az első ellenanyag a lemezhez kötött, ehhez kapcsolódik hozzá a keresett antigén, a második ellenanyag pedig a rögzült antigénhez kötődik, és enzimmel jelölt (például alkalikus-foszfátázzal vagy esetünkben tormaperoxidázzal). Az enzim szubsztrátját utolsó lépésként adjuk hozzá a rendszerhez, melynek eredményeként spektrofotométerrel kvantifikálható színreakció játszódik le. A létrejött szín intenzitása egyenesen arányos az oldatban lévő antigén mennyiségével (Varga et al., 2018).

Mérésünkhöz Chicken Interleukin-6 (IL-6) ELISA Kitet használtunk, melyet a MyBioSource cégtől (San Diego, USA) szereztünk be. A mérés során felhasznált oldatokat és reagenseket a gyártó utasításainak megfelelően készítettük el. Ezt követően 96-lyukú lemezre mértük a mintákat és a standardekert, egy lyukba 100 µl összterfogot került. Majd 90 perces inkubáció következett 37 °C-on.

Az IL-6 ellenanyagot 30 perccel a használat előtt 1:100 arányban hígítottuk. Ez után a lyukakat az inkubációs idő letelte után kétszer mostuk a mosó pufferrel, majd ráértük az IL-6 ellenanyagot (100 µl/lyuk) és 37 °C-on 60 percig inkubáltuk.

Az enzim-konjugátumot (amely tormaperoxidázt tartalmaz) szintén 1:100 arányban hígítottuk 30 perccel a használatot megelőzően. Az inkubációs idő letelte után a lyukakat háromszor mostuk a mosó pufferrel, majd bemértük az enzim-konjugátumot. Ez után újabb inkubálás következett 37 °C-on 30 percig. Ennek letelte után a lyukakat ötször mostuk, aztán hozzáadtuk a színreagenst.

Végül ismételt inkubáció következett, mely során többször ellenőriztük a kialakult színreakciót, és a színgradiens feltűnésekor leállítottuk a reakciót a reakciót leállító,

kénsavtartalmú oldat hozzáadásával. Az abszorbanciát 450 nm-en olvastuk le, a reakció leállítása után közvetlenül.

Statisztika

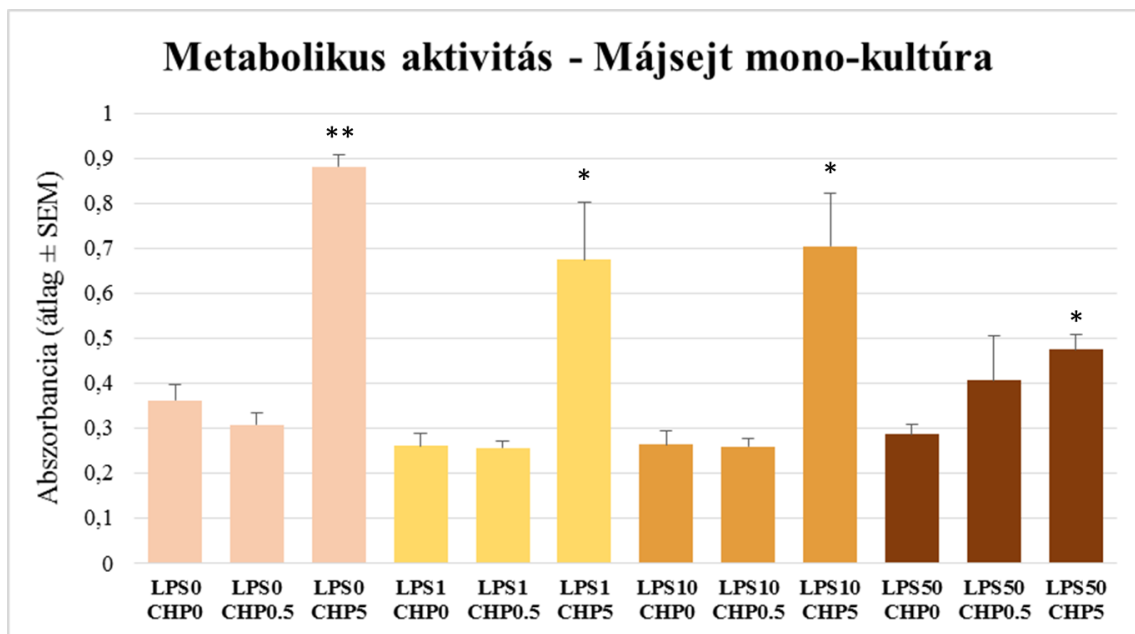
A kapott eredmények kiértékeléséhez az R 3.6.1 statisztikai szoftvert használtuk. A kontroll és a kezelt csoportok összehasonlításához egy-utas ANOVA tesztet használtunk. Szignifikáns különbséget állapítottunk meg, amennyiben $P < 0,05$; valamint minden eredményt átlag \pm standard hiba alakban fejeztünk ki. A CHP-1 hatását mindig adott LPS kezelés függvényében vizsgáltuk, azaz a CHP-1-el kezelt sejteket az adott LPS koncentráció CHP-1 mentes kontrolljához viszonyítottuk.

Eredmények

Sejttenyészetek kezelését a következőféleképpen hajtottuk végre: az LPS-t 1, 10 és 50 µg/ml, a CHP-1-et pedig 0,5 és 5 µg/ml koncentrációban alkalmaztuk. Ezeket a koncentrációkat minden lehetséges módon kombináltuk egymással és az így kiegészített tápfolyadékokkal kezeltük a májsejt mono-kultúrákat, valamint a májsejt – nem-parechymalis sejt ko-kultúrákat is.

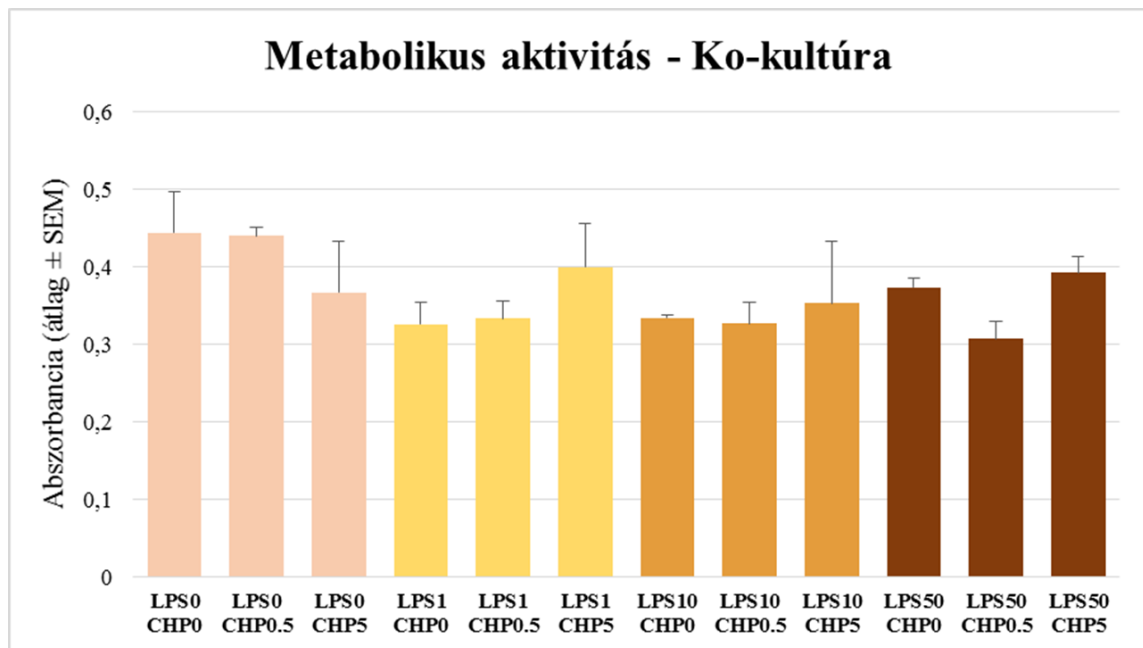
A CCK-8 teszt eredményei

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy májsejt mono-kultúrák esetében a 0,5 µg/ml koncentrációjú CHP-1 kezelés nem tudta szignifikánsan befolyásolni a sejtek metabolikus aktivitását egyik LPS kezelés során sem, a CHP-1-gyel nem kezelt kontrollokhöz képest. Ezzel szemben az 5 µg/ml koncentrációjú CHP-1 kezelést követően szignifikánsan ($P < 0,05$) emelkedett a sejtek metabolikus aktivitása minden LPS kezelés esetében, a CHP-1-el nem kezelt kontrollokhöz képest. Az eredményeket a 3. ábra szemlélteti.



3. ábra: A metabolikus aktivitás mértékének változása csirke eredetű májsejt mono-kultúrán LPS (lipopoliszacharid) és CHP-1 (chicken heterophil peptide-1) kezelések hatására
LPS0 = 0 µg/ml, LPS1 = 1 µg/ml, LPS10 = 10 µg/ml, LPS50 = 50 µg/ml. CHP0 = 0 µg/ml, CHP0,5 = 0,5 µg/ml, CHP5 = 5 µg/ml.
* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$

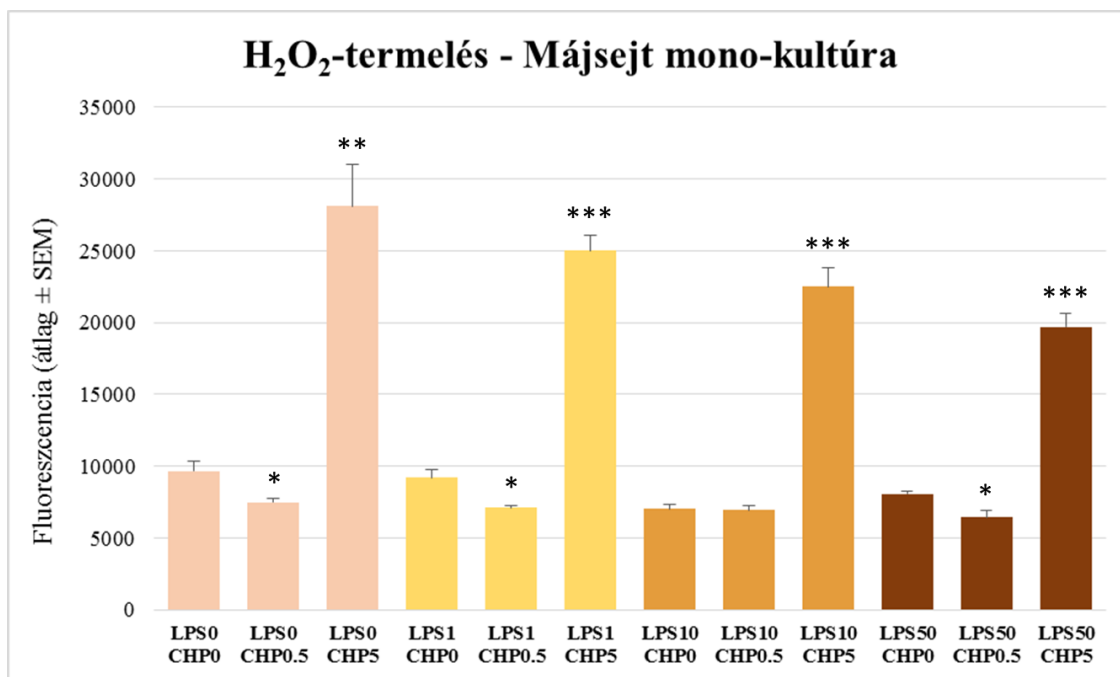
A májsejt – nem-parenchymalis sejt ko-kultúrák esetében sem a 0,5 µg/ml, sem az 5 µg/ml CHP-1 kezelés nem tudta szignifikánsan befolyásolni a sejtek metabolikus aktivitását egyik LPS-koncentráció esetében sem a CHP-1-gyel nem kezelt kontrollokhöz képest (4. ábra).



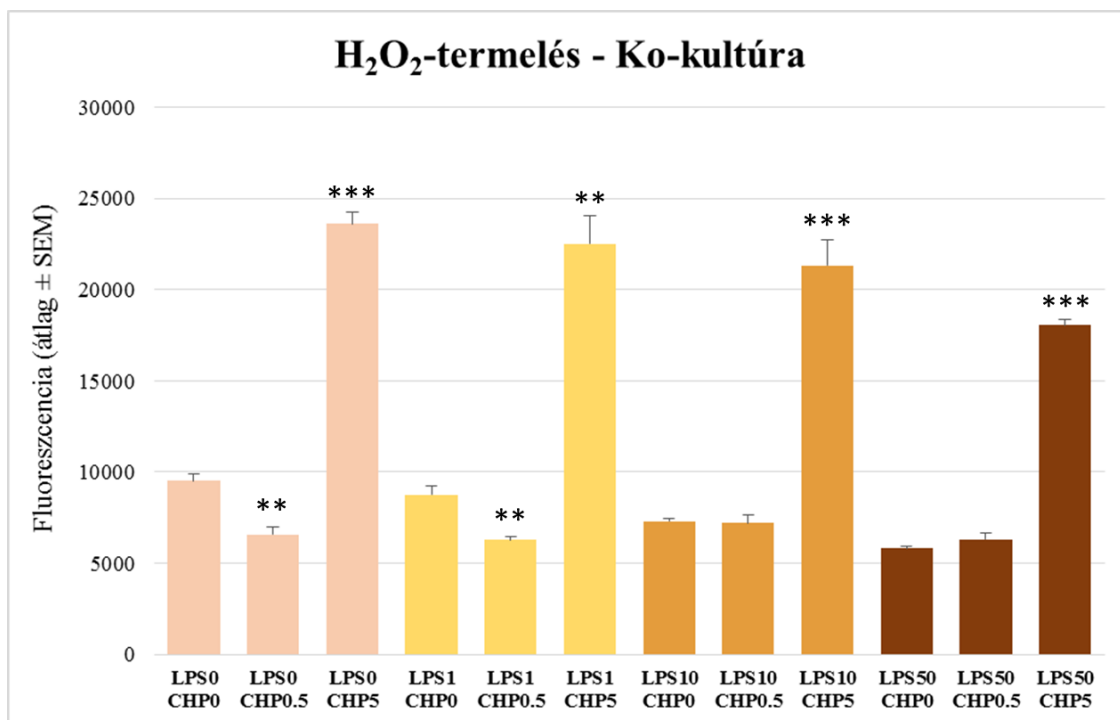
4. ábra: A metabolikus aktivitás mértékének változása csirke eredetű májsejt-nem parenchymális sejt ko-kultúrán LPS (lipopoliszacharid) és CHP-1 (chicken heterophil peptide-1) kezelések hatására LPS0 = 0 µg/ml, LPS1 = 1 µg/ml, LPS10 = 10 µg/ml, LPS50 = 50 µg/ml. CHP0 = 0 µg/ml, CHP0,5 = 0,5 µg/ml, CHP5 = 5 µg/ml.

Az Amplex Red teszt eredményei

Eredményeink alapján azt tapasztaltuk, hogy mind a májsejt monokultúrákon, mind a májsejt – nem-parenchymalis sejt ko-kultúrákon a sejtek H₂O₂-termelése szignifikánsan (P<0,05) csökkent a 0,5 µg/ml koncentrációjú CHP-1 kezelést követően 0 és 1 µg/ml LPS koncentráció, továbbá a mono-kultúrákban 50 µg/ml LPS koncentráció esetében. Ezzel szemben a tápfolyadék H₂O₂-koncentrációja szignifikánsan (P<0,05) nőtt az 5 µg/ml koncentrációjú CHP-1 kezelést követően minden LPS-koncentráció mellett a CHP-1-gyel nem kezelt kontrollokhöz képest. Az eredményeket az 5. és a 6. ábra szemlélteti.



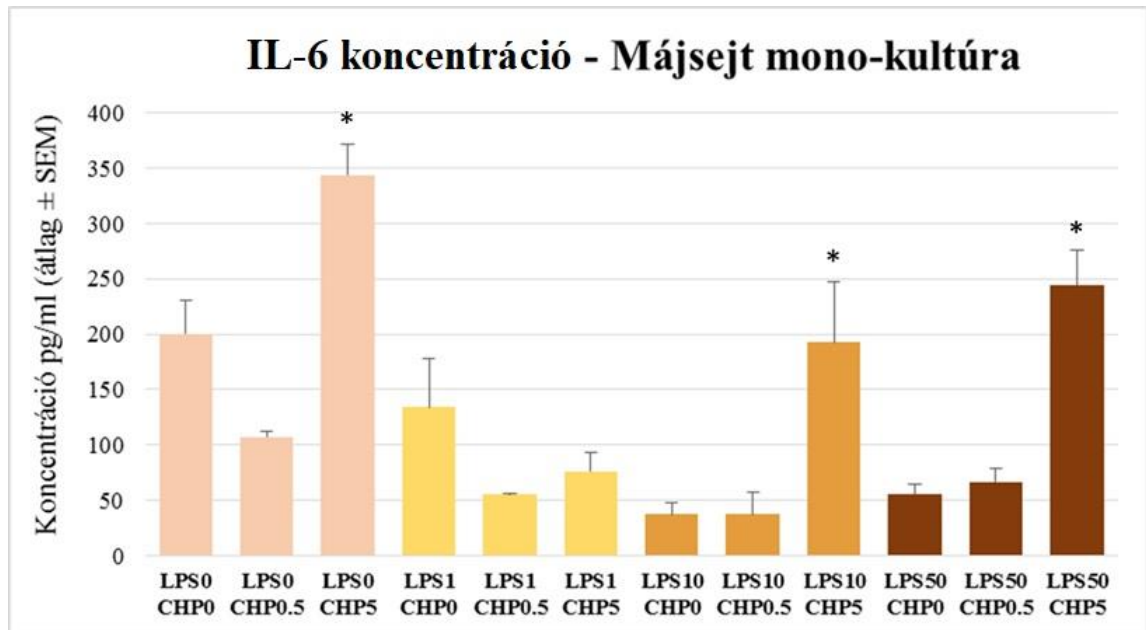
5. ábra: A H₂O₂ termelés változása csirke eredetű májsejt mono-kultúrán LPS (lipopoliszacharid) és CHP-1 (chicken heterophil peptide-1) kezelések hatására
 LPS0 = 0 µg/ml, LPS1 = 1 µg/ml, LPS10 = 10 µg/ml, LPS50 = 50 µg/ml. CHP0 = 0 µg/ml, CHP0,5 = 0,5 µg/ml, CHP5 = 5 µg/ml.
 * P<0,05 ; ** P<0,01 ; *** P<0,001



6. ábra: A H₂O₂ termelés változása csirke eredetű májsejt-nem parenchymális sejt ko-kultúrán LPS (lipopoliszacharid) és CHP-1 (chicken heterophil peptide-1) kezelések hatására
 LPS0 = 0 µg/ml, LPS1 = 1 µg/ml, LPS10 = 10 µg/ml, LPS50 = 50 µg/ml. CHP0 = 0 µg/ml, CHP0,5 = 0,5 µg/ml, CHP5 = 5 µg/ml.
 * P<0,05 ; ** P<0,01 ; *** P<0,001

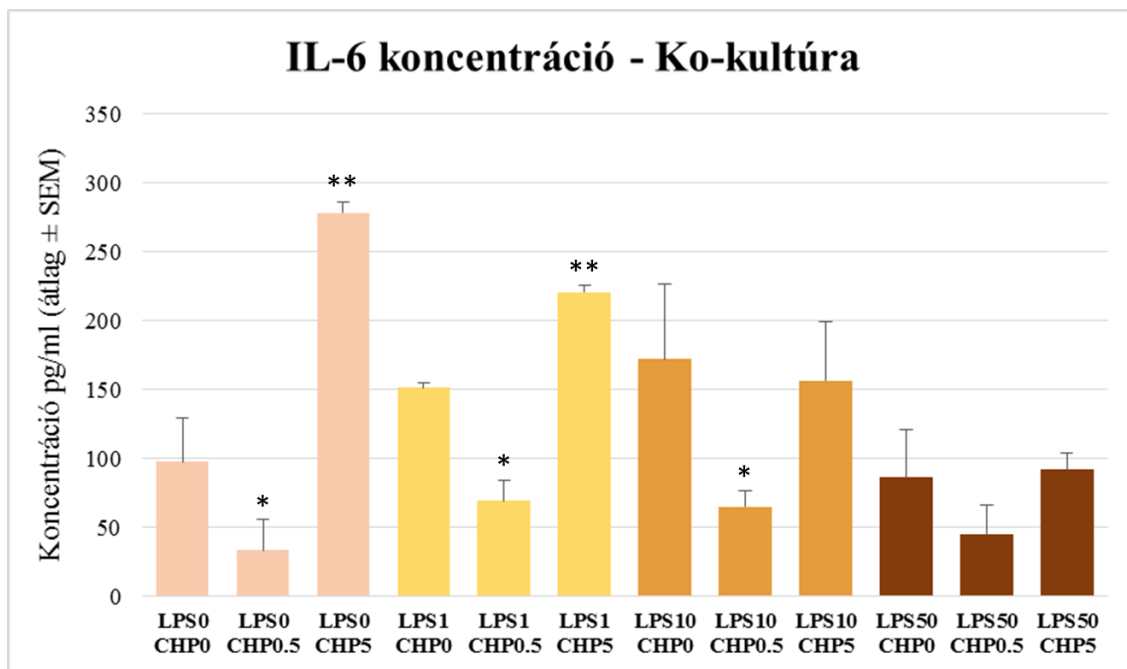
Az IL-6 koncentráció mérésének eredményei

A mérés során megállapíthatjuk, hogy májsejt monokultúrák esetében a 0,5 µg/ml koncentrációjú CHP-1 kezelés nem tudta szignifikánsan befolyásolni az IL-6 termelést, viszont az 5 µg/ml koncentrációjú CHP-1 szignifikánsan ($P < 0,05$) emelte a vizsgált interleukin mennyiségét a tápfolyadékban 0, 10 és 50 µg/ml LPS-kezelés esetében a CHP-1-gyel nem kezelt kontrollokhöz képest. Az eredményeket a 7. ábra szemlélteti.



7. ábra: Az IL-6 koncentráció változása csirke eredetű májsejt mono-kultúrán LPS (lipopoliszacharid) és CHP-1 (chicken heterophil peptide-1) kezelések hatására
LPS0 = 0 µg/ml, LPS1 = 1 µg/ml, LPS10 = 10 µg/ml, LPS50 = 50 µg/ml. CHP0 = 0 µg/ml, CHP0,5 = 0,5 µg/ml, CHP5 = 5 µg/ml.
* $P < 0,05$

A májsejt – nem-parenchymalis sejt ko-kultúrák esetében a 0,5 µg/ml koncentrációjú CHP-1 szignifikánsan ($P<0,05$) csökkentette a sejttényészetek IL-6 termelését 0, 1 és 10 µg/ml koncentrációjú LPS-kezelés mellett. Az 5 µg/ml koncentrációjú CHP-1 azonban szignifikánsan emelte az IL-6 mennyiségét a tápfolyadékban az LPS-sel nem kezelt, és az 1 µg/ml koncentrációjú LPS kezelésben részesült sejttényészeteken a CHP-1-gyel nem kezelt kontrollokhöz képest. Az eredményeket a 8. ábra szemlélteti.



8. ábra: Az IL-6 koncentráció változása csirke eredetű májsejt-nem parenchymális sejt ko-kultúrán LPS (lipopoliszacharid) és CHP-1 (chicken heterophil peptide-1) kezelésekre hatására LPS0=0 µg/ml, LPS1=1 µg/ml, LPS10=10 µg/ml, LPS50=50 µg/ml. CHP-0=0 µg/ml, CHP-0,5=0,5 µg/ml, CHP5=5 µg/ml.
* $P<0,05$; ** $P<0,01$

Megbeszélés

Az AMP-k antimikrobiális, endotoxin-ellenes, valamint immunmodulátor hatásának feltérképezése évtizedekkel ezelőtt megkezdődött, azonban ma is számos kutatás zajlik e területen. Bebizonyosodott, hogy e kationos peptidek, melyek a veleszületett immunrendszer részeként működnek szinte minden élőlényben, rendkívül széles antimikrobiális spektrummal rendelkeznek. Nem csupán baktériumok, de gombák, egysejtű paraziták, daganatos sejtek és burkos vírusok ellen is hatékonyak bizonyultak (Hancock és Scott, 2000). Ganz és munkatársai (1988) bebizonyították, hogy egy bizonyos, specifikus granulom deficienciában szenvedő emberek, akikben nem termelődnek α -defenzinek, sokkal nagyobb valószínűséggel betegednek meg bakteriális fertőzésekben, valamint ezek jelentősen súlyosabb gyulladás kíséretében zajlanak le bennük. *In vitro* körülmények között is lehetőség van a sejttenyészetek életképességének vizsgálatára, munkánk során mi erre a célra CCK-8 tesztet alkalmaztunk. Ezen eredményeink rámutattak, hogy a magas koncentrációjú CHP-1 kezelés jelentősen növeli a mono-kultúrában tenyésztett májsejtek lebontó metabolikus aktivitását, míg ez a hatás a gyulladásos modellként szolgáló ko-kultúrák esetében nem figyelhető meg.

Jelen munkánkban az AMP-k gyulladásos folyamatokra gyakorolt hatásait kívántuk megismerni. Ismert, hogy a defenzinek, amelyek közé az általunk vizsgált CHP-1 is tartozik, jelentős gyulladásgátló hatással rendelkeznek, például aktívan gátolják a proinflammatorikus citokinek és NO felszabadulását makrofágokból. Egy kísérletben nekrotikus makrofágok felülúszójának és α -defenzinek szisztémás adagolásával hatékonyan védtek meg egereket intraperitoneálisan beadott tioglikolát által indukált steril peritonitis ellen (Miles et al., 2009). Ezzel bizonyították, hogy a nekrotikus makrofágokból felszabaduló α -defenzinek gyulladáscsökkentő hatással rendelkeznek, mely az immunválaszban betöltött szerepük fontosságára világít rá.

Minden gyógyszerre igaz, hogy megfelelő adagban jótékony hatású, túldozírozva azonban akár káros hatásokkal is rendelkezhet. Ez a CHP-1 esetében sincs másként, melyet eredményeink is alátámasztanak: míg a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációnak számos pozitív hatását megfigyelhettük, az 5 $\mu\text{g/ml}$ CHP-1 koncentráció a sejtek számára túlságosan magasnak bizonyult. Erre utal az oxidatív stresszt tükröző Amplex Red teszt és az IL-6 koncentráció mérésének eredménye egyaránt, hiszen a nagy dózisban alkalmazott CHP-1 jelentősen növelte a sejtek H_2O_2 - és IL-6-termelését.

A reaktív oxigén gyökök képződése, ahogy a gyulladás maga is, fontos szerepet tölt be a szervezet védekezőrendszerében. Azonban az egyensúly felborulása, és képződésük túlsúlyba kerülése az antioxidánsokkal szemben súlyos szövethárosodáshoz, és ezáltal krónikus gyulladáshoz vezethet. Az AMP-k ezen egyensúly fenntartásában is fontos szerepet töltenek be. Erre bizonyítékkal szolgál egy bizonyos *Drosophila melanogaster* modell, melyet az oxidatív stressz tűrésére szelektáltak, azonban később kiderült, hogy bennük a megszokottnál sokkal több AMP termelődik (Zhao et al., 2011). Ezen kívül Shi és társai (1996) kimutatták, hogy a PR-39 nevű AMP a NADPH-oxidáz szabályozásán keresztül gátolja a szuperoxid anion képződését. Eredményeink összhangban állnak ezzel, hiszen kimutattuk, hogy a 0,5 µg/ml koncentrációjú CHP-1 kezelés egyértelműen csökkentette a sejtenyészetek H₂O₂ termelését, azaz markáns antioxidáns hatást mutatott. Azonban érdekes eredményeket kaptunk az 5 µg/ml koncentrációjú CHP-1 kezelés hatásáról: ebben a magasabb koncentrációban alkalmazva ugyanis a CHP-1 már emelte a H₂O₂ termelést, tehát prooxidáns hatásúnak tekinthető. Ez utóbbi eredmény a magas koncentrációjú CHP-1 már korábban említett káros hatásával lehet összefüggésben.

Az AMP-k fontos tulajdonsága, hogy az elpusztult baktériumok sejtfalából felszabaduló LPS (melyet kísérletünk során mi is felhasználtunk) és LTA ellenes hatást is képesek kifejteni. Ezek a sejtfalkomponensek súlyos gyulladást képesek indukálni a beteg szervezetben, főleg, ha egyszerre nagy mennyiségben szabadulnak fel, például nagy dózisú antibiotikumos kezelést követően. Az AMP-k (köztük az általunk vizsgált CHP-1) kifejezett affinitással rendelkeznek az LPS iránt, valamint képesek blokkolni az LPS kötődését az LBP-hez, ezáltal megakadályozva a makrofágok TNF- α és IL-6 termelését (Scott et al., 2000). Gough és társai (1996) által végzett kísérlet alapján az MBI-27 és MBI-28 kationos peptidek sikeresen gátolták LPS-sel kezelt RAW 264.7 rágszáló makrofág sejtvonal TNF- α termelését, valamint az MBI-28 szignifikáns védelmet nyújtott galaktózamin-érzékenyített kísérleti egerek számára a letális endotoxin-sokk ellen.

Az IL-6 mérésünk alapján látható, hogy a 0,5 µg/ml koncentrációjú CHP-1 gyulladáscsökkentő hatást mutatott a ko-kultúrák esetében, azaz csökkentette az IL-6 termelést. Azonban a magasabb, 5 µg/ml koncentráció esetében, összhangban az Amplex Red teszt adta eredményeinkkel, a sejtenyészetek IL-6 termelésének fokozódását tapasztaltuk, azaz a nagy dózisban adott CHP-1 mérés szerint is kedvezőtlen hatást fejtett ki a tenyésztett sejtekre. Mind a mono-kultúrák, mind a ko-kultúrák esetében

megfigyeltük, hogy a magas koncentrációjú CHP-1 kezelés növelte, míg az alacsony csökkentette az IL-6 termelést, azonban ez a hatás nem mindenhol volt szignifikáns. Ennek oka valószínűleg abban keresendő, hogy pontos eredményekre ilyen alacsony mintaelemszámnál kevésbé számíthatunk.

Fontos ezen kívül megemlíteni, hogy esetünkben az LPS kezelés nem váltott ki szignifikáns növekedést a sejttényészetek IL-6 vagy H₂O₂ termelésében. Ezen kívül különböző LPS koncentrációk esetében eltérő eredményeket tapasztaltunk az egyes paraméterek változását illetően, valamint nem mindig volt egyezés a mono-, illetve ko-kultúrák esetében sem. A mintázat, a numerikus változások iránya minden esetben azonos volt, de szignifikanciát nem mindig tudtunk megfigyelni. Ennek oka lehet a mintaelemszám, ugyanis egy kezelési csoportban három darab mintánk volt, és bár ez a kísérleti felállás a szakma köreiben elfogadott, megszokottnak tekinthető, azonban hátránya, hogy használata során egyes, vélhetően meglévő hatások nem mindig bizonyulnak szignifikánsnak.

Összefoglalva tehát megállapíthatjuk, hogy a 0,5 µg/ml koncentrációjú CHP-1 kezelés esetében érvényesül a gyulladáscsökkentő hatás, azaz csökkenteni képes az IL-6 termelést a májsejt – nem-parenchymális sejt ko-kultúrákon, valamint pozitív irányba befolyásolja a sejtek oxidatív státuszát. Bár az alacsony koncentráció pozitív hatásai egyértelműnek bizonyultak, de mindenképp figyelemmel kell lenni a CHP-1 mennyiségének megválasztására, hiszen magasabb koncentráció alkalmazása esetén többségében már negatív hatásokat tapasztaltunk. Fontos tehát a jövőben, egy esetleges innovatív fejlesztés során igen körültekintően, számos in vitro és in vivo vizsgálatot végezni, hogy az egyes AMP-k megfelelő alkalmazási körülményeit és koncentrációját a terápiás cél elérése érdekében megfelelően meg tudjuk határozni.

Összefoglalás

Napjainkban egyre nagyobb jelentőséggel bír mind az állat-, mind a humán orvoslás területén a fokozott mértékben terjedő antibiotikum-rezisztencia, melyben kiemelt szerepet játszik a haszonállattartás túlzott antibiotikum-felhasználási gyakorlata. Ez az emberiségre tekintve rendkívüli kockázattal bír, épp ezért előtérbe került az olyan vegyületek kutatása, melyek részben vagy egészben helyettesíthetik az antibiotikumok használatát.

Az antimikrobiális peptidek (AMP-k) ebből a szempontból ígéretesnek bizonyulnak. A veleszületett immunrendszer részeként mikrobaellenes hatással rendelkeznek, valamint csökkenteni képesek a bakteriális fertőzések következtében kialakuló gyulladást.

Kutatómunkánk során csirke eredetű primer májsejt és nem-parenchymalis sejt monokultúrákon, valamint ezen sejttípusokból létrehozott ko-kultúrákon tanulmányoztuk a chicken heterophil peptide-1 (CHP-1) nevű antimikrobiális peptid gyulladáscsökkentő hatását. A gyulladást lipopoliszacharid (LPS) kezeléssel váltottuk ki, majd a sejtek metabolikus aktivitását CCK-8 teszttel vizsgáltuk. A gyulladáscsökkentő hatást az interleukin-6 koncentrációjának mérésével, valamint az oxidatív stressz Amplex Red módszerrel történő vizsgálatával határoztuk meg. Az LPS-t 0, 1, 10 és 50 µg/ml koncentrációban, a CHP-1-et pedig 0, 0,5 és 5 µg/ml koncentrációban alkalmaztuk. A sejteket a kiegészített tápfolyadékkal 8 órán át inkubáltuk.

A CCK-8 teszt eredményei alapján a májsejt monokultúrák esetében az alacsony koncentrációjú CHP-1 kezelés nem tudta szignifikánsan befolyásolni a sejtek metabolikus aktivitását, míg a magas koncentrációjú kezelést követően szignifikáns emelkedést tapasztaltunk. A ko-kultúrákon egyik CHP-1 kezelés esetén sem volt kimutatható szignifikáns változás.

Méréseink alapján mind a májsejt monokultúrákon, mind a ko-kultúrákon a sejtek H₂O₂-termelése szignifikánsan csökkent az alacsonyabb koncentrációjú CHP-1 kezelést követően, míg szignifikánsan nőtt a magasabb koncentrációjú kezelés hatására szinte minden LPS-koncentráció alkalmazásakor.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a májsejt monokultúrák esetében az alacsonyabb koncentrációjú CHP-1 kezelés nem tudta szignifikánsan befolyásolni az IL-6 termelést, viszont a magasabb koncentráció szignifikánsan emelte a vizsgált interleukin

mennyiségét a tápfolyadékban minden LPS kezelés esetében. A ko-kultúrákon az alacsonyabb koncentrációjú CHP-1 szignifikánsan csökkentette az IL-6 termelését szinte mindegyik LPS kezelés mellett, míg a magasabb koncentráció szignifikánsan emelte az IL-6 mennyiségét a tápfolyadékban az LPS-mentes sejteken és az 1 µg/ml LPS kezelések esetén.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a kísérleteink során is alkalmazott 0,5 µg/ml koncentrációjú AMP kezelés kedvező irányba befolyásolhatja a sejtek oxidatív státuszát, illetve mérséklő hatást gyakorolhat a gyulladási folyamatok esetében, azonban az általunk vizsgált AMP 5 µg/ml koncentráció mellett már kedvezőtlen hatással lehet a sejtekre.

Summary

Bacterial antibiotic resistance is an emerging issue in the field of human and veterinary medicine as well. One of the major causes is the irresponsible and excessive use of antibiotics in animal farming. As it is a great risk for humanity there is a huge effort for developing new molecules capable to take over, either partially or entirely, the role of the current antibiotics.

Antimicrobial peptides (AMPs) are a promising natural compound family. As members of the innate immunity they are very effective against microbes and the same time they can moderate the inflammation caused by the bacterial infection.

We used primary hepatocyte- and non-parenchymal cell monocultures and their co-cultures of chicken origin for testing the effect of the antimicrobial peptide chicken heterophil peptide-1 (CHP-1). Lipopolysaccharide (LPS) was used to induce inflammation on the cell culture models, applied in 0, 1, 10 and 50 $\mu\text{g/ml}$. The CHP-1 was added in 0, 0.5, and 5 $\mu\text{g/ml}$ concentrations to the cell culture medium. The cells were incubated with the supplemented medium for 8 hours. The metabolic activity of the cells was measured by CCK-8 test. The anti-inflammatory effect of the applied AMP was investigated by the determination of the concentration of IL-6 and by investigating the oxidative stress level using Amplex Red method.

In the case of mono-cultures the metabolic activity of the cells was not effected significantly by the 0.5 $\mu\text{g/ml}$ CHP-1 treatment; however, it was significantly increased by the 5 $\mu\text{g/ml}$ CHP-1 treatment when applied together with all LPS concentrations. None of the CHP-1 treatments had a significant effect on the metabolic activity of the cells of co-culture models.

The measurements showed a significantly decreased H_2O_2 production after the 0.5 $\mu\text{g/ml}$ CHP-1 treatment either in monoculture and co-culture models, meanwhile it was significantly elevated after the use of 5 $\mu\text{g/ml}$ CHP-1 treatment, together with most LPS concentrations.

There was no significant change in the IL-6 concentration after the application of the 0.5 $\mu\text{g/ml}$ CHP-1 treatment in the culture medium of hepatocyte monocultures; however, after administering it in 5 $\mu\text{g/ml}$ concentration the production of IL-6 was significantly elevated independently from LPS exposure. In the hepatocyte - non-parenchymal cell co-cultures we could observe significantly decreased IL-6 concentration

triggered by 0.5 $\mu\text{g/ml}$ CHP-1 in case of most LPS concentrations, although IL-6 concentration was significantly elevated after the 5 $\mu\text{g/ml}$ CHP-1 treatment in the 0 $\mu\text{g/ml}$ LPS and 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS groups.

We can conclude that the investigated AMP, CHP-1 in a lower concentration, such as the applied 0.5 $\mu\text{g/ml}$, can have a great influence on the oxidative stress level and on the inflammatory response; however, it may have an unfavourable effect on the cells in the higher concentration of 5 $\mu\text{g/ml}$.

Köszönetnyilvánítás

Dolgozatom létrejöttét szeretném megköszönni első sorban témavezetőimnek, Dr. Neogrády Zsuzsannának és Oláhné Dr. Orbán Katának, akik közreműködésükkel és tanácsaikkal segítettek munkámat. Ezen kívül hálával tartozom a Biokémiai Osztály összes munkatársának, különösképp Dr. Mátis Gábornak és Dr. Mackei Máténak, akik hozzájárultak a kísérletek zavartalan lefolyásához. Valamint köszönöm Dr. Bartha Tibor Tanszékvezető Úrnak, hogy lehetővé tette dolgozatom létrejöttét. Köszönöm a Gyógyszertani és Méregtani Tanszéknek, különösképp Jerzsele Ákos Tanszékvezető Úrnak, hogy lehetővé tették az Amplex Red méréseink elvégzését a tanszékükön található automata segítségével. Családomnak, páromnak és barátaimnak pedig köszönettel tartozok türelmükért és támogatásukért, mellyel készülő munkám létrejöttét segítették elő.

A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap (ESZA) társfinanszírozásával valósul meg (a támogatási szerződés száma: AZ EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00005, címe: Tudományos utánpótlás erősítése a hallgatók tudományos műhelyeinek és programjainak támogatásával, a mentorálás folyamatának kidolgozásával).

Irodalomjegyzék

ABRAHAM, EDWARD P., AND ERNST CHAIN, 1940: An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, 146.3713. 837.

AGYARE, C., BOAMAH, V. E., ZUMBI, C. N., AND OSEI, F. B., 2018: Antibiotic Use in Poultry Production and Its Effects on Bacterial Resistance. URL: <https://www.intechopen.com/books/antimicrobial-resistance-a-global-threat/antibiotic-use-in-poultry-production-and-its-effects-on-bacterial-resistance>, Megtekintve: 2019. 10. 05.

DOBBIN, C., MALEY, M., HARKNESS, J., BENN, R., MALOUF, M., GLANVILLE, A., AND BYE, P., 2004: The impact of pan-resistant bacterial pathogens on survival after lung transplantation in cystic fibrosis: results from a single large referral centre. *Journal of Hospital Infection*, 56.4. 277-282.

EVANS, E. W., BEACH, F. G., MOORE, K. M., JACKWOOD, M. W., GLISSON, J. R., AND HARMON, B. G. 1995: Antimicrobial activity of chicken and turkey heterophil peptides CHP1, CHP2, THP1, and THP3. *Veterinary Microbiology*, 47(3-4). 295-303.

FLEMING, ALEXANDER, 1929: On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. *British journal of experimental pathology*, 10(3). 226.

FORREST, RICHARD D., 1982: Early history of wound treatment. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 75.3. 198.

GANZ, T., METCALF, J. A., GALLIN, J. I., BOXER, L. A., AND LEHRER, R. I., 1988: Microbicidal/cytotoxic proteins of neutrophils are deficient in two disorders: Chediak-Higashi syndrome and "specific" granule deficiency. *The Journal of clinical investigation*, 82(2). 552-556.

GOUGH, M., HANCOCK, R. E., AND KELLY, N. M., 1996: Antiendotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents. *Infection and immunity*, 64(12). 4922-4927.

GUANÍ-GUERRA, E., SANTOS-MENDOZA, T., LUGO-REYES, S. O., AND TERÁN, L. M., 2010: Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clinical immunology*, 135(1). 1-11.

HANCOCK, ROBERT EW, AND ROBERT LEHRER, 1998: Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in biotechnology*, 16(2). 82-88.

HANCOCK, ROBERT EW, AND MONISHA G. SCOTT, 2000: The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the national Academy of Sciences*, 97.16. 8856-8861.

HARMON, B. G., 1998: Avian heterophils in inflammation and disease resistance. *Poultry science*, 77(7). 972-977.

HEUMANN, D., BARRAS, C., SEVERIN, A., GLAUSER, M. P., AND TOMASZ, A., 1994: Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infection and immunity*, 62(7). 2715-2721.

HEUMANN, D., GLAUSER, M. P., AND CALANDRA, T., 1998: Molecular basis of host—pathogen interaction in septic shock. *Current opinion in microbiology*, 1(1). 49-55.

JEVONS MP, 1961: „Celbenin”-resistant Staphylococci. *Br Med J.*; 1. 124–125.

LEHRER, ROBERT I., AND TOMAS GANZ, 1999: Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Current opinion in immunology*, 11.1. 23-27.

LIU, B., AND M. POP, 2009: ARDB—Antibiotic Resistance Genes Database. *Nucleic Acids Res*37 (Suppl 1): D443–D447.

MATHISON, J. C., AND ULEVITCH, R. J., 1979: The clearance, tissue distribution, and cellular localization of intravenously injected lipopolysaccharide in rabbits. *The Journal of Immunology*, 123(5). 2133-2143.

MICHIE, H. R., MANOGUE, K. R., SPRIGGS, D. R., REVHAUG, A., O'DWYER, S., DINARELLO, CERAMI, A., WOLFF, S. M. AND WILMORE, D. W., 1988: Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *New England Journal of Medicine*, 318(23). 1481-1486.

MILES, K., CLARKE, D. J., LU, W., SIBINSKA, Z., BEAUMONT, P. E., DAVIDSON, D. J., BARR, T. A., CAMPOPIANO, D. J., AND GRAY, M., 2009: Dying and necrotic neutrophils are anti-inflammatory secondary to the release of α -defensins. *The Journal of Immunology*, 183(3). 2122-2132.

MONTALI, R. J., 1988: Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). *Journal of comparative pathology*, 99(1). 1-26.

SAGA, TOMOO, AND KEIZO YAMAGUCHI, 2009: History of antimicrobial agents and resistant bacteria. *Japan Medical Association Journal*, 52.2. 103-108.

SCOTT, M. G., YAN, H., AND HANCOCK, R. E., 1999: Biological properties of structurally related α -helical cationic antimicrobial peptides. *Infection and immunity*, 67(4). 2005-2009.

SCOTT, M. G., VREUGDENHIL, A. C., BUURMAN, W. A., HANCOCK, R. E., AND GOLD, M. R., 2000: Cutting edge: cationic antimicrobial peptides block the binding of lipopolysaccharide (LPS) to LPS binding protein. *The Journal of Immunology*, 164(2). 549-553.

SHI, J., ROSS, C. R., LETO, T. L., AND BLECHA, F., 1996: PR-39, a proline-rich antibacterial peptide that inhibits phagocyte NADPH oxidase activity by binding to Src homology 3 domains of p47 phox. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(12). 6014-6018.

SU, G. L., 2002: Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 283(2). G256-G265.

SUGIARTO, H., AND YU, P. L., 2004: Avian antimicrobial peptides: the defense role of β -defensins. *Biochemical and biophysical research communications*, 323(3). 721-727.

ULEVITCH, R. J., AND TOBIAS, P. S., 1999: Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Current opinion in immunology*, 11(1). 19-22.

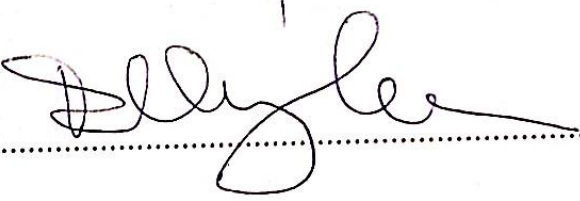
- VADKERTI-TÓTH, NIKOLETT, 2018: Agrárpiaci Jelentések, Baromfi. 23.
- VAN BOECKEL, T. P., BROWER, C., GILBERT, M., GRENFELL, B. T., LEVIN, S. A., ROBINSON, T. P., TEILLANT, A., AND LAXMINARAYAN, R., 2015: Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18). 5649-5654.
- VARGA, J., RUSVAI, M., FODOR, L., 2018: A háziállatok fertőző betegségei. Budapest, Magyar Állatorvosi Kamara. 27. oldal
- WAKSMAN, SELMAN A., 1947: What is an antibiotic or an antibiotic substance? *Mycologia*, 39.5. 565-569.
- WU, M., MAIER, E., BENZ, R., AND HANCOCK, R. E. 1999: Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of Escherichia coli. *Biochemistry*, 38(22). 7235-7242.
- YANG, D., BIRAGYN, A., KWAK, L. W., AND OPPENHEIM, J. J., 2002: Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends in immunology*, 23(6). 291-296.
- ZAFFIRI, LORENZO, JARED GARDNER, AND LUIS H. TOLEDO-PEREYRA, 2012: History of antibiotics. From salvarsan to cephalosporins. *Journal of Investigative Surgery*, 25.2. 67-77.
- ZHANG, L., BENZ, R., AND HANCOCK, R. E., 1999: Influence of proline residues on the antibacterial and synergistic activities of α -helical peptides. *Biochemistry*, 38(25). 8102-8111.
- ZHAO, H. W., ZHOU, D., AND HADDAD, G. G., 2011: Antimicrobial peptides increase tolerance to oxidant stress in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(8). 6211-6218.

Konzulensi ellenjegyzés

Alulírott Dr. Neogrády Zsuzsanna igazolom, hogy Sebők Csilla *A chicken heterophil peptide-1 gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata csirke eredetű májsejttenyészeteken* című diplomamunkáját ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2019. 11. 22.

Budapest,



.....
.....

a témavezető neve és aláírása

Élettani- és Biokémiai Tanszék

Biokémiai Osztály

tanszék

Konzulensi ellenjegyzés

Alulírott Oláhné Dr. Orbán Kata igazolom, hogy Sebők Csilla *A chicken heterophil peptide-1 gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata csirke eredetű májsejttenyészeteken* című diplomamunkáját ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2019. 11. 22.

.....
.....
.....
Dr. Orbán Kata
.....
.....

a témavezető neve és aláírása

Élettani- és Biokémiai Tanszék

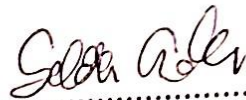
Biokémiai Osztály

tanszék

Nyilatkozat a TDK és a diplomamunka azonosságáról

Alulírott Sebők Csilla nyilatkozom, hogy diplomamunkám, melynek címe *A chicken heterophil peptide-1 gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata csirke eredetű májsejttenyészeteken* tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik az azonos című, a 2019. évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2019. 11. 22.



.....
.....
a hallgató neve és aláírása

HuVetA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: Sebők Csilla

Elérhetőség (e-mail cím): scsilla663@gmail.com

A feltöltendő mű címe A chicken heterophil peptide-1 gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata csirke eredetű májsejtenyészeteken

A mű megjelenési adatai: Diplomamunka

Az átadott fájlok száma: 1 db

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltatssa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg **(egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel)**:

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:



Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2019. év 11. hó 22. nap

aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*