Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

IN VITRO MODELLEK LÉTREHOZÁSA KUTYÁK IDÜLT GYULLADÁSOS BÉLBETEGSÉGEINEK TANULMÁNYOZÁSÁRA

dr. Móritz Alma Virág

Témavezetők: Dr. Farkas Orsolya

Dr. Psáder Roland



ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Állatorvostudományi Doktori Iskola

Budapest, 2026

Témavezetők és témabizottsági tagok

…….

Dr. Farkas Orsolya

Tudományos főmunkatárs

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, Állatorvostudományi Egyetem

Témavezető

…….

Dr. Psáder Roland

Egyetemi docens

Belgyógyászati Tanszék és Klinika, Állatorvostudományi Egyetem

Témavezető

Dr. Mátis Gábor

Egyetemi docens

Élettani és Biokémiai Tanszék, Állatorvostudományi Egyetem, Budapest

Témabizottsági tag

Dr. Jerzsele Ákos

Egyetemi docens

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, Állatorvostudományi Egyetem, Budapest

Témabizottsági tag

Készült 8 példányban. Ez a(z) …… számú példány.

…….

dr. Móritz Alma Virág

Tartalomjegyzék

1 A doktori értekezés előzményei és célkitűzései 4
2 Az értekezés új tudományos eredményei 7
3 A doktori értekezés témájában született publikációk 9

1 A doktori értekezés előzményei és célkitűzései

A kutyák krónikus gyulladásos enteropátiája (CIE) gyakori, komplex kórkép, amely tartós gasztrointesztinális tünetekkel – többek között hányással, hasmenéssel, étvágytalansággal és testsúlycsökkenéssel – jár, és jelentősen rontja az érintett állatok életminőségét. A betegség lefolyása rendszerint hullámzó, patogenezise pedig multifaktoriális: a bél immunrendszerének szabályozási zavara, a bélhám barrierfunkciójának károsodása, valamint a bélmikrobiom egyensúlyának felborulása egyaránt szerepet játszik kialakulásában és fennmaradásában. A barrierfunkció sérülése következtében a bél lumenében található mikroorganizmusok és azok komponensei – különösen a Gram-negatív baktériumok lipopoliszacharidjai (LPS) – a keringésbe juthatnak, hozzájárulva egy kismértékű, de tartós szisztémás gyulladásos állapot, az ún. metabolikus endotoxémia kialakulásához. Az LPS által kiváltott immunaktiváció fokozott reaktív oxigén- és nitrogénszármazék-termeléssel jár, amely oxidatív stresszhez vezet. Ez a folyamat tovább károsítja a bélhámot, rontja a barrier integritását, és elősegíti további bakteriális komponensek transzlokációját, ezáltal egy önfenntartó, patológiás körfolyamatot hozva létre. Mindez magyarázatot adhat arra, hogy a CIE egyes eseteiben miért nehéz tartós klinikai javulást elérni kizárólag hagyományos terápiás módszerekkel. A jelenlegi terápiás megközelítések elsősorban diétás beavatkozáson, a bélmikrobióta modulációján és immunszuppresszív szerek alkalmazásán alapulnak. Bár ezek a kezelések sok esetben hatékonyak, hosszú távú alkalmazásuk jelentős mellékhatásokkal járhat. Ennek következtében egyre nagyobb az igény olyan kiegészítő vagy alternatív terápiás lehetőségek iránt, amelyek képesek mérsékelni a gyulladást és az oxidatív stresszt, valamint támogatják a bél barrierfunkcióját.

Az utóbbi években a természetes eredetű bioaktív vegyületek, mint például a flavonoidok, egyre inkább a kutatások fókuszába kerültek. Ezek a növényi másodlagos metabolitok széles körben előfordulnak a táplálékban, és számos kedvező biológiai hatással rendelkeznek, beleértve az antioxidáns, gyulladáscsökkentő és immunmoduláló tulajdonságokat. A flavonoidok – például a kvercetin, a luteolin és a szőlőmagból származó proantocianidinek (GSOP) – képesek semlegesíteni a reaktív oxigénszármazékokat, befolyásolni egyes gyulladásos jelátviteli útvonalakat, valamint csökkenteni a gyulladásos

mediátorok termelődését. Emellett egyes adatok szerint kedvezően hatnak a bélmikrobiom összetételére és a bélhám integritására is. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a flavonoidok képesek mérsékelni az LPS által kiváltott gyulladásos és oxidatív folyamatokat, ezáltal csökkenteni a szisztémás endotoxin-terhelést, és hozzájárulni a CIE patológiás folyamatainak enyhítéséhez. Ennek vizsgálatához azonban olyan megbízható és reprodukálható kísérletes modellekre van szükség, amelyek alkalmasak a lokális és szisztémás gyulladásos folyamatok tanulmányozására.

Doktori kutatásom átfogó célja ezért olyan, kutyák krónikus bélgyulladásához kapcsolódó *in vitro* modellrendszerek kialakítása és alkalmazása volt, amelyek segítségével vizsgálható az oxidatív stressz és a gyulladás mechanizmusa, valamint a természetes eredetű flavonoidok hatásai. Kiemelt figyelmet fordítottam a kvercetin, a luteolin és a GSOP antioxidáns, gyulladásmoduláló és potenciális antibakteriális tulajdonságainak értékelésére. A kutatás egyik fő irányát a szisztémás endotoxin-terhelés modellezése jelentette. Ennek során kutya eredetű perifériás vér mononukleáris sejteket (PBMC) és polimorfonukleáris sejteket (PMN) alkalmaztam. A gyulladásos és oxidatív válasz kiváltására különböző eredetű LPS-eket használtam, beleértve az *Escherichia coli* O111:B4 és a *Salmonella* Enteritidis törzsekből származó LPS-t, valamint szeptikémiás esetekből izolált, kutya eredetű *E. coli* törzseket. A modell optimalizálása során összehasonlítottam a PBMC- és PMN-alapú rendszerek alkalmazhatóságát, és megállapítottam, hogy a PBMC-kultúrák alkalmasabbak a vizsgált folyamatok reprezentálására. A standardizált modellben vizsgáltam a flavonoidok hatását 25 és 50 µg/ml koncentrációban, önállóan, illetve LPS- vagy baktérium-stimulációval kombinálva. A sejtek metabolikus aktivitását CCK-8 teszttel, míg a citotoxicitás mértékét az extracelluláris laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitás mérésével határoztam meg. Az oxidatív stressz jellemzésére intracelluláris reaktív oxigénszármazék (ROS) szintet, valamint extracelluláris hidrogén-peroxid (H_2O_2) és reaktív nitrogénszármazék (RNS) szinteket mértem. A gyulladásos válasz értékelése során elsősorban a TNF-α koncentráció változását követtem.

A vizsgálatok kiterjedtek a flavonoidok antibakteriális hatásának elemzésére is. Kutya eredetű *E. coli* törzseken mikrohígításos módszerrel határoztam meg a minimális gátló koncentrációt (MIC) és a mutáns prevenciós koncentrációt (MPC), valamint értékeltem a

flavonoidok és az enrofloxacin kombinációjának hatását frakcionált gátlási index (FIC) számításával.

A doktori munka másik fontos pillére egy duodenális explantátum alapú *in vitro* modell kialakítása volt, amely lehetővé tette a lokális gyulladásos és oxidatív folyamatok vizsgálatát. Egészséges kutyák duodenumából származó, punch technikával előállított explantátumokat alkalmaztam, amelyeket 12 órás inkubáció során LPS-sel (*E. coli* O111:B4 és *S. Enteritidis*), flavonoidokkal (25 és 50 μg/ml), illetve ezek kombinációjával kezeltem. A rendszerben vizsgáltam a sejtek életképességét (CCK-8), az alkalmazott vegyületek citotoxicitását (LDH), az oxidatív és nitrozatív stressz markereit (intracelluláris ROS, extracelluláris H_2O_2 és RNS), valamint a gyulladásos citokinek – TNF-α és IL-6 – termelődését.

Összességében kutatásom célja annak feltárása volt, hogy a vizsgált flavonoidok milyen mértékben képesek befolyásolni az LPS által indukált gyulladásos és oxidatív folyamatokat, mind szisztémás, mind lokális modellrendszerekben. Eredményeim hozzájárulhatnak annak megértéséhez, hogy ezek a természetes bioaktív vegyületek milyen mechanizmusokon keresztül mérsékelhetik a CIE-hez társuló kóros folyamatokat, és alapot szolgáltathatnak olyan kiegészítő terápiás stratégiák kidolgozásához, amelyek hosszú távon csökkenthetik az antibiotikumok és immunszuppresszív szerek alkalmazásának szükségességét.

2 Az értekezés új tudományos eredményei

Elsőként igazoltuk kutya perifériás vér immunsejtjein, hogy az *Escherichia coli* és *Salmonella* Enteritidis eredetű LPS, valamint kutya eredetű *Escherichia coli* izolátumok kifejezett oxidatív és gyulladásos választ indukálnak, amelyet az intracelluláris ROS- és TNF-α-termelés növekedése jellemez. Kimutattuk továbbá, hogy a kvercetin, luteolin és GSOP szignifikánsan mérséklik ezeket a válaszokat citotoxikus hatás nélkül, miközben direkt antibakteriális aktivitásuk csekély és enrofloxacinnal nem mutatnak antagonizmust. Eredményeinkkel párhuzamosan létrehoztunk egy kutya duodenális explantátum modellt, amelyben igazoltuk, hogy a vizsgált flavonoidok hatékonyan csökkentik az LPS-indukált oxidatív stresszt és gyulladásos citokin (TNF-α, IL-6) termelést, alátámasztva immunmoduláló szerepüket és a modell alkalmazhatóságát a bél gyulladásos folyamatainak vizsgálatában.

A kutatás főbb eredményei a következők:

1. Igazoltam, hogy az 1 μg/ml koncentrációjú *E. coli* és *S. Enteritidis* eredetű LPS kezelés PBMC-sejtekben kifejezett oxidatív és gyulladásos választ (ROS-, TNF-α-termelés) indukál, míg a metabolikus aktivitást nem befolyásolja számottevően.
2. Kimutattam, hogy a 25 és 50 μg/ml koncentrációjú kvercetin és a luteolin szignifikánsan csökkenti az *E. coli* és *S. Enteritidis* LPS-indukált intracelluláris ROS-szintet a PBMC- és a PMN-sejtekben, citotoxikus hatás nélkül, illetve megállapítottam, hogy a kvercetin 50 μg/ml és a luteolin 25 és 50 μg/ml koncentrációjú kezelése hatékonyan mérsékli az LPS-indukált TNF-α-termelést a PBMC-kben.
3. Igazoltam, hogy a kutya eredetű *E. coli* izolátumok törzs- és kezelési mód függően oxidatív stresszt és proinflammatorikus választ váltanak ki PBMC-sejtekben és kimutattam, hogy *E. coli*-val stimulált PBMC-sejtekben a kvercetin, a luteolin és a GSOP 25 és 50 μg/ml koncentrációja szignifikánsan csökkenti a baktérium-indukált ROS- és TNF-α-termelést.
4. Megállapítottam, hogy a vizsgált flavonoidok direkt antibakteriális aktivitása csekély, és enrofloxacinnal nem mutatnak antagonizmust, ezért biztonságosan adhatók enrofloxacinnal együtt, de hatásuk elsősorban az immunmodulációhoz köthető.

5. Létrehoztam egy kutya duodenális explantátum modellt, amely alkalmas oxidatív stressz és gyulladás vizsgálatára *in vitro* körülmények között. Igazoltam, hogy a kvercetin, luteolin és GSOP a kutya duodenális explantátum modellben csökkenti az *E. coli* és *S. Enteritidis* LPS-indukált oxidatív stresszt, valamint mérséklik a TNF-α felszabadulást sejtkárosodás nélkül, továbbá a kvercetin és a luteolin 25 μg/ml koncentrációjú kezelése csökkentette az IL-6 mennyiségét is a kezeletlen kontrollhoz képest.

Eredményeim igazolják, hogy az LPS és kutya eredetű *E. coli* törzsek jelentős oxidatív és gyulladásos választ indukálnak kutya immunsejtekben, míg a kvercetin, luteolin és GSOP ezt sejtkárosító hatás nélkül, elsősorban immunmoduláló mechanizmusokon keresztül hatékonyan mérséklik; továbbá a létrehozott duodenális explantátum modell alkalmasnak bizonyult ezen folyamatok *in vitro* vizsgálatára. Eredményeink alapján a vizsgált flavonoidok ígéretes kiegészítő terápiás lehetőséget jelenthetnek kutya krónikus gyulladásos enteropátiái esetén.

3 A doktori értekezés témájában született publikációk

Lektorált folyóiratban megjelent közlemények

Móritz A.V.; Jerzsele Á.; Psáder R.; Farkas O. **Kutya bélrendszeri megbetegedéseinek *in vitro* modellezési lehetőségei - Irodalmi összefoglaló.** *Magyar Állatorvosok Lapja* 2023, 145 (8) 477-486. ISSN 0025-004X. (Q2)

Móritz, A.V.; Kovács, H.; Jerzsele, Á.; Psáder, R.; Farkas, O. **Flavonoids in Mitigating the Adverse Effects of Canine Endotoxemia.** *Frontiers in Veterinary Science* 2024, 11, doi:10.3389/fvets.2024.1396870. (D1)

Móritz, A.V.; Fónagy, V.; Psáder, R.; Jerzsele, Á.; Farkas, O. **Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of Quercetin, Luteolin, and Proanthocyanidins in Canine PBMCs Stimulated with *Escherichia Coli.*** *Animals* 2025, 15, doi:10.3390/ani15243622. (VetQ1)

Móritz, A.V.; Horváth N.L., Márton, RA.; Szilasi A.; Jerzsele, Á.; Psáder, R.; Farkas, O. **Anti-Inflammatory Effects of Flavonoids in an LPS-Induced *In Vitro* Model of Canine Chronic Enteropathy.** *Animals* 2026, 16, doi: 10.3390/ani16030450. (VetQ1)

Konferencia prezentációk

Móritz AV, Kovács H, Psáder R, Farkas O, **Flavonoidok szerepe kutya endotoxémia káros hatásainak mérséklésében.** MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Magyarország, 2024.

Móritz AV, Jerzsele Á, Psáder R, Farkas O, **Flavonoidok immunmoduláns hatása kutya PBMC modellben.** MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Magyarország, 2026.