

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Antimikrobiális peptidek immunmodulátor
hatásának vizsgálata csirke eredetű primer
májsejttenyészeteken és bél eredetű
explantokon**

Dr. Papp-Sebők Csilla

Témavezetők: Dr. Mátis Gábor PhD

Dr. Neogrády Zsuzsanna CSc



ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Állatorvostudományi Doktori Iskola

Budapest, 2025.

Témavezetők:

.....
Dr. Mátis Gábor PhD,
Élettani és Biokémiai Tanszék, Biokémiai Osztály
Állatorvostudományi Egyetem, Budapest
Témavezető

.....
Dr. Neogrády Zsuzsanna CSc,
Élettani és Biokémiai Tanszék, Biokémiai Osztály
Állatorvostudományi Egyetem, Budapest
Témavezető

Készült 8 példányban. Ez a n. sz. példány.

.....
Dr. Sebők Csilla

Bevezetés

A baromfi, amely napjaink legnagyobb számban tenyésztett haszonállata, zsúfolt tartási körülményei miatt fokozottan ki van téve különféle fertőző betegségeknek, melyeket tovább súlyosbíthatnak olyan stresszhatások, mint a magas hőmérséklet vagy a szállítás. Ezen betegségek egy része bakteriális eredetű, kezelésük pedig egyre nehezebb az antimikrobiális rezisztencia (AMR) terjedése miatt. Az antibiotikumok hatékonysága fokozatosan csökken, és az olyan szerek állatorvoslásban történő használata, amelyekre a kórokozók még érzékenyek, egyre inkább korlátozott az emberek egészségének védelme érdekében. Emiatt igen jelentősen megnövekedett az igény arra, hogy olyan természetes molekulákat találjunk vagy szintetizáljunk, melyek az egyes antibiotikumokat helyettesíteni képesek.

Az élő szervezet számos módon védekezik a különféle káros hatásokkal szemben, az egyik ilyen lehetőség például biológiailag aktív anyagok szervezetben történő előállításával. Az antimikrobiális peptidok (AMP-k), más néven gazdaszervezetet védő peptidok (HDP-k), a védekező rendszer fontos részét képezik, szinte minden élőlény termeli őket, és ígéretes jelöltnek tekinthetők a bakteriális és gyulladásos betegségek kezelésében. Legfeljebb 100 aminosavból állnak, a veleszületett immunrendszer részeként közvetlen antimikrobiális hatással bírnak, emellett képesek az immunválaszt is befolyásolni. Kezdetben elsősorban közvetlen antimikrobiális tulajdonságaiknak köszönhetően vizsgálták ezeket az anyagokat, később azonban kimutatták, hogy gerincesekben – így emberben is – bizonyos védelmi folyamatok serkentésével és a káros gyulladásos folyamatok elnyomásával is hozzájárulnak a kórokozók elleni védelemhez. Közvetlen antimikrobiális hatásuk *in vivo* körülmények között kevésbé figyelhető meg, ezért a szakirodalomban manapság gyakran a HDP elnevezést alkalmazzák, utalva immunrendszert támogató védő funkciójukra. Jelenleg több mint 3500 AMP leírása található a University of Nebraska Medical Center adatbázisában (<https://aps.unmc.edu/>).

Disszertációm keretében egy természetes eredetű (csirke cathelicidin-2, Cath-2) és egy szintetikus AMP-t (innate defense regulator-1002, IDR-1002) vizsgáltam. A természetes eredetű, vagyis az állati vagy emberi szervezetben termelődő AMP-k szélesebb szakirodalmi háttérrel rendelkeznek, ugyanakkor hátrányt jelent a szintetikus peptidekkel szemben, hogy nagyobb lehet a toxicitásuk, és hatásuk sok esetben fajspecifikus. A szintetikus AMP-k fejlesztése révén viszont olyan szempontok is figyelembe vehetők, melyek által kisebb méretű és nagyobb hatékonyságú molekulák előállítása vált lehetővé.

Célunk a fent említett két AMP sejtek életképességére és immunválaszára gyakorolt hatásának vizsgálata volt. Ehhez két *in vitro* modellt alkalmaztunk: egy elsődleges, csirke eredetű, izolált májsejtekből és nem-parenchimális sejtekből álló ko-kultúrát, valamint csirke eredetű bél-explantátumot. Ez utóbbi modellt azért választottuk, mivel a csirkéket érintő fertőzések többsége bél eredetű, gyakran patogén baktériumok vagy a bélflóra egyensúlyának felborulása okozza őket. Emiatt igen fontos vizsgálni, hogy e peptidek milyen hatást gyakorolnak a bélfal immunválaszára. A másik modell kiválasztásának oka az volt, hogy a máj az első szerv, amely kapcsolatba kerül a bélből a vérkeringésbe lépő molekulákkal, így kiemelkedő szerepet játszik a fertőzések és gyulladásokat okozó ágensek elleni védekezésben.

Célkitűzés

Kutatócsoportunk korábban már kifejlesztett és jellemzett egy csirke eredetű, primer hepatocita–nem-parenchimális sejt ko-kultúrát (melyben főként rezidens makrofágok, ún. Kupffer-sejtek találhatók), valamint egy bél-explantátum modellt, amelyek hatékony eszközök lehetnek a csirkék fertőzésekhez kapcsolódó gyulladásos folyamatainak vizsgálatához. Első lépésként egy csirke eredetű gyulladásos modellt kellett kialakítsunk, mivel korábbi vizsgálatok szerint ezek a sejtenyészetek némileg eltérően reagálnak a gyulladást keltő ingerekre az emlős eredetű sejtenyészetekhez képest, ennek megfelelően sejtenyészeinkben több patogén-asszociált molekuláris mintázat (PAMP) vizsgálata vált szükségessé.

Következő kérdésünk az volt, hogy a jelen tanulmányban vizsgált AMP-k, a Cath-2 és az IDR-1002 csökkentik-e a sejtek életképességét a hepatocita–nem-parenchimális sejt ko-kultúrában vagy a bél-explantátumokban. Mivel az AMP-k bizonyítottan képesek a sejtmembránokat károsítani, sőt, bizonyos sejtípusokra magasabb koncentrációban toxikus hatást is kifejthetnek, a sejtek életképességének vizsgálata fontos volt a felhasználhatóságuk szempontjából.

Fő célunk a toxicitás vizsgálata mellett az volt, hogy modelljeinkben meghatározzuk e peptidek immunmoduláns hatásait. Mint a legtöbb AMP, a Cath-2 és az IDR-1002 is jelentős mértékben, a vizsgált állatfajtól és sejtípustól függően befolyásolhatja az immunrendszer működését, ezért kiemelten fontosnak tartottuk, hogy megbízható információt szerezzünk e peptidek csirke máj- és bélsejtekre gyakorolt specifikus hatásairól. Ezenkívül modelljeinkben célul tűztük ki a redox- és immunfolyamatok közötti összefüggések feltárását.

PhD munkám célkitűzései az alábbiak szerint foglalhatók össze:

1. Gyulladásos modell kialakítása a csirke eredetű hepatocita–nem-parenchimális sejt ko-kultúrákon.
2. A Cath-2 és az IDR-1002 sejtek életképességére gyakorolt hatásának vizsgálata a hepatocita–nem-parenchimális sejt ko-kultúrákon és a bél-explantátumokon.
3. A Cath-2 immunmoduláns hatásainak vizsgálata a hepatocita–nem-parenchimális sejt ko-kultúrákon és a bél-explantátumokon.
4. Az IDR-1002 immunmoduláns hatásainak vizsgálata a hepatocita–nem-parenchimális sejt ko-kultúrákon és a bél-explantátumokon.

Az általunk követett kísérleti terv a következő táblázatban látható:

	Modell	Vizsgált anyagok	Életképességi paraméterek	Gyulladásos paraméterek	Redox paraméterek
Előkísérlet	Csirke eredetű hepatikus ko-kultúra	LPS, LTA, PMA	Metabolikus aktivitás és EC LDH aktivitás	CXCLi2 és IL-6	-
I. kísérlet	Csirke eredetű hepatikus ko-kultúra	LTA, PMA és Cath-2	Metabolikus aktivitás és EC LDH aktivitás	CXCLi2, IFN- γ , IL-10 és M-CSF	H ₂ O ₂ és MDA
II. kísérlet	Csirke eredetű hepatikus ko-kultúra	LTA és IDR-1002	Metabolikus aktivitás és EC LDH aktivitás	CXCLi2, IL-6, IL-16, IFN- γ , IL-10, M-CSF és RANTES	H ₂ O ₂ , Nrf2 és PC
III. kísérlet	Csirke eredetű vékonybél explant	LTA és Cath-2	Metabolikus aktivitás és EC LDH aktivitás	CXCLi2, IL-6, IL-2, IFN- γ , IL-10 és IFN- γ /IL-10 arány	-
IV. kísérlet	Csirke eredetű vékonybél explant	LTA és IDR-1002	Metabolikus aktivitás és EC LDH aktivitás	CXCLi2, IL-2, RANTES, IFN- γ , IL-10 és IFN- γ /IL-10 arány	-

Anyag és módszer

Előzetes vizsgálat: gyulladás kiváltása

Első célunk gyulladásos modell kialakítása volt a már korábban kutatócsoportunk által jellemzett, csirke eredetű primer hepatocita–nem-parenchimális sejt ko-kultúrán. A sejtszuszenziókat 6:1 arányban (hepatocita:nem-parenchimális sejtek) elegyítettük. Ez az arány enyhe gyulladásos állapotot hivatott modellezni, így elősegítve a gyulladásos válasz kialakulását. A ko-kultúrákat I. típusú kollagénnel előkezelt 96 lyukú lemezekre ültettük, 100 μ L/lyuk térfogatban.

A vizsgálat során lipopoliszacharid (LPS), lipoteikosav (LTA) és forbol-mirisztát-acetát (PMA) hatásait vizsgáltuk a sejtek életképességére és a gyulladásos paraméterekre. A vizsgálat első részében a sejtenyészeteket 0 (kontroll), 10 vagy 50 μ g/mL *Escherichia coli* (O55:B5) eredetű LPS-sel, illetve 10 vagy 50 μ g/mL *Staphylococcus aureus* eredetű LTA-val kezeltük. A vizsgálat második részében a tápfolyadékhoz 0 (kontroll), 100 vagy 1000 ng/mL PMA-t adtunk. A sejtek kezelési időtartama 24 óra volt.

A sejtek életképességének meghatározása céljából a sejtek metabolikus aktivitását 96 lyukú lemezeken Cell Counting Kit-9 (CCK-8) teszttel mértük, a membránintegritás értékelésére pedig az extracelluláris laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitást határoztuk meg. A citokinszintek (interleukin-6 [IL-6] és a csirke kemotaktikus és angiogén faktor [CXCLi2], más néven csirke interleukin-8 [IL-8]) meghatározására csirke-specifikus ELISA kitéket alkalmaztunk.

I. és II. vizsgálat: a Cath-2 és IDR-1002 hatásai a máj eredetű sejtenyészeteken

Mind az I., mind a II. vizsgálat során a hepatocita–nem-parenchimális sejt ko-kultúrák előállítását az Előzetes vizsgálat során ismertetett módszertan szerint történt. A frissen izolált sejteket 24 lyukú és 96 lyukú, I. típusú kollagénnel előkezelt lemezekre ültettük. A 24 lyukú lemezekre a sejtszuszenzióból 400 μ L/lyuk, a 96 lyukú lemezekre pedig 100 μ L/lyuk

menntiséget raktunk le. Az I. vizsgálat során a sejteket 5 és 10 nmol/mL koncentrációjú Cath-2-vel kezeltük, a *Staphylococcus aureus* eredetű LTA-t 50 µg/mL, a PMA-t pedig 1000 ng/mL koncentrációban alkalmaztuk. A II. vizsgálatban az IDR-1002-t 10, 30 és 90 µg/mL koncentrációkban adtuk a sejtekhez önmagában, illetve 50 µg/mL LTA-val kombinálva.

A sejttéletképesség vizsgálata az Előzetes vizsgálatban leírtakkal azonos módon történt. Csirke-specifikus ELISA kitekkel határoztuk meg a CXCLi2 (I. vizsgálat) vagy a CXCLi2 és IL-6 (II. vizsgálat) koncentrációját. Luminex xMAP módszerrel mértük az IFN-γ, IL-10, makrofág kolónia-stimuláló faktor (M-CSF) koncentrációját (I. vizsgálat), illetve IL-16, IFN-γ, IL-10, M-CSF és RANTES (Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted, II. vizsgálat) szinteket. Ezen kívül mindkét vizsgálatban az extracelluláris H₂O₂ szintet Amplex Red módszerrel határoztuk meg. Az I. vizsgálatban a malondialdehid (MDA) koncentrációját specifikus kolorimetriás módszerrel mértük. A II. vizsgálatban a fehérje-karbonil (PC) és a nukleáris faktor erythroid 2-related faktor 2 (Nrf2) szinteket csirke-specifikus ELISA módszerrel határoztuk meg.

III. és IV. vizsgálat: a Cath-2 és IDR-1002 hatásai bél-explantátum tenyészetén

A bél-explantátumok izolálását kutatócsoportunk által korábban kidolgozott módszertan alapján végeztük, mely során egy 3 hetes hím Ross-308 brojler csirkét áldoztunk fel. Ezen explantátum tenyészetek lehetőséget nyújtanak az AMP-k bélfalra gyakorolt hatásainak vizsgálatára. Az explantátumok előkészítését követően a tenyésztő közeghez 5, 10 és 25 nmol/mL koncentrációjú csirke Cath-2-t, 10 µg/mL *Staphylococcus aureus* eredetű LTA-t, valamint ezek kombinációját adtuk. A mintákat 12 órán keresztül inkubáltuk a kezelési oldatokkal, majd a sejttenyésztő közegből mintákat vettünk.

A sejttéletképesség vizsgálata a korábban ismertetett módszerekkel történt. Mind a III., mind a IV. vizsgálat során a CXCLi2 koncentrációját csirke-specifikus szendvics ELISA módszerrel határoztuk meg. Luminex xMAP módszerrel a következő citokinek és kemokinek koncentrációját mértük: IL-2, IL-6, IFN-γ és IL-10 (III. vizsgálat), IL-2, IFN-γ, IL-10 és RANTES

(IV. vizsgálat). Mindkét vizsgálatban az explantátumok gyulladásos állapotának pontosabb megítélésére az IFN- γ /IL-10 arányt is figyelembe vettük.

Statisztika

Valamennyi statisztikai elemzést az R v. 4.0.3 (R Core Team, 2020) szoftverrel végeztük. Páronkénti összehasonlításokat a Wilcoxon előjeles rangpróba segítségével végeztünk, mivel a kezelési csoportok közül néhány nem normális eloszlást mutatott a Shapiro-Wilk tesztek alapján. A különbséget statisztikailag szignifikánsnak tekintettük, ha a p-érték kisebb volt, mint 0,05.

Eredmények és diszkusszió

Előzetes vizsgálat: gyulladás kiváltása

Az előzetes vizsgálat célja olyan vegyületek azonosítása volt, amelyek alkalmasak lehetnek gyulladásos válasz kiváltására az általunk alkalmazott csirke eredetű hepatocita – nem-parenchimális sejt ko-kultúrában. A szakirodalomban korlátozott mennyiségű adat áll rendelkezésre csirke eredetű sejtenyészeteken végzett kísérletekről, így kutatásunk, melynek során egy megbízható gyulladásos modellt hoztunk létre, fontos szerepet játszhat ezen tudományterület vizsgálati eszköztárának bővítésében. Az általunk alkalmazott 6:1 hepatocita – nem-parenchimális sejt arány enyhe gyulladásos állapotot modellez, lehetővé téve a stressz és az immunválasz közötti kölcsönhatások vizsgálatát.

A vizsgálat során először bakteriális endotoxinokat – Gram-negatív baktériumokból származó LPS-t és Gram-pozitív baktériumokból származó LTA-t – értékeltünk a gyulladás kiváltására való alkalmasság szempontjából. Míg az LPS nem idézett elő gyulladáskeltő citokin választ, a 50 µg/mL koncentrációjú LTA mérsékelt mértékben növelte a CXCLi2 szintjét. A vizsgálat következő részében a PMA hatásainak vizsgálatára került sor.

Az eredmények azt mutatták, hogy az LTA membránkárosodást okozott, amit az extracelluláris LDH-szint emelkedése jelzett, míg a PMA csökkentette a metabolikus aktivitást, ami sejtszintű stresszre vagy citotoxicitásra utal. Megfigyeltük továbbá, hogy egyedül a PMA eredményezett szignifikáns növekedést az IL-6 és CXCLi2 koncentrációban, míg az LTA csak a CXCLi2 szintjét növelte.

Ezzel szemben az LPS nem indukált citokintermelést, ami valószínűleg a csirkékben hiányos TLR4 jelátviteli útvonal következménye, mivel egyes emlős gének ortológjai hiányoznak, illetve az alternatív jelátviteli utak sem aktívak. Ez a hiányosság magyarázhatja a mért IL-6 és CXCLi2 fehérjeszintek alacsony szintjét, annak ellenére, hogy hasonló modellekben korábban mRNS-szint emelkedést figyeltek meg. Ez az eltérés rávilágít a

poszttranszkripció és transzláció szabályozás jelentőségére a citokintermelés során, amely végül befolyásolja az extracelluláris térben megjelenő fehérjeszinteket.

Összefoglalva, a PMA és az LTA hatékony gyulladásindukáló anyagként azonosítható csirke hepatikus ko-kultúrákban. Eredményeink alapján e vegyületek megfelelőképp alkalmazhatóak *in vitro* immunmodulációs vizsgálatok során, mivel megbízható modellt biztosítanak a madárfélék immunválaszainak sejtszintű tanulmányozásához.

I. vizsgálat: a Cath-2 hatásai a primer májsejttenyészetben

Az I. vizsgálat során a Cath-2 hatásait vizsgáltuk a csirke hepatocita–nem-parenchimális sejt ko-kultúráinkon. A vizsgálat célja a Cath-2 citotoxicitásának és gyulladásos válaszra gyakorolt hatásának értékelése volt. Bár az AMP-k ígéretes terápiás szerek, membránkárosító hatásuk következtében citotoxikus tulajdonságokat is mutathatnak. A Cath-2 a sejtek metabolikus aktivitásának csökkentését és az LDH felszabadulásának dóziszfüggő növekedését idézte elő, ami enyhe-közepes citotoxicitásra utalt, különösen magasabb koncentrációk esetén. Érdekes módon ezek a hatások mérséklődtek, amikor a Cath-2-t LTA-val együtt alkalmaztuk, ami valószínűleg annak köszönhető, hogy a peptidek képesek megkötni és neutralizálni az endotoxinokat, például az LTA-t, így korlátozva az „off-target” citotoxikus hatásokat.

Az immunválaszt citokin- és kemokin-szintek (CXCLi2, IL-10, IFN- γ és M-CSF) mérésével értékeltük. A magas dózisú Cath-2 növelte az IFN- γ szintet, ami gyulladáskeltő aktivitásra utalt, míg az alacsonyabb dózis csökkentette az LTA által indukált IFN- γ szintet, gyulladáscsökkentő potenciálra utalva. A Cath-2 emellett dóziszfüggően növelte a CXCLi2 és az IL-10 szinteket, ami inkább immunmoduláns, semmint tisztán gyulladáscsökkentő funkcióját támasztja alá. Ezzel szemben az LTA és a PMA önmagukban korlátozott hatást gyakoroltak ezen mediátorokra.

Az M-CSF esetében, amely a makrofágok szabályozásában játszik szerepet, a Cath-2 hatására csökkent szintet mértünk, különösen LTA-val vagy PMA-val kombinált alkalmazás

során, ami a peptid makrofág-funkcióra gyakorolt befolyására utal. Emellett a Cath-2 dózisfüggően növelte a hidrogén-peroxid (H_2O_2) termelést, ugyanakkor a lipid-peroxidáció (az MDA szint változása alapján) változatlan maradt, sőt, magas dózisú Cath-2 esetén az MDA szintek csökkentek, ami a membránlipidekre gyakorolt protektív hatásra utalhat.

Összességében a Cath-2 a májsejtek immunválaszát több módon is befolyásolta, mivel módosította a citokin-termelést, az oxidatív státuszt és a sejttéletképességet, méghozzá koncentrációfüggő módon. Míg a magas dózisok bizonyos mértékű citotoxicitást eredményeztek, az alacsonyabb dózisok mellett a sejtek integritása fennmaradt, és kedvező immunreguláló hatásokat figyeltünk meg. Eredményeink alátámasztják a Cath-2 potenciális alkalmazhatóságát antibiotikum alternatívaként, hiszen alkalmas lehet a gyulladás szabályozására anélkül, hogy jelentős sejtkárosodást okozna.

II. vizsgálat: az IDR-1002 hatásai a primer májsejt-tenyészetben

Az IDR-ek olyan AMP-k, amelyek az immunválaszt modulálják anélkül, hogy közvetlenül elpusztítanák a kórokozókat. E vizsgálat során az IDR-1002 csirke májsejtek immunválaszára gyakorolt hatásait tanulmányoztuk a korábban bemutatott modellünkön, citokin- és kemokin-szintek (IL-6, CXCLi2, IFN- γ , IL-16, IL-10, M-CSF és RANTES) mérésével, valamint a sejttéletképesség értékelésével.

Az IDR-1002-t 10, 30 és 90 $\mu\text{g/mL}$ koncentrációkban vizsgáltuk. A vizsgálat során önmagában alkalmazva nem mutatott szignifikáns citotoxicitást, ugyanakkor LTA-val kombinált alkalmazásakor, 90 $\mu\text{g/mL}$ koncentrációban, mérsékelt mértékben növelte az LDH-aktivitást, ami enyhe membránkárosodásra utal. Ezen kívül a peptid szignifikánsan növelte a RANTES és az M-CSF szinteket, amelyek mindegyike befolyásolja a makrofágok polarizációját: a RANTES elősegíti a gyulladások M1 makrofágok, míg az M-CSF a gyulladásokcsökkentő M2 makrofágok differenciálódását. Érdekes módon az IDR-1002 csökkentette mind a gyulladásokkeltő (IFN- γ , IL-6, IL-16), mind a gyulladásokcsökkentő (IL-10) citokinek szintjét, ami arra utal, hogy egy köztes, kevert makrofág fenotípust indukál.

A RANTES szintje pozitívan korrelált az IFN- γ , IL-16 és IL-10 szintekkel, míg az M-CSF negatívan korrelált a CXCLi2-vel, ami az immunjelátviteli utak összetett szabályozására utal. Bár korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy az IDR-1002 képes gyulladáskeltő citokinek szintjét növelni, jelen vizsgálatban az LTA által indukált IFN- γ , IL-6 és CXCLi2 szintek csökkenését eredményezte, ami más modellekből is ismert gyulladáscsökkentő hatással egyezik.

Az IDR-1002 továbbá csökkentette az LTA által kiváltott H₂O₂ szinteket, valószínűleg a Nrf2/KEAP1 útvonal aktiválásán keresztül, amely az antioxidáns válaszok szabályozásáért felelős. Az IDR-1002 és LTA együttes alkalmazása után emelkedett Nrf2-szinteket mértünk, valamint, míg a reaktív oxigénszármazékok (ROS) szintje csökkent, a karbonilált fehérjék szintje nőtt IDR-1002 alkalmazása mellett, ami valószínűleg a peptid biofilm ellenes aktivitásával állhat összefüggésben.

Összefoglalva, az IDR-1002 immunmoduláns és antioxidáns hatásokat mutatott az általunk alkalmazott csirke máj eredetű ko-kultúrán, csökkentve a gyulladáskeltő válaszokat, és a makrofág aktivitást egy kevert, köztes fenotípus felé terelve. Eredményeink alapján az IDR-1002 ígéretes terápiás ágens lehet bakteriális fertőzések által kiváltott gyulladások kezelésére, ugyanakkor további vizsgálatok szükségesek hatásmechanizmusának pontosabb feltérképezéséhez.

III. vizsgálat: a Cath-2 hatásai bél-explantátumokon

Ebben a vizsgálatban a Cath-2 AMP immunmoduláns és citotoxikus hatásait vizsgáltuk csirke bél-explantátum tenyészetben. Ellentétben a korábban májsejteken megfigyelt citotoxikus hatással, a Cath-2 a bélsejtek életképességére 5 és 10 nmol/mL koncentrációkban nem gyakorolt káros hatást. Érdekes módon 25 nmol/mL koncentrációban szignifikánsan növelte a metabolikus aktivitást, feltehetően a fokozott NADPH+H⁺ termelés révén, amely az immunválasz során az inflammaszómák aktiválásában és a zsírsavszintézisben játszik szerepet.

A Cath-2 gyulladásokeltő citokinek (IL-2, CXCLi2 és IL-6) felszabadulását indukálta, összhangban ismert hatásával, amellyel a veleszületett immunitást serkenti, például az NLRP-3 inflammaszóma aktiválásán keresztül. Ugyanakkor LTA által kiváltott gyulladásos környezetben a Cath-2 gyulladáscsökkentő tulajdonságokat mutatott. Szignifikánsan csökkentette az LTA által emelt IL-2, IL-6 szinteket és az IFN- γ /IL-10 arányt – amely a bél immunegyensúlyának jól ismert markere. Ezen felül helyreállította az IL-10 szintjét, amelyet az LTA csökkentett, ezzel védő, szabályozó hatásra utalva.

Bár az IFN- γ szintjét a Cath-2 nem változtatta meg, az IFN- γ /IL-10 arány csökkentése tovább erősíti gyulladáscsökkentő potenciálját. A legkifejezettebb szabályozó hatásokat a 25 nmol/mL koncentráció mutatta, amely egyidejűleg csökkentette a gyulladásokeltő citokinek felszabadulását és fokozta a gyulladáscsökkentő választ anélkül, hogy károsította volna a szövet életképességét.

Ezek az eredmények összhangban állnak korábbi tanulmányokkal, amelyek szerint a Cath-2 képes az olyan gyulladásos stimulusok, mint az LPS és az LTA semlegesítésére, valamint a makrofág aktiváció csökkentésére. Az IL-2 és IL-10, amelyek kulcsszereplők a bél immunválaszának szabályozásában, különösen érzékenyen reagáltak a Cath-2-re, ami a peptid krónikus gyulladást megelőző hatását támasztja alá.

Összefoglalva, a Cath-2 ígéretes terápiás szerként alkalmazható lehet a baromfi bélrendszeri gyulladásainak kezelésében. Kettős előnyt kínál: nem gyulladt környezetben védelmi immunválaszt serkent, míg kórokozó által kiváltott stressz esetén csökkenti a káros gyulladást.

IV. vizsgálat: az IDR-1002 hatásai bél-explantátumokon

Ebben a vizsgálatban az IDR-1002 immunmoduláns és citotoxikus hatásait vizsgáltuk csirke bél-explantátumokon. Az eredmények megerősítették, hogy az IDR-1002 megfelelő koncentrációkban nem citotoxikus, nem volt káros hatással a metabolikus aktivitásra. Érdekes

módon a 30 µg/mL koncentráció csökkentette az extracelluláris LDH-aktivitást, ami esetleges citoprotektív autofágiára utalhatott, bár ez a hipotézis nem igazolható.

A vizsgálat kimutatta, hogy az IDR-1002, különösen 30 µg/mL koncentrációban, növelte a gyulladásokeltő markerek (CXCLi2 és IL-2) termelődését, ami védelmi immunaktivációt jelezhet. Minden vizsgált koncentrációban nőtt az IL-2 szintje, összhangban a korábbi eredményekkel, amelyek az IL-2-t az immun-tolerancia fenntartásával és a krónikus bélgyulladások megelőzésével hozzák kapcsolatba. Ezen túlmenően, míg az LTA alkalmazása gyulladásos választ indukált – megemelte az IFN-γ, CXCLi2, IL-2, RANTES szinteket, valamint az IFN-γ/IL-10 arányt –, az IDR-1002 hatékonyan ellensúlyozta e hatásokat.

A vizsgált dózisok közül a 30 µg/mL IDR-1002 volt a leghatékonyabb az LTA által indukált CXCLi2, IL-2 és RANTES szintek csökkentésében, ami jelentős gyulladáscsökkentő potenciálra utal. Ezzel szemben a legmagasabb, 90 µg/mL dózis szignifikánsan növelte az IL-10 termelést és csökkentette az IFN-γ/IL-10 arányt, ami a gyulladáscsökkentő állapot irányába történő eltolódásra utalt, még akkor is, ha az IFN-γ szintje önmagában nőtt. Ez az eredmény hangsúlyozza az IL-10 szerepét a bélnyálkahártya immunegyensúlyának helyreállításában.

Összefoglalva, az IDR-1002 dóziszfüggő immunmoduláns hatást gyakorolt csirke bél-explantátumokra. Nem gyulladt környezetben fokozta a veleszületett védekező válaszokat IL-2 és CXCLi2 révén, míg LTA-indukált gyulladásos állapotban csökkentette a gyulladásos válaszokat, különösen a citokinszintek és az IFN-γ/IL-10 arány módosításával. Eredményeink alapján az IDR-1002 ígéretes terápiás jelölt lehet a bakteriális fertőzések okozta bélgyulladás kezelésére, de az optimális dózis meghatározásához további vizsgálatok szükségesek.

Konklúzió

Vizsgálataink egyértelműen bemutatták, hogy az AMP-k hatásai sokrétűek, és számos biológiai tényezőtől függenek. Ennek eredményeként két különböző AMP ugyanazon sejttípus immunválaszát eltérő módon befolyásolhatja, míg egy adott AMP különböző szövetekben vagy szervekben eltérő immunválaszokat válthat ki. Következésképpen megállapítható, hogy az AMP-k sejtszintű hatásainak alaposabb megértése elengedhetetlen, mielőtt klinikai kutatásokban alkalmazhatók lennének. Eredményeink ehhez a célhoz jelentős mértékben hozzájárulhatnak azáltal, hogy értékes adatokat szolgáltatnak a Cath-2 és az IDR-1002 peptidek által kiváltott sejtek életképességéről és immunválaszairól két *in vitro* modellrendszerben.

Új tudományos eredmények

1. Megbízható gyulladásos modellt sikerült létrehozni a hepatocita–nem-parenchimális sejt ko-kultúrákon. Az LTA, és kisebb mértékben a PMA hatékonyan indukálták a gyulladást, így alkalmazhatók immunmoduláns anyagok tesztelésére modellünkben.

2. A Cath-2 csökkentette a sejtek életképességét a hepatocita–nem-parenchimális sejt ko-kultúrákon, különösen 5 nmol/mL feletti koncentrációk esetén. A bél-explantátumok életképességét a Cath-2 nem csökkentette. Ezzel szemben az IDR-1002 sem a hepatocita–nem-parenchimális sejt kokultúra modellben, sem a bél-explantátumokban nem befolyásolta a sejtek életképességét.

3. A Cath-2 változatos szerepet játszott a hepatocita–nem-parenchimális sejt ko-kultúrák és a bél-explantátumok immunválaszának modulálásában. Mindkét modellben pro-inflammatorikus hatást fejtett ki önmagában, különösen magasabb koncentrációkban. Ugyanakkor anti-inflammatorikus hatást is mutatott, mivel enyhítette az LTA által kiváltott gyulladást mindkét modellben.

4. Az IDR-1002 összetett módon befolyásolta a hepatocita–nem-parenchimális sejt ko-kultúrák és a bél-explantátumok immunválaszát. Kimagasló gyulladáscsökkentő hatást fejtett ki, mivel csökkentette az LTA által kiváltott gyulladáskeltő citokin-felszabadulást mindkét modellben. Ugyanakkor a RANTES, M-CSF és egyéb citokin-koncentrációk alapján a hepatocita–nem-parenchimális sejt ko-kultúrákon az immunválaszt az anti- és proinflammatorikus állapot közötti köztes fázis felé terelte.

Saját tudományos közlemények

Az értekezés témájában megjelent tudományos közlemények

Sebők C, Tráj P, Vörösházi J, Mackei M, Papp M, Gálfi P, Neogrady Z, Mátis G (2021) **Two Sides to Every Question: Attempts to Activate Chicken Innate Immunity in 2D and 3D Hepatic Cell Cultures**. Cells 10:1910. <https://doi.org/10.3390/cells10081910>

Sebők C, Walmsley S, Tráj P, Mackei M, Vörösházi J, Petrilla J, Kovács L, Kemény Á, Neogrady Z, Mátis G (2022) **Immunomodulatory effects of chicken cathelicidin-2 on a primary hepatic cell co-culture model**. PLOS ONE 17:e0275847. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0275847>

Sebők C, Tráj P, Mackei M, Márton RA, Vörösházi J, Kemény Á, Neogrady Z, Mátis G (2023) **Modulation of the immune response by the host defense peptide IDR-1002 in chicken hepatic cell culture**. Sci Rep 13:14530. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41707-z>

Mátis G, Tráj P, Hanyecz V, Mackei M, Márton RA, Vörösházi J, Kemény Á, Neogrady Z, Sebők C (2024) **Immunomodulatory properties of chicken cathelicidin-2 investigated on an ileal explant culture**. Vet Res Commun 48:2527–2535. <https://doi.org/10.1007/s11259-024-10428-7>

Sebők C, Márton Rege A, Mackei M, Neogrady Z, Mátis G (2024) **Az antimikrobiális peptidek mint a fertőző betegségek elleni küzdelem új eszközei**. Antimicrobial peptides as new tools to combat infectious diseases. MÁL. 2024.03.181-191. <https://doi.org/10.56385/>

Mátis G, Tráj P, Hanyecz V, Mackei M, Márton RA, Vörösházi J, Kemény Á, Neogrady Z, Sebők C (2025) **Immunomodulatory effects of the Host Defense Peptide IDR-1002 investigated on chicken ileal explants**. – Under review

Nemzetközi konferencián történő részvétel (előadás vagy poszter prezentáció formájában)

Sebők C, Walmsley S, Tráj P, Mackei M, Vörösházi J, Kemény Á, Neogrady Zs, Mátis G (2022) **Immunomodulatory Effects of Chicken Cathelicidin-2 on a Primary Hepatic Cell Co-Culture Model**, 15th International Scientific Conference On Probiotics, Prebiotics, Gut Microbiota And Health, Pozsony, 2022.06.27-30.

Sebők, C; Tráj, P; Mackei, M; Kemény, Á; Neogrady, Zs; Mátis, G: **The immunomodulatory action of the antimicrobial peptide IDR-1002 in a hepatic cell culture model of chicken origin**, Proceedings of the 13th International Veterinary Immunology Symposium, Kruger National Park, South Africa. 17-21 November 2023, page 86, abstract 123., 2023

Magyarországi konferencián történő részvétel:

Kulcsár A, Sebők C, Mátis G, Talapka P, Hatala P, Petrilla J, Fébel H, Neogrady Zs (2017) **Az inzulin és a glukagon jelpálya különböző takarmányozási faktorok segítségével történő szabályozása broilercsirkében**, Akadémiai Beszámolók 2017. évi 44. füzet.

Sebők C, Orbán K, Mackei M, Vörösházi J, Neogrady Zs, Mátis G (2018) **A chicken heterophil peptide 1 (CHP-1) gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata csirke eredetű májsejtenyészeteken**, Akadémiai Beszámolók 2019. évi 46. füzet.

Sebők C, Vörösházi J, Mackei M, Tráj P, Szentgyörgyi Á, Neogrady Zs és Mátis G (2019) **Bakteriális sejtfalkomponensek hatásainak vizsgálata két-, illetve háromdimenziós csirke eredetű májsejtenyészeteken**, Akadémiai Beszámolók 2020. évi 47. füzet

Sebők C, Walmsley S, Tráj P, Mackei M, Vörösházi J, Kemény Á, Márton R A, Neogrady Zs, Mátis G (2022) **A cathelicidin-2 immunmoduláló hatásának vizsgálata csirke eredetű májsejtenyészeteken**, Akadémiai Beszámolók 2021. évi 48. füzet.

Sebők C, Tráj P, Mackei M, Márton R A, Vörösházi J, Kemény Á, Neogrady Zs és Mátis G (2023) **Az IDR-1002 immunmodulátor tulajdonságának vizsgálata csirke eredetű májsejt – nem-parenchimális sejt ko-kultúrán**, Akadémiai Beszámolók 2022. évi 49. füzet

Sebők C, Tráj P, Mackei M, Márton R A, Vörösházi J, Kemény Á, Neogrady Zs és Mátis G (2024) **Az IDR-1002 antimikrobiális peptid gyulladásos folyamatokra kifejtett hatásainak vizsgálata csirke eredetű vékonybél explantokon**, Akadémiai Beszámolók 2023. évi 50. füzet

Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó tudományos közlemények

Mackei M, Vörösházi J, Sebők C, Neogrady Z, Mátis G, Jerzsele Á (2020) **Fermented Wheat Germ Extract as a Redox Modulator: Alleviating Endotoxin-Triggered Oxidative Stress in Primary Cultured Rat Hepatocytes**. Oxid Med Cell Longev 2020:3181202. <https://doi.org/10.1155/2020/3181202>

Mackei M, Sebők C, Vörösházi J, Tráj P, Mackei F, Oláh B, Fébel H, Neogrády Z, Mátis G (2023) **Detrimental consequences of tebuconazole on redox homeostasis and fatty acid profile of honeybee brain.** Insect Biochem Mol Biol 159:103990. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2023.103990>

Mackei M, Mátis G, Molnár A, Sebők C, Vörösházi J, Pál L, Dublec K, Husvéth F, Neogrády Z (2021) **The relationship between small heat shock proteins and redox homeostasis during acute heat stress in chickens.** J Therm Biol 100:103040. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.103040>

Tráj P, Sebők C, Mackei M, Kemény Á, Farkas O, Kákonyi Á, Kovács L, Neogrády Z, Jerzsele Á, Mátis G (2023) **Luteolin: A Phytochemical to Mitigate S. Typhimurium Flagellin-Induced Inflammation in a Chicken In Vitro Hepatic Model.** Animals 13:1410. <https://doi.org/10.3390/ani13081410>

Tráj P, Herrmann EM, Sebők C, Vörösházi J, Mackei M, Gálfi P, Kemény Á, Neogrády Z, Mátis G (2022) **Protective effects of chicoric acid on polyinosinic-polycytidylic acid exposed chicken hepatic cell culture mimicking viral damage and inflammation.** Vet Immunol Immunopathol 250:110427. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2022.110427>

Hatala P, Lajos A, Mackei M, Sebők C, Tráj P, Vörösházi J, Neogrády Z, Mátis G (2023) **Feline Uroepithelial Cell Culture as a Novel Model of Idiopathic Cystitis: Investigations on the Effects of Norepinephrine on Inflammatory Response, Oxidative Stress, and Barrier Function.** Vet Sci 10:132. <https://doi.org/10.3390/vetsci10020132>

Petrilla J, Mátis G, Mackei M, Kulcsár A, Sebők C, Papp M, Gálfi P, Fébel H, Huber K, Neogrády Z (2022) **Modulation of Hepatic Insulin and Glucagon Signaling by Nutritional Factors in Broiler Chicken.** Vet Sci 9:103. <https://doi.org/10.3390/vetsci9030103>

Márton RA, Sebők C, Mackei M, Tráj P, Vörösházi J, Kemény Á, Neogrády Z, Mátis G (2024) **Cecropin A: investigation of a host defense peptide with multifaceted immunomodulatory activity in a chicken hepatic cell culture.** Front Vet Sci 11:1337677. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1337677>

Márton RA, Sebők C, Mackei M, Tráj P, Vörösházi J, Kemény Á, Neogrády Z, Mátis G (2024) **Pap12-6: A host defense peptide with potent immunomodulatory activity in a chicken hepatic cell culture.** PLOS ONE 19:e0302913. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0302913>

Vörösházi J, Mackei M, Sebők C, Tráj P, Márton RA, Horváth DG, Huber K, Neogrády Z, Mátis G (2024) **Investigation of the effects of T-2 toxin in chicken-derived three-dimensional hepatic cell cultures.** Sci Rep 14:1195. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-51689-1>

Hatala P, Sebők C, Mackei M, Kárpáti K, Gálfi P, Neogrády Z, Mátis G (2023) **Molecular effects of intermittent stress on primary feline uroepithelial cell culture as an in vitro model of feline idiopathic cystitis.** Front Vet Sci 10:1258375. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.125837>

Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni hálámat mindazoknak, akik támogattak és segítettek doktori tanulmányaim során. Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Neogrady Zsuzsannának és Dr. Mátis Gábornak értékes útmutatásukért, szakmai tudásukért és folyamatos bátorításukért. Türelmük és meglátásaik alapvető szerepet játszottak szakmai fejlődésemben és e disszertáció elkészítésében.

Külön köszönöm legközelebbi kollégámnak, Mackei Máténak kitartó támogatását. Máté mindig segített eligazodni a kihívások között, nemcsak szakmai tanácsokkal, hanem baráti támogatással is mellettem állt, különösen akkor, amikor a legnagyobb szükségem volt rá. Különösen hálás vagyok Kemény Ágnesnek a Luminex-módszerhez nyújtott szakértelméért és segítségéért, amely alapvető volt vizsgálataim sikeréhez.

Hálás vagyok további munkatársaimnak is: Tráj Patriknak, Vörösházi Júliának és Márton Rege Annának, akik közreműködése a laboratóriumi munkában és különféle feladatok elvégzésében nagyban megkönnyítette és élvezetesebbé tette a munkát. Segítségük és barátságuk valódi értéket jelentett számomra az elmúlt évek során. Külön köszönet illeti Pálincás Szilviát, Seprődi Júliát, Petrovics Gabriellát, Szikora Zsuzsannát és Fodor Emesét, akik elengedhetetlenül hozzájárultak tanszékünk zavartalan működéséhez és kutatásom sikeréhez.

Továbbá szeretném megköszönni TDK-s hallgatóimnak – Szentgyörgyi Ákosnak, Stephanie Walmsley-nek, Vágvölgyi Petrának, Ujházy Andrásnak és Hanyecz Viktóriának – a kutatásban nyújtott segítségüket és elkötelezettségüket közös munkánk iránt.

Szívből jövő köszönetemet szeretném kifejezni férjemnek, Papp Mártonnak, akinek meggingathatatlan támogatása – érzelmi és szellemi értelemben egyaránt – pótolhatatlan volt ezen folyamat során. Végül, de nem utolsósorban szeretném köszönetemet kifejezni családomnak és barátaimnak a szeretetükért, bátorításukért és megértésükért. Támogatásuk motivációt adott, és segített átvészelni a legnehezebb pillanatokat ezen az úton.