Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Növényi és gomba eredetű anyagcseretermékek gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata házityúk *in vitro* modelleken

Dr. Tráj Patrik

Témavezetők: Dr. Mátis Gábor PhD
Prof. Dr. Gálfi Péter DSc

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
Állatorvostudományi Doktori Iskola

Budapest, 2025.

Témavezetők:

.....

Prof. Dr. Gálfi Péter DSc

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

Állatorvostudományi Egyetem, Budapest

Témavezető

.....

Dr. Mátis Gábor PhD

Élettani és Biokémiai Tanszék, Biokémiai Osztály

Állatorvostudományi Egyetem, Budapest

Témavezető

.....

Dr. Tráj Patrik

Bevezetés

A baromfihús, mint viszonylag egészséges és olcsó élelmiszer, elsődleges fehérjeforrássá vált világviszonylatban. A növekvő kereslet, illetve fogyasztói elvárások miatt a baromfiipar jelentős kihívásokkal szembesül. Komoly aggodalomra ad okot az antibiotikumok túlzott használata, amely antimikrobiális rezisztencia (AMR) kialakulásához vezetett, veszélyeztetve mind az állatok, mind az emberek egészségét. A felelős antibiotikumhasználat jegyében előtérbe kerültek az alternatív, természetes hozamfokozók, mint a probiotikumok, a prebiotikumok és növényi eredetű kivonatok. A baromfiállományokat érő, az intenzív termeléssel járó túlzott stressz tovább súlyosbítja a fertőzések és az állatjóléti szempontból nem ideális tartásmód okozta negatív hatásokat. Mindezek károsíthatják az immunrendszert és bélcsatorna állapotát, csökkentve az emésztés hatékonyságát és így a takarmányhasznosulást.

A bakteriális és vírusos fertőzések a csirkék termelékenységére is hatással vannak. A gyomor-bél traktus a szervezet legnagyobb felületű, exogén anyagoknak kitett felülete, így kritikus szerepet játszik az immunvédelemben. Élettani körülmények között a bél tolerálja a takarmányösszetevőket és a kommenzalista mikroorganizmusokat, azonban a kórokozók bejutása esetén gyulladásos válasz indul be. Ez a reakció az emésztőtraktusban kezdődik, ahol a patogén-asszociált molekuláris mintázatok (PAMP-ok) aktiválják a veleszületett immunrendszert, különösen az enterociták, a dendritikus sejtek és az intraepiteliális limfociták felületén jelen lévő Toll-like receptorok (TLR-ek) révén. Az enterocitákat érintő gyomor-bélrendszeri betegségek, mint például a satnyaság és törpenövés szindróma (RSS), az elhalásos bélgyulladás és a diszbiózis károsítják a bélbarriert. Az túlzottan áteresztővé váló bélfalon a PAMP-ok, illetve más kórokozó eredetű melléktermékek (pl. toxinok), további gyulladáskeltő anyagok (pl. citokinek, károsodáshoz kötött molekuláris mintázatok fDAMP-ok]) a portális erek útján eljuthatnak a májba, majd a szisztémás keringésbe. A máj sejtjei, a hepatociták és a Kupffer-sejtek részt vesznek a kórokozók kiszűrésében, valamint a gyulladásos citokinek és akut fázis fehérjék termelésében. A sejtek közötti kommunikáció szabályozásának zavara súlyos oxidatív stresszhez, sejtkárosodáshoz és krónikus gyulladáshoz vezet, ami csökkenti az állatok immunválaszának hatékonyságát, az egyed növekedését és termelékenységét. A bél és a máj közötti komplex kölcsönhatás rávilágít a gyomor-bélrendszer és a máj egészségét egyaránt célzó beavatkozások szükségességére. A vírusos betegségek, mint például az RSS és a fertőző bursitis (IBD), jelentősen ronthatják a baromfi immunrendszerének működését, még a szakszerűen vakcinázott állományokban is. Ezek a kórokozók jelentősen ronthatják az immunválasz hatékonyságát.

A növényi és gomba eredetű másodlagos anyagcseretermékek jelentős figyelmet kaptak gyulladáscsökkentő, antioxidáns és sejtvédő tulajdonságaik miatt. A legfontosabb gomba eredetű anyagok között említhetők a poliszacharidok, a terpenoidok és az alkaloidok,

amelyekről bebizonyosodott, hogy befolyásolják az immunválaszt, csökkentik az oxidatív stresszt és fokozzák a sejtek repair mechanizmusait. Hasonlóképpen, a növényi eredetű másodlagos metabolitok, beleértve a fenoloidokat, az alkaloidokat és a terpéneket, szabályozzák a gyulladásos útvonalakat, fenntartják a redox homeosztázist. A jelen disszertáció egy fenoloid kávésav származékra, egy flavonoidra, valamint egy gomba eredetű nukleozid-származékra összpontosít, amelyek immunmoduláló hatással bírhatnak.

A citokinek és a reaktív oxigénszármazékok (ROS) túltermelése súlyosbítja a szöveti károsodást, akadályozva az állat élettani növekedését. Az antibiotikumokkal kapcsolatos jelenlegi egészségügyi problémák (pl. AMR) és az antivirális gyógyszerek használatának limitációi miatt az antibakteriális, antivirális és immunmoduláló hatással bíró természetes anyagok a kutatás fókuszába kerültek. A cikóriasav (CA), a luteolin és a cordycepin, három hatékony természetes vegyület ígéretes lehet emlős sejtvonalakon és állatmodelleken elvégzett vizsgálatok, szakirodalmi adatok alapján, azonban a baromfi eredetű modelleken végzett vizsgálatok száma csekély. A CA, amely gyulladáscsökkentő és antioxidáns tulajdonságairól ismert, mind *in vitro*, mind *in vivo* körülmények között csökkentette a gyulladáskeltő citokintermelést és az oxidatív stresszt. Ez a fenoloid jellemzően az *Asteraceae* család bizonyos tagjaiban (pl. mezei katáng és *Echinacea* fajok) található, immunmoduláló és feltételezett antivirális hatása miatt különös jelentőséggel bírhat a baromfigyógyászatban. A luteolin, egyes zöldségekben és gyógynövényekben található flavonoid, mely gyulladáscsökkentő, antioxidáns és immunmoduláló hatással rendelkezik. *A Cordyceps militaris ún.* "gyógygomba" származékaként előállított cordycepin antivirális és gyulladáscsökkentő tulajdonságokkal bír, valamint gátolja az RNS-szintézist a vírusok replikációja során. Továbbá a cordycepin a gyulladásos válasz kialakulásának több jól definiált pontjára is hatással van, csökkentheti a gyomor-bél traktus gyulladását, ezáltal javítva brojlercsirkék általános egészségét és termelékenységét.

Célkitűzés

Egyre több *in vivo* vizsgálat bizonyítja, hogy a korábban antibiotikumok szubterápiás dózisú alkalmazásával elért hozamfokozó hatás természetes takarmány-adalékanyagokkal is elérhető baromfiban. A növényi és gomba eredetű metabolitokról szóló tudományos szakirodalom részletes és átfogó, azonban a közlemények túlnyomó többségében emlősmodellek alkalmazásáról olvashatunk. A baromfihús-előállítás viszonylag kis haszonkulccsal folyik, ezért rendkívül érzékeny a termelési költségek emelkedésére. Mivel a brojleripar az élelmiszer-termelés egyik legintenzívebb ágazata, véleményem szerint minden olyan megközelítés, amely a végtermék mennyiségének és minőségének javítását célozza, nagy jelentőséggel bírhat az ágazat szempontjából.

Az *in vitro* vizsgálatok elkerülhetetlenek takarmány-adalékanyagok és gyógyhatású készítmények fejlesztéséhez. Egy gyulladásos csirkemáj modell létrehozása céljából potenciálisan gyulladáskeltő anyagok (flagellin, poliinozin-policitidilsav [poly I:C] és lipopoliszacharid [LPS]) hatásának vizsgálatát végeztük el. A szakirodalom szerint a belet jellemző komplex sejt-sejt kölcsönhatások nehezen reprodukálhatóak *in vitro*. Ezt a hátrányt küszöbölik ki az explantátum-rendszerek, mivel megfelelnek a laboratóriumi állatkísérletekkel szemben támasztott elvárásoknak, így a 3R-elveinek is, ugyanis egyetlen állatból több kultúra előállítását teszik lehetővé. Továbbá, az explantátumok modellezik a bél komplex viszonyait, ugyanakkor azonban érzékenyek a hipoxia okozta sejtkárosodásra. Mindezek ellenére a szakirodalomban korlátozott számú egységes mérettel bíró explantátum modell előállításra alkalmas protokoll kerül ismertetésre. A disszertáció egy újonnan kidolgozott, a fent említett kritériumoknak megfelelő csirke ileum *ex vivo* explantátum modell előállításának módszertani ismertetését is tartalmazza.

A doktori értekezés célkitűzéseit az alábbiakban foglalom össze:

Ad 1, az LPS, a flagellin és a poly I:C potenciális gyulladáskeltő hatásának vizsgálata a korábban jellemzett csirke primer hepatocita – nem-parenchimális sejt kokultúrán.

Ad 2, egységes, meghatározott átmérővel bíró csirke ileum explantátum kultúrák létrehozása és jellemzése, valamint a lipoteichosav (LTA), flagellin és poly I:C potenciális gyulladáskeltő hatásának tesztelése ezen a kultúrán.

Ad 3, a cikóriasav feltételezett gyulladáscsökkentő és sejtvédő hatásának vizsgálata a poly I:C-vel kezelt csirke primer hepatocita – nem-parenchimális sejt kokultúrán.

Ad 4, a luteolin feltételezett gyulladáscsökkentő és sejtvédő hatásának vizsgálata a flagellinnel kezelt csirke primer hepatocita – nem-parenchimális sejt kokultúrán.

Ad 5, *a Cordyceps militaris* kivonat feltételezett gyulladáscsökkentő és sejtvédő hatásának vizsgálata poly I:C-vel kezelt csirke ileum explantátum kultúrán**.**

A fenti célok eléréséhez a következő vizsgálati tervet követtük.

	Modell	**Kezelőanyagok**	**Sejtek életképességi paraméterei**	**Gyulladásos paraméterek**	**Redox paraméterek**
I. előkísérlet	Csirke primer hepatocita – nem-parenchimális sejt kokultúra	LPS, flagellin, poly I:C	Metabolikus aktivitás és extracelluláris laktát-dehidrogenáz (LDH)-aktivitás	IL-6 és IL-8 koncentrációk	-
I.A. kísérlet	Csirke primer hepatocita – nem-parenchimális sejt kokultúra	poly I:C, cikóriasav, N-acetilcisztein	Metabolikus aktivitás és extracelluláris LDH-aktivitás, kaszpáz-3 szint	IL-6, IL-8, IL-10, IFN-α, IFN-γ, M-CSF koncentrációk	MDA szint
I.B. kísérlet	Csirke primer hepatocita – nem-parenchimális sejt kokultúra	flagellin, luteolin	Metabolikus aktivitás és extracelluláris LDH-aktivitás	IL-6, IL-8, IL-10, IFN-α, IFN-γ koncentrációk	H_2O_2, MDA szint
II. előkísérlet	Csirke ileum explantátum	LTA, flagellin, poly I:C	Metabolikus aktivitás és extracelluláris LDH-aktivitás	IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IFN-α, IFN-γ, RANTES koncentrációk	-
II. kísérlet	Csirke ileum explantátum	poly I:C, *Cordyceps militaris* kivonat	Metabolikus aktivitás és extracelluláris LDH-aktivitás	IL-1β, IL-6, IFN-γ, RANTES koncentrációk	H_2O_2, MDA szint

Anyag és módszer

Sejtek izolálása és az explantok kimetszése

A csirke primer hepatocita – nem-parenchimális sejt kokultúra sejtjeinek izolálásához, illetve az ileum explantátumok nyeréséhez minden kísérletben egy 3 hetes hím Ross-308 brojlercsirkét használtunk fel. Az állatokat a tenyésztő irányelveinek megfelelően tartottuk és takarmányoztuk a kísérlet napjáig. A kísérleteket az intézményi irányelveknek megfelelően, a Zala Megyei Kormányhivatal jóváhagyásával hajtottuk végre (engedély száma: GK-419/2020; kiadás dátuma: 2020. május 11.). A csirke CO_2-os narkózisát követően az állatot dekapitáltuk. Ezután a máj portális rendszerét a *vena gastropancreaticoduodenalis*-on keresztül perfundáltuk, majd a sejtfrakciókat differenciáló centrifugálással különítettük el. A sejtszuszpenziókat 6:1 arányban (hepatociták és nem-parenchimális sejtek) elegyítettük, majd a sejteket az előzőleg I. típusú kollagénnel bevont 24-lyukú és 96-lyukú lemezekre tettük le.

Az ileum explantátum tenyészetek létrehozása esetén egy 15 cm hosszú ileum szakaszt óvatosan eltávolítottunk, majd megtisztítottuk azt a savóshártya felszínén lévő zsírszövettől. Alaposan, több lépésben átmostuk a bélszakaszt penicillin-sztreptomicin (Pen-Strep) tartalmú foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS), majd steril felületen további lépéseket alkalmazva hoztuk létre a tenyészeteket:

1. A hosszában felnyitott bélszakaszt a nyálkahártya felőli oldalával felfele egy steril, hűtött üveglapra helyeztük, majd a szegmenst óvatosan és egyenletesen az üveglaphoz erősítettük tárgylemezek segítségével.
2. A bélminták felületét gyakran mostuk jéghideg Pen-Strep tartalmú PBS oldattal fecskendő segítségével, hogy a szövet ne száradjon ki.
3. Az explantátum kimetszését egy biopsziás körkés mintavevővel végeztük, amelyet merőlegesen az üveglapra helyeztünk, és körkörös mozdulatokkal metszettük ki az egyes explantátumokat.
4. A kivágott explantátumokat az eszköz dugattyújával közvetlenül az előkészített, táptalajjal feltöltött sejttenyésztő edények lyukaiba helyeztük.
5. A Peyer-plakkokat elkerültük. Az explantátum mintákat csoportonként egy-egy darabot lerakva vettük, hogy minimalizálják a csoportok közötti különbségeket.

Az egyes vizsgálatokban mért paraméterek a 6. oldalon található táblázatban kerülnek bemutatásra.

I. előkísérlet: Máj eredetű gyulladásos modell létrehozása

A tenyészeteket 24 órás kezelésnek vetettük alá. Kezelőanyagként 10 vagy 50 µg/ml *Escherichia coli* (O55:B5) LPS-t, 100 vagy 250 ng/ml *Salmonella* Typhimurium flagellint, vagy

50 vagy 100 µg/ml poly I:C-t alkalmaztunk, emellett kezeletlen kontroll csoportokat is kialakítottunk.

I.A kísérlet: A cikóriasav hatása a máj eredetű gyulladásos modellre

A tenyészeteket a csirke primer hepatocita – nem-parenchimális sejt kokultúra modell protokolljának megfelelően izoláltuk és tenyésztettük. A 24 órás vizsgálat során az alábbi kezeléseket alkalmaztuk a kezeletlen kontroll mellett. A vírus által kiváltott gyulladás modellezésére 50 µg/ml poly I:C-vel kiegészített tápfolyadékot használtunk, további csoportok tápfolyadékát 100 vagy 200 µg/ml N-acetilciszteinnel (NAC) és 10 vagy 100 µg/ml CA-val egészítettük ki. A kombinációs kezelési csoportok tápfolyadékába 50 µg/ml poly I:C és 100 vagy 200 µg/ml NAC, illetve 50 µg/ml poly I:C és 10 vagy 100 µg/ml CA került.

I.B kísérlet: A luteolin hatása a máj eredetű gyulladásos modellre

A tenyészeteket a csirke primer hepatocita – nem-parenchimális sejt kokultúra modell protokolljának megfelelően izoláltuk és tenyésztettük. A 24 órás vizsgálat során az alábbi kezeléseket alkalmaztuk a kezeletlen kontroll mellett. A sejtek tápfolyadékát 250 ng/ml koncentrációban *Salmonella* Typhimuriumból származó flagellinnel, illetve 4 vagy 16 µg/ml luteolinnal egészítettük ki, továbbá flagellin (250 ng/ml) és luteolin (4 vagy 16 µg/ml) kombinációs kezeléseket alkalmaztunk.

II. előkísérlet: Bél eredetű gyulladásos modell létrehozása

Az explantátumokat az ileum explantátum modell protokollja szerint nyertük. A II.1 előkísérletben az 1 és 2 mm átmérőjű explantátum-tenyészetek életképességét, sejtmembrán-károsodását és szövettani jellemzőit vizsgáltuk. Ennek során hat 1 és 2 mm átmérőjű explantátumot pufferolt formalinban fixáltunk biopsziás szivacsokon szövettani vizsgálat céljából (H&E festés). A fennmaradó explantátumokat közvetlenül a tenyésztőedényekbe raktuk le. Térfogatukkal arányosan az 1 mm-es explantátumokat 100 µl tápfolyadékban, 96 lyukú, míg a 2 mm-es explantátumokat 400 µl tápfolyadékban, 24 lyukú tenyésztőedényekben tenyésztettük. Az explantátumok tápfolyadékát 1 óra elteltével, majd 12 óránként cseréltük.

A II.1 előkísérlet eredményei alapján és technikai okokból a II.2 előkísérletben a legkisebb kezelhető, 1,5 mm átmérőjű explantátumokat tenyésztettük. Öt explantátumot 96 lyukú lemezen 200 µl tápfolyékban inkubáltunk, hogy 12 óra elteltével szövettani vizsgálatnak vessük alá (H&E festés festés és páncitokeratin immunhisztokémia).

A II.1 és II.2 előkísérlet eredményei alapján a II.3 előkísérletben 1,5 mm átmérőjű explantátumokat metszettünk ki. A mintákat 200 µl tápfolyadékba helyeztük 96-lyukú lemezeken. Egy óra elteltével a tápfolyadékot a következő kezelőoldatokra cseréltük: 10 vagy 50 µg/ml *Staphylococcus aureus* eredetű LTA vagy 100 és 250 ng/ml *Salmonella* Typhimuriumból származó flagellin, illetve 50 és 100 µg/ml poly I:C. A koncentrációkat a máj

modellen elvégzett előkísérlet eredményei alapján választottuk ki. A tápfolyadékot 12 óra elteltével eltávolítottuk.

II. kísérlet: A *Cordyceps militaris* kivonat hatása a bél eredetű gyulladásos modellre

Az explantátumokat az ileális explantátum modell, valamint a II.2 és II.3 előkísérlet protokollja szerint nyertük és tenyésztettük. A kezeléset a következőkben leírtak szerint végeztük el. Dextróztartalmú *Cordyceps miltaris* kivonat (CME) 0,12% (m/m) vagy 0,6% (m/m)-ban szolgált kezelőanyagként az egyes csoportok esetében. Az analitikai vizsgálat (LC-MS/MS) szerint a kivonat 5264 ng/g cordycepint, 4592 beauveriolid I-et és 9912 ng/g beauveriolid III-at, valamint körülbelül 1‰ β-glükánt tartalmaz. A kontroll csoportokat 0,12% (m/m) vagy 0,6% (m/m) dextrózzal kezeltük a kivonatok dextróztartalmát követve. A gyulladást modellező kezelési csoportok létrehozásához az explantátumokat 50 µg/ml poly I:C-vel stimuláltuk 0,12% (m/m) vagy 0,6% (m/m) dextróz jelenléte mellett. Továbbá, kombinált kezelési csoportokat is létrehoztunk, amelyekben a szövetminták 0,12% (m/m) vagy 0,6% (m/m) CME-t kaptak 50 µg/ml poly I:C-vel kombinálva.

Statisztikai elemzés

Az összes statisztikai elemzést R v. 4.0.3 vagy R v. 4.0.4 segítségével végeztük. A standard görbéket az ELISA vizsgálatok és kolorimetriás mérések esetében az arigo GainData® platform felhasználásával illesztettük, és az egyes koncentráció-értékeket ezen a felületen számítottuk ki. Az adatok eloszlását Q-Q plottal vizsgáltuk. A csoportok közötti különbséget Wilcoxon-féle rangpróbával vagy kétmintás Student-féle t-próbával vizsgáltuk. A kísérletekben a két csoport közötti különbséget akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a p-érték 0,05 vagy annál kisebb volt.

Eredmények és diszkusszió

I. előkísérlet: Máj eredetű gyulladásos modell létrehozása

A rezidens szöveti makrofágokkal rendelkező máj a veleszületett immunitás helyszíne, amelyet a bélfalon átjutó PAMP-ok képesek aktiválni. A vizsgálat célja egy máj gyulladásos modell létrehozása volt, amelyben különböző baromfipatogén kórokozókból származó PAMP-ok hatását vizsgáltuk. A poly I:C 50 és 100 µg/ml koncentrációban csökkentette a sejtek metabolikus aktivitását, míg az extracelluláris LDH-aktivitást az 50 µg/ml poly I:C kezelés emelte. Az IL-6 koncentrációja szignifikánsan emelkedett a 250 ng/ml flagellin és 50 ng/ml poly I:C kezelési csoportokban, 50 µg/ml poly I:C expozíció pedig szignifikánsan növelte az IL-8 koncentrációját. Az O55:B5 szerotípusú *Escherichia coli* LPS nem váltotta ki a gyulladáskeltő citokinek termelődését. Az elégtelen IL-válasz valószínűleg összefüggésben áll a csirkékben megfigyelt TLR4 jelátvitel hiányos voltával madarakban, amely jelenséget más kutatócsoportok is leírták. Bár ez a megfigyelés még mindig vitatott, *in vitro* vizsgálatok során más TLR-agonisták alkalmazása indokolt. A vizsgálat eredményei alapján a flagellin és a poly I:C hatékony PAMP-oknak tekinthetők a gyulladás kiváltására csirke primer hepatocita – nem-parenchimális sejt kokultúrán.

I.A kísérlet: A cikóriasav hatása a máj eredetű gyulladásos modellre

A túlzott gyulladás válasz és a szabad gyökök termelődése által kiváltott sejtkárosodás számos negatív következménnyel járhat. A kártétel a helyesen vakcinázott állományokban is jelentős lehet. A vizsgálat célja az volt, hogy a vírusos duplaszálú RNS-analóg poly I:C-vel gyulladást váltsunk ki csirke primer hepatocita – nem-parenchimális sejt kokultúrán, hogy vizsgálható legyen a CA immunmoduláló és sejtvédő hatása a NAC referencia anyaghoz képest. A poly I:C jelentősen megemelte a sejtkárosodást jelző LDH-aktivitást és a gyulladásos citokinek (IL-6, IL-8, IFN-α, IFN-γ és M-CSF) koncentrációját a tápfolyadékban, és csökkentette a sejtek metabolikus aktivitását. A CA jelentősen csökkentette a megemelkedett LDH- és citokinszinteket, ráadásul a magasabb, 100 µg/ml koncentrációjú CA még a metabolikus aktivitást is emelte a poly I:C-nek kitett csoport esetében. A CA nemcsak gyulladáscsökkentő hatásúnak bizonyult – ami az IL-8, IFN-α (10 és 100 µg/ml) és IL-6, M-CSF szintek (100 µg/ml) csökkenésében mutatkozott meg –, hanem a sejtek életképességére is hatással volt. A referencia molekula, 10 µg/ml NAC kezelés csökkentette az egyes gyulladásos citokinek szintjét, de nem mérsékelte a sejtkárosodást, illetve a metabolikus aktivitás csökkenést. Az eredmények azt mutatják, *Asteraceae* családba tartozó közönséges növényekben jelen lévő CA májsejtvédő hatással bír, és a NAC-cal együtt gyulladásgátló hatással rendelkezik *in vitro* vírusfertőzés kiváltotta gyulladásos modellen. A CA hasonló hatást mutatott a szilibinnel összehasonlítva egy emberi sejtvonalon kiváltott *in vitro* májkárosodás modellen, és egy átfogó, 85 másik növényi hatóanyaggal BV2 egér mikroglia

sejteken végzett vizsgálatban. A CA ezekben a vizsgálatokban a sejtek életképességét a legkevésbé csökkentő molekulák között volt. Ez a sejtvédő tulajdonság összhangban van a mi eredményeinkkel. A poly I:C expozíció utáni extracelluláris LDH-aktivitás erős pozitív korrelációt mutat a gyulladáskeltő citokinekkel (IL-6, IL-8, M-CSF). Ennek alapján a sejtek pusztulásának lehetséges mechanizmusa a piroptózis lehet, amit megerősít a CA kombinált kezelési csoportban megfigyelt, jelentős, de nem szignifikáns kaszpáz-3 szint emelkedés.

I.B kísérlet: A luteolin hatása a máj eredetű gyulladásos modellre

E kísérlet célja a *Salmonella* Typhimurium baktérium flagellumából felszabaduló flagellin gyulladáskeltő hatásának vizsgálata és az indukált gyulladás mérséklése luteolinnal, mint növényi eredetű flavonoiddal, csirke primer hepatocita – nem-parenchimális sejt kokultúrán. A flagellin jelentősen megnövelte a gyulladáskeltő citokin IL-8 koncentrációját és az IFN-γ/IL-10 arányt, miközben csökkentette az IL-10 szintjét, ami azt jelzi, hogy a modell alkalmas volt a gyulladás *in vitro* vizsgálatára. A 4 µg/ml-es luteolinkezelés a metabolikus aktivitás és az extracelluláris LDH-aktivitás értékek alapján nem bizonyult citotoxikusnak, és jelentősen csökkentette a flagellin által kiváltott IL-8 szint emelkedést. Továbbá, csökkentette az IFN-α, H_2O_2 és az MDA szintjét, és visszaállította az IL-10 koncentrációját, valamint az IFN-γ/IL-10 arányt a kontroll csoport értékére, amikor flagellinnel kombinálva alkalmaztuk. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy alacsonyabb koncentrációban a luteolin májsejtvédő hatással bírhat, és antioxidánsként alkalmazva enyhítheti az oxidatív károsodást. Tudomásunk szerint ez az első vizsgálat, amely a luteolin hatását csirke eredetű sejtkultúrán vizsgálta. A máj sejtjei fokozottan érzékenyek a flagellinre, illetve a flagellin által kiváltott gyulladás fontos szerepet játszik a szalmonellózis patogenezisében. Mindezek mellett a máj a paratífuszt okozó *Salmonella* szaporodásának egyik kiemelt helye a csirkében, ami tovább hangsúlyozza a modell létjogosultságát.

II. előkísérlet: Bél eredetű gyulladásos modell létrehozása

A gyomor-bélrendszeri gyulladás emésztési zavarokhoz és szisztémás betegségekhez vezet a baromfifajoknál. Lehetséges protektív anyagok vizsgálata érdekében elkerülhetetlen az *in vitro* modellek alkalmazása. Az explantátum rendszerek megfelelnek a laboratóriumi állatkísérletek során kulcsfontosságú 3R alapvetésnek, mivel egyetlen állatból több kultúra előállítását teszik lehetővé, miközben szabályozott környezetben szövet-specifikus választ adnak. Állati bél explantátumokkal végzett kísérleteket nagy számban végeztek mikotoxinok és kórokozók hatásainak vizsgálatára, valamint bizonyos táplálékalkotók (pl. a cöliákia esetén a gliadin) hatásának a megismerésére. A tenyésztés módszertana szerint “immerziós”, és “air-liquid interface” explantátum modelleket írtak le, ugyanakkor az explantátumok méretfüggő alkalmazhatóságáról és a különböző PAMP-okra adott válaszáról korlátozott információ áll rendelkezésre. A legtöbb vizsgálat során nagy (több mm átmérőjű) és nem pontosan meghatározott alakú bél explantátumokat alkalmaznak. A tanulmány célja az volt, hogy

összehasonlítsa a biopsziás körkéssel nyert “miniatűr” csirke ileum explantátumok morfológiáját és életképességét, vizsgálja azok idő és méret függő változásait, eltarthatóságát. A modell alkalmazhatóságának ellenőrzése érdekében PAMP-ok (flagellin, LTA és poly I:C) kerültek alkalmazásra. A 2 mm átmérőjű explantátumok az 1 mm-esekkel összevetve 12 óra elteltével metabolikusaktivitás-csökkenést és szignifikánsan magasabb extracelluláris LDH-aktivitást mutattak, ami sejtkárosodásra utal. Ezt a különbséget a kórszövettani eltérések is alátámasztottak. A 12 órás inkubáció után az 1,5 mm-es explantátumok megtartották a hengerhám borításukat, a *lamina propria* mérsékelt károsodása mellett (H&E és páncitokeratin festés). A 100 µg/ml poly I:C expozíció csökkentette az 1,5 mm-es explantátumok metabolikus aktivitását. Az LTA és a poly I:C mindkét alkalmazott dózisban (10, 20, illetve 50, 100 µg/ml) növelte az IFN-γ koncentrációját, az IFN-α és az IL-6 koncentrációja 50 µg/ml, a RANTES pedig 100 µg/ml poly I:C kezelés hatására emelkedett meg. A 100 ng/ml flagellin kezelés emelte az IL-6 és IL-10 szintet, míg a 250 ng/ml az IL-10 és RANTES koncentrációjára volt hasonló hatással. A 10 µg/mL LTA expozíció volt az egyetlen kezelés, amely IL-2 emelkedést indukált. Az IFN-γ/IL-10 arány, a bél gyulladásos homeosztázisának indikátora, a magasabb LTA és mindkét poly I:C koncentráció esetében megemelkedett.

II. kísérlet: A *Cordyceps militaris* kivonat hatása a bél-explantátum modellre

A vörös rovarrontógomba (*Cordyceps militaris*) legfontosabb markermolekulája a cordycepin, amely különböző mechanizmusok révén antivirális és gyulladáscsökkentő hatást fejt ki sejtszinten. Ezenkívül a cordycepin az adenozin receptorokhoz is képes kötődni, így túlzott gyulladás vagy iszkémia esetén aktiválhatja a sejtek javító mechanizmusait. A poly I:C által kiváltott gyulladás mérséklése céljából a jelen vizsgálatban a kombinált kezelési csoportokban 2,3 µg/g cordycepin tartalmú, dextrózzal készített CME kivonattal is kezeltünk. Az IFN-γ esetében mind a 0,6% (m/m%), mind a 0,12% CME-kezelés csökkentő hatást mutatott a gyulladásos kontrollhoz képest. A RANTES tekintetében a 0,12% CME-kezelés csökkentette a citokinszintet, míg az IL-1β esetében a 0,6% CME-kezelés bizonyult hatékony dózisnak a poly I:C-vel kezelt csoporthoz képest. A jelen tanulmány alátámasztja, hogy a CME alkalmazása alacsony koncentrációban is terápiás hatást válthat ki *in vitro.* A cordycepin gyulladáscsökkentő hatását elsősorban az NF-κB jelátviteli út gátlásával fejti ki, de további, a gyulladásos válasz kialakulásában kulcsfontosságú jelátviteli útra is hatással van (MAPK jelátviteli út, A_2A/A_3 adenozin receptorok). A molekula antivirális befolyását az RNS-lánc-termináló nukleotidszerkezet adja, de emellett az intracelluláris mintázatfelismerő receptor RIG-I-en keresztül fokozhatja az I. típusú interferonok termelését is. Így a szakirodalmi adatok és a jelen tanulmány eredményei alátámasztják a *Cordyceps militaris* és a cordycepin jelentőségét a baromfiágazatban, ahol a vírusok okozta kártétel jelentős gazdasági károkban nyilvánul meg.

Konklúzió

A jelen disszertáció sikeresen jellemzett és alkalmazott csirke eredetű *in vitro* és *ex vivo* gyulladásos modelleket, melyeken gyógyszerhatóanyag-jelöltek, protektív anyagok vizsgálata is lehetséges. A csirke primer hepatocita – nem-parenchimális sejt kokultúra megbízhatóan választ adott az egyes alkalmazott gyulladáskeltő vegyületekre, mint a flagellin és a poly I:C. Ez lehetővé tette a sejtek anyagcseréjében, a membrán integritásában és a citokintermelésben bekövetkező változások követését. Hasonlóképpen, az ileum explantátum modell, amelynek mérete és inkubációs ideje előkísérletekben került beállításra, érzékenynek bizonyult az alkalmazott PAMP-okra, illetve specifikus választ adott rájuk, igazolva ezzel a bél explant modellek komplex gyulladásos válaszát.

A tesztelt vegyületek közül a CA, egy növényi eredetű másodlagos anyagcseretermék, erős gyulladáscsökkentő és sejtvédő hatást mutatott. A luteolin, mint növényi flavonoid, szintén csökkentette a gyulladás és az oxidatív stressz fő paramétereit, bár magasabb koncentrációban deprimálta a sejtek metabolikus aktivitását. A cordycepint tartalmazó CME jelentősen csökkentette az ileum explantátum modell gyulladáscsökkentő citokinválaszát, így pozitív hatással lehet bélgyulladással kísért kórképekben.

E témakörben további, *in vivo* vizsgálatok szükségesek, de a CA, a luteolin és a CME *in vitro* hatásai felvetik ezen anyagok és más növényi, valamint gomba eredetű anyagcseretermékek baromfigyógyászatban történő alkalmazásának lehetőségét az antibiotikumok és gyulladáscsökkentők alternatívájaként. Ez a megközelítés fenntarthatóbb, kevesebb antibiotikum használata mellett megvalósuló állattenyésztést tesz lehetővé, mely egyben a magasabb szintű fogyasztói igényeket is szolgálhatja.

Új tudományos eredmények

Ad 1,

Csirke primer hepatocita – nem-parenchimális sejt kokultúrán gyulladás váltható ki flagellin és poly I:C alkalmazásával. A 250 ng/ml koncentrációjú flagellin és az 50 µg/ml koncentrációjú poly I:C a gyulladáskeltő interleukinszintek (IL-6, ill. IL-6 és IL-8) emelkedésében megnyilvánuló gyulladást előidéző hatást mutatott. Továbbá a poly I:C csökkentette a metabolikus aktivitást és mérsékelten növelte az extracelluláris LDH-aktivitást.

Ad 2,

A cikóriasav jelentősen csökkentette a primer hepatocita – nem-parenchimális sejt kokultúrán a poly I:C hatására emelkedett IL-8, IFN-α (10 és 100 µg/ml), IL-6 és M-CSF (100 µg/ml) gyulladásos citokinek szintjeit. Továbbá, a 100 µg/ml koncentrációjú cikóriasav-kezelés a sejtek metabolikus aktivitását is emelte, míg a 10 és 100 µg/ml koncentrációjú cikóriasav csökkentette az LDH-aktivitást, ellentétben a referencia N-acetilcisztein molekulával.

Ad 3,

A 4 µg/ml koncentrációjú luteolinkezelés nem mutatott citotoxicitást, és jelentősen csökkentette a flagellin által kiváltott IL-8 felszabadulást a csirke primer hepatocita – nem-parenchimális sejt kokultúrán. Továbbá, a flagellinnel kombinált alkalmazás esetén csökkentette az IFN-α, H_2O_2 és MDA szintjét, valamint helyreállította az IL-10 koncentrációját és az IFN-γ/IL-10 arányt.

Ad 4,

A csirke ileum explantátumok életképessége méretfüggő, az 1,5 mm átmérőjű explantátumok 12 órán át tarthatók fenn. Az LTA-val és poly I:C-vel stimulált csirke ileum explantátumok 10, 20, 50 és 100 µg/ml kezelési koncentrációk hatására fokozott IFN-γ termelést mutattak. A 10 µg/ml LTA expozíció fokozott IL-2-felszabadulást indukált. Az IFN-α és az IL-6 koncentrációk 50 µg/ml, a RANTES pedig 100 µg/ml poly I:C kezelés hatására emelkedtek. A 100 ng/ml flagellin adagolás emelte az IL-6 és IL-10 szintet, míg a 250 ng/ml emelte az IL-10 és a RANTES koncentrációját. A magasabb LTA és mindkét poly I:C koncentráció mint a bél gyulladásos homeosztázisának mutatója, az IFN-γ/IL-10 arány emelkedését idézte elő.

Ad 5,

A *Cordyceps militaris* kivonat jelentős gyulladáscsökkentő hatást mutatott csirke ileum explantátumon. Az IFN-γ szint 0,12% és 0,6%-kezelési koncentrációk esetén csökkent, továbbá az előbbi a RANTES, az utóbbi pedig az IL-1β szintet csökkentette a poly I:C kezelt gyulladásos kontrollhoz képest.

Saját tudományos közlemények

Az értekezés témájában megjelent tudományos közlemények

Sebők C, Tráj P, Vörösházi J, Mackei M, Papp M, Gálfi P, Neogrády 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

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

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

Mátis G, Sebők C, Horváth DG, Márton RA, Mackei M, Vörösházi J, Kemény Á, Neogrády Z, Varga I, Tráj P. (2025) **Miniature chicken ileal explant culture to investigate the inflammatory response induced by pathogen-associated molecular patterns.** Front Vet Sci. 12:1484333. https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1484333

Tráj P, Neogrády Z, Varga K, Bohár G, Gálfi P, Mátis G (2025) **Az állatgyógyászatban alkalmazható lehetséges antivirális és immunmoduláló hatással bíró gyógyhatású anyagok: a cikóriasav és a cordycepin.** MÁL. Közlésre elfogadva.

Nemzetközi konferencián történő részvétel (előadás vagy poszter prezentáció formájában)

Tráj P, Sebők C, Mackei M, Márton RA, Vörösházi J, Lakatos B, Pápay M, Bohárné Varga K, Bohár G, Kemény Á, Mátis G Mátis, Neogrády Z. **Anti-inflammatory Effect of Cordyceps Militaris Extract in *Ex Vivo* Chicken Ileum Culture,** 17th International Scientific Conference On Probiotics, Prebiotics, Gut Microbiota And Health, Prága, 2024.06.18-20.

Magyarországi konferencián történő részvétel

Tráj P, Herrmann E, Sebők C, Vörösházi J, Mackei M, Márton R A, Gálfi P, Kemény Á, Neogrády Zs és Mátis G (2023) **A cikóriasav hatása virus RNS analóg molekulával kezelt csirke máj eredetű primer ko-kultúrán**, Akadémiai Beszámolók 2022. évi 49. füzet

Tráj P, Kákonyi Á, Sebők C, Mackei M, Márton R A, Vörösházi J, Farkas O, Kemény Á, Neogrády Zs és Mátis G (2024) **A luteolin gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata Salmonella Typhimurium flagellinnel kezelt csirke máj eredetű primer ko-kultúrán**, Akadémiai Beszámolók 2022. évi 49. füzet

Tráj P, Horváth D G, Sebők C, Mackei M, Márton R A, Varga I, Kemény Á, Neogrády Zs és Mátis G (2024) **Csirke vékonybél eredetű explant tenyészetek létrehozása a bél gyulladásos válaszának vizsgálatára**, Akadémiai Beszámolók 2022. évi 49. füzet

Tráj P, Sebők C, Mackei M, Márton R A, Vörösházi J, Bohárné Varga K, Bohár Gy, Kemény Á, Neogrády Zs és Mátis G (2024) **Vörös rovarrontógomba (*Cordyceps militaris*) kivonat gyulladáscsökkentő hatása *ex vivo* csirke ileum tenyészeten**, Akadémiai Beszámolók 2023. évi 50. füzet

Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó tudományos közlemények

Sebők C, Walmsley S, Tráj P, Mackei M, Vörösházi J, Petrilla J, Kovács L, Kemény Á, Neogrády 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, Neogrády 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

Mackei M, Sebők C, Vöröházi 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

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

Mátis G, Tráj P, Hanyecz V, Mackei M, Márton RA, Vörösházi J, Kemény Á, Neogrády 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

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

Mackei M, Huber F, Sebők C, Vörösházi J, Tráj P, Márton RA, Neogrády Z, Mátis G (2024) **Effective adaptation of flight muscles to tebuconazole-induced oxidative stress in honey bees.** Heliyon. 11(1):e41291. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e41291

Mackei M, Huber F, Sebők C, Vörösházi J, Tráj P, Márton RA, Horváth E, Neogrády Z, Mátis G (2024) **Unraveling the acute sublethal effects of acetamiprid on honey bee**

neurological redox equilibrium. Sci Rep14, 27514. https://doi.org/10.1038/s41598-024-79274-6

Karaffová V, Kiššová Z, Tóthová C, Tráj P, Mackei M, Mátis G (2025) ***Limosilactobacillus reuteri* B1/1 modulated the intestinal immune response in preventing *Salmonella* Enteritidis PT4 infection in a chicken ileal explant model.** Vet Res Commun 49, 32. https://doi.org/10.1007/s11259-024-10609-4

Vörösházi J, Mackei M, Sebők C, Tráj P, Márton RA, Neogrády Z, Mátis G (2025) **Protective effects of baicalin against deoxynivalenol-induced oxidative and inflammatory damage in chicken-derived hepatic 3D cell cultures.** Sci Rep. 15(1):11180. https://doi.org/10.1038/s41598-025-95868-0

Kiššová Z, Mátis G, Mackei M, Tráj P, Márton RA, Horváth DG, Tóthová C, Mudroňová D, Karaffová V (2025) **Utilizing a novel chicken ileal explant model to assess the efficacy of probiotic Limosilactobacillus reuteri CCM 9425 against *Salmonella* Enteritidis infection.** Poult Sci. 104(4):104909. https://doi.org/10.1016/j.psj.2025.104909

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

Köszönetnyilvánítás

Hálás vagyok az elmúlt 5 év során kapott rengeteg segítségért, támogatásért és türelemért. Elsősorban **Mátis Gábor Docens Úrnak** és **Gálfi Péter Professzor Úrnak**, témavezetőimnek köszönöm a segítséget és inspiráló természetüket. Ők motiváltak arra, hogy kutató legyek, és utólag megerősítettek döntésem helyességében. Különösen hálás vagyok **Dr. Mátis Gábor** megfontoltságáért és nyugalmáért, amit megtapasztalhattam a legreménytelenebbnek tűnő helyzetekben is. **Dr. Neogrády Zsuzsannának** köszönöm a kedvességét, nagylelkűségét, valamint a mindig optimista és érdeklődő kutatói természetét.

Külön köszönet **Dr. Mackei Mátének** kreativitásáért és folyamatos támogatásáért. Számos műszaki és informatikai kihívást az Ő segítségével sikerült megoldanom PhD hallgató éveim alatt. Hálás vagyok **Vörösházi Júliának** is szolgálatkész munkájáért és segítségéért, valamint **Dr. Márton Anna Regének**, akinek lelkesedése és kedvessége mindig segített motivált maradni a sok-sok teendő ellenére is. Köszönöm **Dr. Papp-Sebők Csillának**, hogy kollégaként és barátként is végig mellettem állt. Hálás vagyok **Dr. Kármán-Tóth Evelinnek** is kedvességéért és a lelkesítő ötleteiért.

Külön köszönet **Pálinkás Szilviának**, **Petrovics Gabriellának**, **Szikora Zsuzsannának** és **Fodor Emesének**, akiknek kitartó háttérmunkája elengedhetetlen volt ahhoz, hogy ez a munka megvalósulhasson.

Különösen hálás vagyok **Dr. Kemény Ágnesnek** szakértelméért és humoráért, amelyek elengedhetetlennek bizonyultak a kéziratok sikeréhez és a jó hangulathoz a labromunka szüneteiben. Szeretném kifejezni őszinte hálámat barátaimnak az út során nyújtott felbecsülhetetlen szakmai támogatásukért: nagyra értékelem **Kerek Ádám**, **Horváth Géza Dávid** és **Papp Márton** állatorvos kollégáim és barátaim segítségét.

Köszönetemet szeretném kifejezni TDK hallgatóimnak, **Dr. Herrmann Eva Madeleine-nek** és **Dr. Dudás Réka-nak**, valamint a még nem diplomás hallgatóimnak, **Kákonyi Richárd Ákosnak** és **Csebella Zsófiának** is, segítségükért és elkötelezettségükért a közös projektjeink iránt.

Nagyra értékelem a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, valamint a Patológiai Tanszék munkatársainak segítségét is.

Nagyon köszönöm **Dr. Bohár Gyula** és **Bohárné Varga Krisztina** áldozatos munkáját és bizalmát, ami hatalmas motivációt jelentett számomra ebben a nehéz időszakban. Hálás vagyok a gondolatébresztő beszélgetésekért, amiket **Dr. Lakatos Bélával** folytathattam, és általában véve a **Biovéd 2005 Kft.** összes alkalmazottjának és a cég összes partnerének munkájáért**,** akik nélkül a jelen munka gyakorlati alkalmazhatósága elképzelhetetlen lenne.

Hálás vagyok a University College Cork és az APC hallgatóinak, PhD-hallgatóinak, posztdoktorainak és kutatóinak a vendégszeretetükért. Külön köszönet **Dr. Gerard Clarke-nak** és **Dr. Cristina Rosell Cardona-nak**, akik betekintést engedtek nekem az írországi akadémiai életbe és a bél-agy tengely működésének alapelveibe.
Hálás vagyok menyasszonyom, **Dr. Varga Ilona** segítségéért, akinek lelki és szakmai támogatása felbecsülhetetlen számomra. Megingathatatlan hite bennem mindig erőt adott.
Végül szeretném őszinte köszönetemet kifejezni családomnak és barátaimnak szeretetükért, bátorításukért és a rengeteg türelmükért. Támogatásuk inspirált és segített átvészelni a legnehezebb napokat is.

A jelen disszertációban ismertetett kísérletek megvalósulásához a következő pályázati források elengedhetetlenek voltak:

- A projekt az Innovációs és Technológiai Minisztérium Kooperatív Doktori Program Doktori Hallgatói Ösztöndíj Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült."
- A Magyar Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal **124586** és **FK 134940 számú** NKFIH-támogatásai.
- A **TKP2020-NKA-01** számú projekt a **2020-4.1.1-TKP2020** tematikus kiválósági program finanszírozási rendszer keretében, a Magyar Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap támogatásával valósult meg.
- A munkát a Budapesti Állatorvostudományi Egyetem Stratégiai Kutatási Alapja is támogatta (**SRF-001 számú támogatás**).
- Az **RRF-2.3.1-21-2022-00001** számú projekt a Helyreállítási és Reziliencia Eszköz (RRF) finanszírozásával valósult meg, amelyet a Nemzeti Helyreállítási Alap költségvetéséből biztosítottak az **RRF-2.3.1–21** finanszírozási program keretében.