

PATOGÉNEK TÚLÉLÉSÉNEK VIZSGÁLATA FOTOKATALITIKUS VÉKONYRÉTEG FELÜLETEKEN

Dani Virág Éva
Biológia MSc, II.

BIOLÓGIA TDK 2022, TAVASZI FORDULÓ

Dr. Csabai Zsolt PhD
Dr. Tombácz Dóra habil.

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai kar

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
SZENT-GYÖRGYI ALBERT ORVOSTUDOMÁNYI KAR

ORVOSI BIOLÓGIAI INTÉZET



SZEGED
2022

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE:	2
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
1.1. Herpeszvírusok	3
1.1.1. Álveszettség vírus (PRV)	5
1.2. Fotoreaktív hatású felület	7
2. CÉLKITŰZÉS	10
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	11
3.1. PK-15 sejtkultúra fenntartása	11
3.2. PK-15 sejtek vírusfertőzése. Vírusok kinyerése ultracentrifugálással	11
3.3. Vírus titer-meghatározás	12
3.4. Vírusgenom izolálás, majd qPCR-rel történő validálás	12
3.5. A fotoreaktív felületek előállításának tulajdonságai	14
3.6. Felületek kontaminálása, szárítása. A felületről visszanyert víruspartikulumok fertőzőképességének vizsgálata	14
3.7. TCID50	16
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	17
4.1. A fotoreaktív felület hatása mikro és makromolekulákra	17
4.2. Vírusok felvitele és a felületen történő túlélésük vizsgálata	19
4.2.1. Az egészséges és az álveszettséggel fertőzött PK-15 sejtek morfológiai összehasonlítása	20
4.2.2. Felszaporított vírusok validálása qPCR reakcióval	20
4.2.3. Szobahőmérsékleten vizsgált fotoreaktív felület virucid hatása	21
4.2.4. 4°C-on vizsgált fotoreaktív felület virucid hatása	22
4.3. A fotoreaktív felület antibakteriális hatása	24
5. ÖSSZEFOGLALÁS	26
6. JÖVŐBELI TERVEK	27
7. KONKLÚZIÓ	27
8. IRODALOMJEGYZÉK	28
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	32

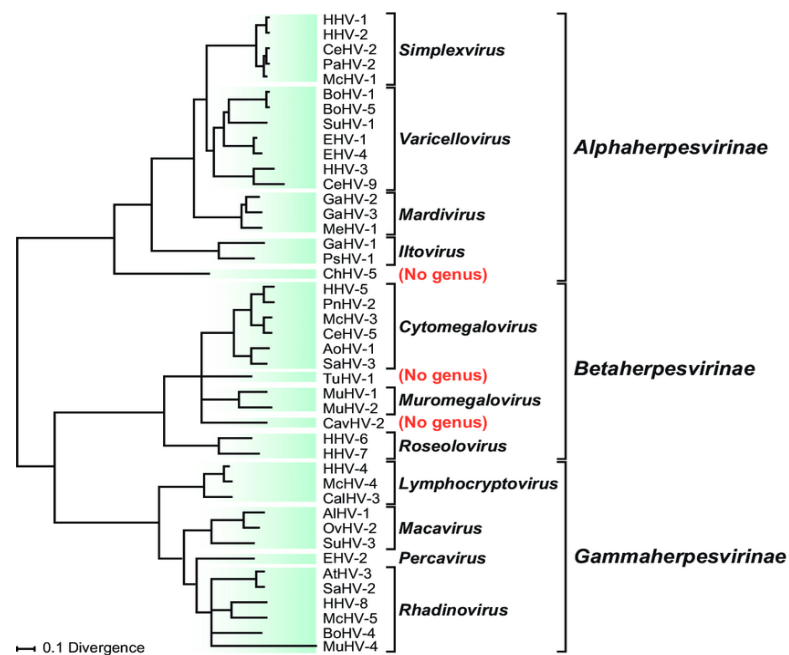
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE:

dsDNS	kettősszájú DNS
EBV	Epstein–Barr vírus
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
EHV-1	lovak herpeszvírusa (Equid herpesvirus 1)
HCMV	Humán Cytomegalovírus
HHV-6	Humán herpeszvírus 6
HHV-7	Humán herpeszvírus 7
HHV-3	Varicella-zoster (Human alphaherpesvirus 3)
HSV-1	Herpes simplex 1 (Human alphaherpesvirus)
HSV-2	Herpes simplex 2 (Human alphaherpesvirus 2)
ie	azonnali korai (immediate early)
IRS	fordított internális ismétlődés (inverted internal repeats)
KSHV	Kaposi-szarkómához társuló herpeszvírus
McHV-1	Herpesz B vírus (Macacine alphaherpesvirus 1)
MuHV-4	Murid gammaherpeszvírus 4
PBS	foszfátpufferes sóoldat (Phosphate buffered saline)
PK-15	Sertés vese sejtvonala
PRV-Ka	Álveszettség vírus Kaplan törzse
PRV	Pseudorabies vírus
qPCR	Kvantitatív polimeráz-láncreakció
ROS	reaktív oxigén szabadgyökök
SARS	Súlyos Akut Légzőszervi Szindróma
SDS	Nátrium-dodecil-szulfát (Sodium dodecyl sulfate)
SuHV-1	Suid herpeszvírus 1
TCID ₅₀	Sejtenyészet felének a fertőzéséhez szükséges vírusrészmennyiség (Tissue culture infective dose 50)
TRS	fordított terminális ismétlődések (inverted terminal repeats)
ul	egyedi hosszú (unique long)

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. Herpeszvírusok

A Herpeszvírusok (*Herpesviridae*) alkotják a DNS vírusok egyik legnagyobb családját. Három alcsaládba sorolhatók mint, *Alpha*-, *Beta*- és *Gammaherpesvirinae* (1. ábra) (Whitley 1996). Általánosan jellemző rájuk az ikozaéder alak, nagyméretű kompakt genom, illetve a lineáris struktúrájú kettősszálú DNS. Az ikozahedrális kapszid a nukleinsavval együtt nukleokapszidot alakít ki. Magát a vírus genomot egy glikoproteinnel borított lipid burok határolja. A nukleokapszid a tegumentben helyezkedik el. A herpeszvírusok genomja átlagosan 70-200 fehérje kódolását teszi lehetővé, melyek nagy része szabályozó fehérje és virokin. Jellemző a vírusra a látens fertőzés, vagyis a vírusgenom a gazdasejt DNS-ébe integrálódva lappang. Ebben a látens szakaszban a vírusgenom egy része aktív csak, új vírusok nem szerelődnek össze. Specifikus ingerek beindíthatják a vírus replikatív ciklusát. Széles gazdaspecifitásának köszönhetően a fertőzés végbemehet halakban, madarakban és emlősökben, így emberben is (Chisholm és Lopez 2011) (MacLachlan és Dubovi 2017). A replikációs ciklusuk gyorsan, Herpes simplex vírus esetén 4-12 óra alatt végbemegy (Wiedbrauk 2010).



1. ábra Az Alpha-, Beta- és Gammaherpesvirinae alcsaládok taxonómiaja

(Pellett és mtsai. 2011).

Számos humánpatogén herpeszvírus létezik az *Alphaherpesvirinae* alcsaládban. A HSV-1, HSV-2, HHV-3, McHV-1. A HSV-1 és a HSV-2 vírus hatására a bőrfelületen, nyálkahártyán hólyagok keletkeznek. Helyileg kezelhető a fertőzés, de a vírusok hosszantartóan megbújnak a ganglionokban. (Richter és mtsai. 2009) A HHV-3 által okozott bárányhimlő esetén a fertőzés után testszerte hólyagok jelennek meg, melyek vírusokban gazdagok. A leeső pörkök fertőzőképessége miatt rendkívül gyorsan terjedő betegség. Felnőttkorban a vírusfertőzés maradványaként bizonyos hatásokra (stressz, betegség) övsömör tud kialakulni. A munkánk során használt SuHV-1 a *Varicellovirus* nembe tartozik, így felépítésben számos hasonlóságot mutat humánpatogén rokonaival (Liu és mtsai. 2019) (Gershon és mtsai. 2015). Az *Alphaherpesvirinae* alcsalád általános jellemzői a gyors lítikus replikáció, ganglionokban való lappangás, széles gazdaspecifitás.

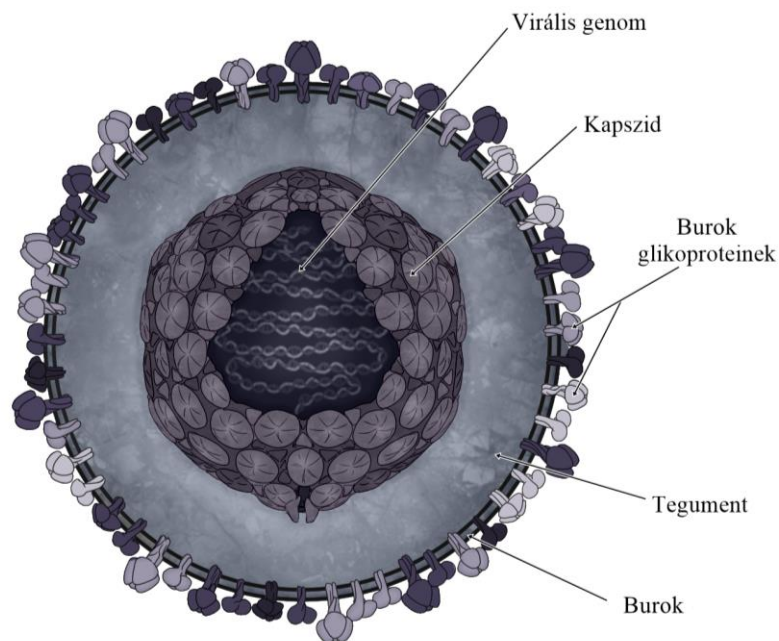
A *Gammaherpesvirinae* alcsalád humánpatogénjei a Kaposi-szarkómával összefüggésben lévő KSHV és az EBV, mely utóbbi leginkább a nyálkahártya sejtjeiben, illetve a B-limfocitákban szaporodik és olyan betegségek kialakulásában játszik szerepet, mint a Pfeiffer-féle mirigyláz és a Burkitt-limfóma. A KSHV egyike azoknak a vírusoknak, amelyek bizonyítottan tumorindukáló hatással bírnak, (Goncalves és mtsai. 2017) továbbá az erek endothéliumának elváltozását okozzák, léziókat alakítanak ki. A fertőzött személy sok esetben nincs tudatában a vírus jelenlétével, egészséges szervezetben nem mutatja a fertőzés jeleit. Gyengült immunrendszerű emberekben, AIDS-es betegekben, idősokban fellángolhat a betegség (Cesarman és mtsai. 1995) (Zanella, Cordey, és Kaiser 2020).

A *Betaherpesvirinae* alcsalád legismertebb humánpatogén vírusai a HCMV, HHV-6, HHV-7. Hasonlóan az előbbi alcsaládok néhány tagjához, gyakran élethossziglan fennmaradnak a szervezetben. A HCMV esetében az érintett személy testnedvvel üríti a vírust, így a leggyakoribb fertőzés az anya primer infekciója méhen belül. A HHV-6 és a HHV-7 gyakran egyidejűleg van jelen a fertőzött személyben. Ezeknél a vírusoknál is gyakori a tünetmentes lappangás (Ranger-Rogez, Venot, és Denis 1999, 6). Az *Alphaherpesvirinae* vírusokkal szemben a *Betaherpesvirinae* replikációs ciklusa lassabb, illetve szűkebb gazdaspecifitással rendelkezik.

1.1.1. Álveszettség vírus (PRV)

A munkánk során használt vírus az *Alphaherpesvirinae* alcsaládba tartozó álveszettség vírus (Pseudorabies) (Klupp és mtsai. 2004). Az álveszettség nevet a veszettséghez hasonló klinikai tünetegyütteséről kapta. A betegséget először 1902-ben Aujeszky Aladár magyar mikrobiológus jelentette és különítette el a veszettségtől. Vitathatatlanul az egyik legintenzívebben kutatott állati herpeszvírus. A PRV a BHV-1 (szarvasmarha herpesz), az EHV-1 (ló herpesz) és a VZV (Bárányhimlő) vírusokkal van legközelebbi rokonságban. A PRV víruspartikulum átmérője 180 nm, felépítése a herpeszvírusokra jellemző morfológiát mutatja. A vírus kettősszálú DNS genomját ikozaéder alakú kapszid zárja be (T. C. Mettenleiter 2008). A vírus nukleokapszid 120-200 nm átmérőjű, felszíne sűrűn borított virális receptorokkal, melyek egyenletesen pontozzák a felületet (**2. ábra**). A vírus replikációja és transzkripciója is a gazdasejtben történik. A többi *Alphaherpesvirinae* alcsalád tagjaihoz hasonlóan a vírus tegument rendezetlen, aszimmetrikus szerkezetű, a struktúrfehérjék mennyisége helyenként eltérő. A PRV genom 143 461 bp hosszúságú, melyben minden fehérjekódoló régió homológiát mutat a rokon alfaherpeszvírusok génjeivel. A genom hosszú (UL, unique long) és rövid (US, unique short) egyedi részeket, illetve több, fordítottan ismétlődő régiót is tartalmaz (TRS, terminal inverted repeats / IRS, interterminal inverted repeats). A gazdasejtbe való bejutás a virális glikoproteinek által jön létre. A glikoproteinnel a gazda receptoraihoz köt, majd endocitózissal bekerül a sejtbe. Replikáció alatt a dsDNS következtében a kétirányú replikációs modellt követi. Eritel sejtekben kezd intenzíven replikálódni, majd onnan gyorsan terjed retrográd axonális transzporttal (Antinone és Smith 2010). A fertőzés elején a vírus legnagyobb koncentrációban a torok és a garat környékén található meg, ahova a szagló, a glossopharyngealis és a trigeminalis idegen keresztül jut el. Sertés gazdákon kívül a PRV kizárólag neurotróp, tehát elsősorban az idegszövetet, idegrendszeret támadja (T. C. Mettenleiter 2008). A lítikus fertőzés során a PRV gének expressziója időben három jól elkülönített csoportra bontható. Ezek az azonnali korai (IE = immediate early), korai (E=early) és a kései (L=late) gének. A korai és a kései szakasz nem élesen elhatárolt, inkább egy átmeneti, E/L szakaszként értelmezhető. Az azonnali korai gének leginkább regulátor funkciót töltenek be, illetve transzkripciós faktorokat kódolnak. Ezek elsődleges átíródása különösen fontos a korai gének aktiválódásának fázisában, mivel ezek a virális DNS replikációban vesznek részt. A kései gének leginkább struktúrfehérjéket kódolnak, melyek az újonnan képződött vírusok külső burkának

kialakításában vesznek részt. Mivel a fertőzés során a gének aktiválódása jól követhetően, kaszkádszerűen történik, így az álveszettség vírus kifejezetten jól vizsgálható modellszervezetnek tekinthető (Thomas C. Mettenleiter 2000). A genom kompaktságának köszönhetően, teljes genom szintű transzkripció aktivitás zajlik, illetve megfigyelhető a multicisztronosan leíró transzkriptek jelensége is. Jelenlegi tudásunk szerint azonban a prokarióta transzlációval ellentétben ezekben az esetekben, csak az upstream ORF vesz részt a transzlációban, míg a multicisztronos leíró transzkripció szabályozó szerepe lehet (Moldován és mtsai. 2018). Számos alternatív splicing is végbemegy a transzkripció alatt (Oláh és mtsai. 2015).



2. ábra: Herpesvírusok általános felépítése.

Számos emlős fogékony a PRV vírusra. Emberekben, főemlősökben nagyon ritkán alakul ki a betegség, de számoltak már be halálos esetről. Kínában egy 43 éves férfinél, magas lázzal, fejfájással, rohamokkal jelentkezett a betegség, majd halállal végződött. Tomográfias képalkotási módszer (CT) több agyi régióban hypo-denzitást mutatott, többek között a bazális ganglionokban, limbikus rendszerben és a talamuszban. Újgenerációs szekvenálással megerősítették, hogy a beteg gerincfolyadékában megtalálható volt a PRV vírus (Yang és mtsai. 2019). Több vadon élő emlős fajnál jelentettek PRV fertőzést (vaddisznó, prérifarkas, patkány, egér, nyúl, mosómedve,

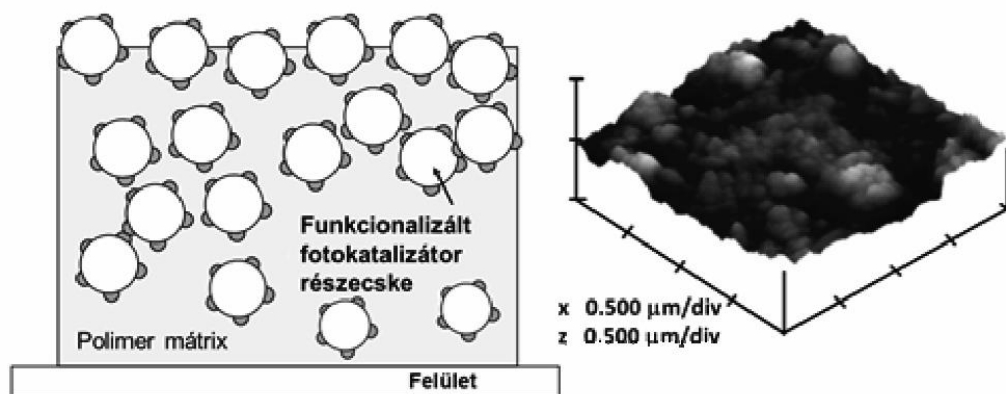
szarvas). A klinikai kórlefolyás az állat korától, fogékonyságától és a fertőzés módjától függően változhat, de a sertéseken kívüli fogékony fajoknál a fertőzés végzetes, jelenleg nem ismert ellenszere. A PRV páras levegőben átlagosan hét óra hosszáig, talajban, ürülékben akár két napig, szennyezett takarmányban három napig marad fertőzőképes. A két hónaposnál idősebb sertéseknél gyakran tünetmentes, de a fiatalabb malacok mortalitása igen magas, megközelíti a 100%-ot. Kifejlett sertések tünetei lehetnek a köhögés, tüsszögés, láz, görcsroham, fokozott nyálfolyás („Herpesviridae | IVIS” 2005) (Pomeranz, Reynolds, és Hengartner 2005). A fertőzött vemhes kocák gyenge, halott malacokat ellenek. Szarvasmarhák gyakori tünete az erős viszketés, neurológiai tünetek, bénulás. Kutyák, macskák esetén a tünetek szinte teljesen megegyeznek a veszettség tüneteivel, azzal a különbséggel, hogy az álveszett állat a kórlefolyása alatt nem lesz agresszív (Sykes és Cramer 2014). A tüneteket mutató állat 24-48 órán belül elhullik. A PRV vírus neuronális szignálként is használható egyedi neuroncsoportok, kapcsolatok jelölésére. A nem osztódó sejtekben nem képes replikációra tehát nem tud a kívánt jelölésen túl fertőzni. Számos színváltozatban elérhetőek ezek a szignál vírusok. A fertőzés folyamatának nyomon követésére is léteznek rekombináns vírusok, melyek a fertőzés bizonyos szakaszaiban eltérő színes riportergéneket expresszálnak (Boldogkői és mtsai. 2009).

1.2. Fotoreaktív hatású felület

Az antivirális és antibakteriális hatású nanorészecskékkel borított felületek megjelenése és használata nagy tudományos áttörést jelentett világszerte (Rodríguez-Baño és mtsai. 2013). Ezen felületek fejlesztésével jelentősen lecsökkenthető a különböző patogének csíraszámának mennyisége kórházakban, iskolákban, tömegközlekedésen, illetve otthonainkban. Az általunk is használt felületeken történő kémiai reakciók katalizátor szerepét a fénybesugárzással gerjeszthető fotokatalizátorok adják. Az öntisztító hatás alapja az, hogy az antimikrobiális részecskék kis méretüknél fogva kapcsolatba kerülnek a patogénnel és ott kifejtve a hatásukat elpusztítják azokat (Mei és mtsai. 2013). A fotokatalízis során, a felületen alkalmazott katalizátor részecskék a bevilágítás következtében reaktív oxigénformákat képesek létrehozni vizes közegben. Ilyen reaktív anyagok például a hidroxil-gyökök ($\cdot\text{OH}$), hidrogén-peroxid (H_2O_2) és a szuperoxid-ion ($\cdot\text{O}_2^-$) (Martra és mtsai. 1999). Ezek az anyagok hatékonyak bizonyultak a bakteriális sejtfalat alkotó és stabilizáló peptidoglikán réteggel szemben (Gupta és mtsai. 2013). A

legismertebb fotokatalizátor részecske a titán-dioxid (TiO_2), melynek sikeressége a kémiai stabilitásából ered, illetve fontos tulajdonsága még, hogy az emberi szervezetre nem toxikus (Dharma és mtsai. 2022). Jelentős szempont továbbá, hogy a környezetével nem lép reakcióba. Mivel magas a gerjesztési küszöbenergiája, a fotolitikus aktivitása első sorban UV-fotonokkal érvényesül (Dickstein és mtsai. 2016). Ez a tulajdonsága akadályt jelent a széleskörű alkalmazásában, mivel az UV-fény ártalmas az emberi szervezetre.

A TiO_2 gerjesztési küszöbenergiája módosítható különböző nemfémekkel, mint például nitrogénnel, (Halasi, Ugrai, és Solymosi 2011) kénnel (Kun és mtsai. 2009) vagy foszforral (Kőrösi és mtsai. 2007). Ezeknek az adalékanyagoknak a hatására a katalizátor részecskék elektronszerkezete és optikai sajátosságai megváltoznak, így a gerjesztési küszöbenergia a látható fény tartományába hangolható. A fotokatalizátor részecskék mindennapi alkalmazásában fontos szempont a megfelelő felületi rögzítés. A Poli(etil-akrilát-ko-metil-metakrilát) (Veres és mtsai. 2014) típusú rögzítőanyagon történő felületi immobilizáció megakadályozza, hogy a fotokatalizátor részecskék a környezetbe jussanak (3. ábra).



3. ábra: A fotokatalitikus felület sematikus ábrája, mellette ennek a felületnek az atomerő mikroszkópos képe (Janovák és mtsai. 2019).

Jelenleg ezek a polimer alapú bevonatok tűnnek a jelenleg elérhető legoptimálisabb megoldásnak (Tallósy és mtsai. 2014). Viszonylag kedvező ár, kis sűrűség, jó ütésállóság és rugalmasság jellemzi őket. Az ilyen típusú polimer közegben a fotokatalizátor nanorészecskék egyenletesen oszlanak el. Ez az egyenletesség idővel változik a

fotokatalitikus folyamatok hatására. Az úgynevezett második generációs felületeket plazmonikus nemesfém (Ag, Cu) részecskék hozzáadásával alakítják ki. Ezek, a TiO_2 -al keverve, növelik a nanohibrid film fényelnyelő képességét és a fotokatalitikus aktivitását. A nemesfémek, a nemfémekkel ellenben, elektroncsapdaként is funkcionálnak, illetve plazmonikus sajátságokkal is rendelkeznek. Ezek hozzájárulnak ahhoz, hogy a látható fény fotokatalitikusan hasznosulni tudjon, tehát nem szükséges UV-fotonok használata. Ha a beérkező fotonok és a felületi vegyértékelektronok frekvenciája megegyezik, egy olyan állapot alakul ki, mely a beeső fotonok energiáját képes a nanorészecskék körül koncentrálni. A folyamat szempontjából fontos tényező a közeg törésmutatója, valamint a fotokatalizátor és a nemesfém részecskék egymástól való távolsága. A nemesfémekkel történő módosítás csökkenti a gerjesztéshez szükséges küszöbenergiát. Ennek a folyamatnak az alkalmazásával gyakorlatilag a látható fény segítségével eliminálhatóvá válnak a fertőzésekért felelős kórházi patogének (Charpentier és mtsai. 2012).

A TiO_2 felületekhez történő, különböző mértékű Ag adagolása eltérő aktivitásbeli hatást mutatott. Az 1%-os Ag tartalmú felületek UV fényben mutatták a legnagyobb aktivitást, míg látható fényben a 0,5%-os Ag tartalom volt a legeredményesebb. Ag adagolásával egyértelműen növelhető a TiO_2 felületek fotoreaktív hatékonysága. ZnO felületeknél a 0,25%-os Ag tartalom mutatta a legnagyobb aktivitást, UV és látható fényben is (Tallósy 2016). Az immobilizált fotokatalizátorok mechanikai stabilitása megnövekedett, de a polimer miatt csökkent a fotoreaktív hatás. A csökkenés mértékével a képződő reaktív oxigéngyökök hatása még így is elegendő hatással bír a megfelelő antimikrobiális hatás elérése érdekében.

2. CÉLKITŰZÉS

- I. A potenciálisan antimikrobiális hatású TiO_2 tartalmú polimer immobilizálása, illetve a látható fény hatására keletkező reaktív vegyületek vizsgálata.
- II. A fotokatalízis során keletkező vegyületek hatásának vizsgálata benzooesavra, BSA-ra és baktériumokra.
- III. Az álveszettség vírus felszaporítása PK-15 sejtekben, illetve a vírus titer-meghatározása.
- IV. Az álveszettség vírus qPCR-rel történő validálása.
- V. A fotokatalizátor nanorészecskékkel borított felület vizsgálata antivirális tulajdonságának szempontjából.
- VI. Különböző környezeti tényezők (hőmérséklet, fényforrás távolsága) hatásának vizsgálata a fotoreaktív felületek antivirális hatékonyságának és a vírus túlélésének szempontjából.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. PK-15 sejtkultúra fenntartása

Munkánk során a vírusfertőzéshez sertésvese sejteket használtunk (Porcine kidney cell line (PK-15; ATCC® CCL-33™)). A sejtek fenntartása DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) tápoldatban, 5% FBS (Fetal Bovine Serum; Gibco/Thermo Fisher Scientific, CAS No. 9048-46-8) és 1% PS (Penicillin Streptomycin; Thermo Fisher Scientific, CAS 3810-74-0) jelenlétében történt. A sejtek inkubációja a kísérlet minden szakaszában 37°C-on 5%-os CO₂ mellett történt. A sejtek passzálását 2-3 naponta végeztük. A folyamat során, a használt tápoldatot eltávolítottuk a sejtekről, majd PBS-sel mostuk őket. Ezt követően 1-, 2- vagy 3 ml tripszint mértünk a sejtenyésző flaskába attól függően, hogy a folyamatban 25-, 75-, vagy 150 cm²-es edényt használtunk. Ezt követően addig inkubáltuk, amíg az összes sejt fel nem vált a tenyésző flaska aljáról. A felvált sejtek ¾-ét kidobtuk, a megmaradt sejteket visszahelyezzük a flaskába és komplettált DMEM tápoldatot tettünk hozzá.

3.2. PK-15 sejtek vírusfertőzése. Vírusok kinyerése ultracentrifugálással

A vírusszaporítás során 10 MOI (Multiplicity Of Infection) vírusráta használtunk a PK-15 sejtenyésző fertőzéséhez. A sejszaporítás 150 cm²-es sejtenyésző flaskában történt. A fertőzés megkezdéséhez konfluens sejtenyészőre volt szükségünk, ugyanis a PK-15-ös sejtek száma ebben az esetben $5 \cdot 10^6$ darabra tehető. A fertőzést megelőzően a tápfolyadékot eltávolítottuk, majd steril PBS oldattal mostuk a sejteket. A kívánt titer eléréséhez 0%-os DMEM oldattal hígítottuk ki a vírusokat. A használt vírus stock titere $1 \cdot 10^8$ volt mely azt eredményezte, hogy a meglévő vírusszuspenziót 2-szeres hígításban 1 µl mennyiségben adtuk a felnövesztett sejtpopulációhoz. A vírusszuspenzió hozzáadását követően, 1 órán át inkubáltuk a sejteket 2 ml 0%-os DMEM jelenlétében a vírusok sejtekhez való tapadásának elősegítése miatt. Az inkubációt követően 40 ml komplettált DMEM oldattal kiegészítve, legalább 72 órás inkubáció következett, a sejtek teljes fertőzéseig.

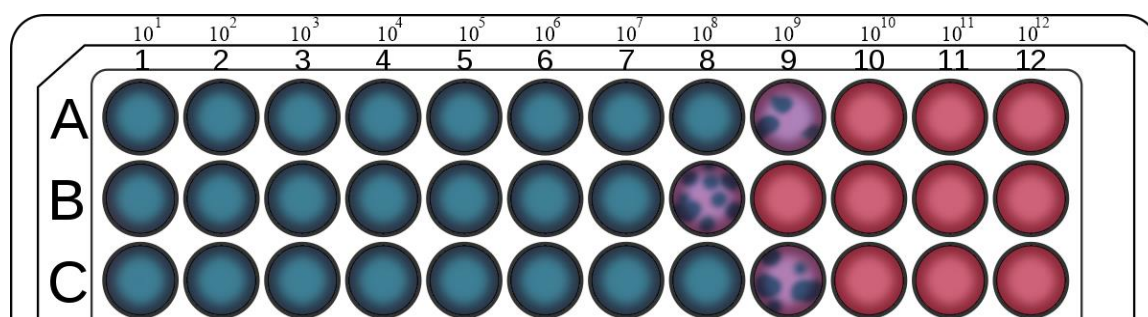
Ultracentrifugálás:

A fertőzött sejtek feltárását 2x egymást követő lefagyasztással (-80°C) és felolvasztással végeztük el. A fel nem vált sejteket ezután felkapartuk a sejtenyésző edény aljáról, majd

50 ml-es falkoncsőbe helyeztük. Ezután centrifugáltuk 2000 rpm-en, 4 °C-on, 5 percig. A vírusokat tartalmazó felülúszót 20 ml-enként, 25 ml-es ultracentrifuga csőbe tettük, majd pasteur pipettával 2,5 ml szacharózágyat (69,9 % NTE (2% 5M NaCl; 1% 1M Tris (pH:6,7); 0,5% 0,2M EDTA (pH:7)); 30% szacharóz; 0,1 % BSA (Bovine Serum Albumin)) mértünk a cső aljára. 1 órán keresztül 70.000 g-vel ultracentrifugáltuk 24.000 rpm-en Sorvall AH-628-as rotorral. A centrifugálás után eltávolítottuk a felülúszót és 4 °C-on 30 percig lefordítottuk a csövet. Ezt követően 0,25 ml steril, autoklávozott NTE oldatot adtunk a pelletek feléhez, valamint 0%-ás DMEM oldatot a minták másik feléhez. Az NTE-ben szuszpendált vírusokból DNS-t izoláltunk, a DMEM-ben beoldott vírusokat pedig a titer-meghatározáshoz használtuk a továbbiakban.

3.3. Vírus titer-meghatározás

A vírus-titert 96 lyukas mikrolemezben lévő sejteken határoztuk meg. Az ultracentrifugálás végén kapott, DMEM-ben beoldott vírus szuszpenzióból hígítási sort készítettünk a mikrolemez első 3 sorában. A vírus felvitele után a sejteket 3-4 napig inkubáltuk. Mikroszkóp alatt soronként megkerestük azt a hígítást, ahol még fellelhető vírus plakk. Ezekben a lyukakban megszámoltuk a képződött plakkokat (**4. ábra**). Ezeknek a számát a hígításának és a térfogatnak megfelelően felszoroztuk. A három párhuzamos eredményt átlagolva kaptuk meg a vírus-titert.



4. ábra: Az "A" sor 3×10^9 , a "B" 9×10^8 , a "C" 5×10^9 vírust tartalmaz. Ezek átlagából kaptuk meg a vírus koncentrációját.

3.4. Vírusgenom izolálás, majd qPCR-rel történő validálás

A koncentrált vírus szuszpenzióhoz 0,5 ml DNS izoláló puffert (1M Tris-HCl pH 7.5 = 0.2M (200mM), EDTA 0.025M (25mM), SDS 0.5%, NaCl 0.25M (250mM), 0.002mg/ml

RNase 650ml ddH₂O) és 25 µl proteináz K-t (20 ug/ml) adtunk és összevortexeltük. 1 óráig inkubáltuk 55°C-on, majd ezt követően 1:1 arányban adtunk hozzá fenol-kloroformot, és összevortexeltük. 10 percig centrifugáltuk 17.000 g-vel 4 °C-on, majd a felső vizes fázist új eppendorf csövekbe tettük. Megismételtük az előbbi lépést 2x, majd a harmadik fenol-kloroformos folyamat vizes fázisának 1/10 mennyiségű 3M Na-acetátot (pH 7.4) és 2,5x mennyiségű izoamil alkoholt adtunk. 10 percig centrifugáltuk 4 °C-on 17.000 g-vel majd leöntöttük a felülúszót. 500 µl 70%-os alkoholban mostuk, majd 10 percig centrifugáltuk 4 °C-on 17.000 g-vel. A felülúszót ismét leöntöttük és a csöveket lefordítva, szobahőmérsékleten megszárítottuk. Ügyeltünk arra, hogy ne száradjon ki a DNS, de az alkohol maradéktalanul elpárologjon. A mintákat nukleáz mentes vízben vettük fel.

Kvantitatív PCR (qPCR) vizsgálat

Az ultracentrifugálást követően izolált DNS mintákat génspecifikus primerek segítségével validáltuk qPCR segítségével. A validálás során 4 specifikus génszakaszt amplifikáltunk fel, az ul23; ul29; ul44 és az ul21 régiókat. Az amplifikációhoz a RotorGene Q Thermocycler-t használtuk, a reakció összetétele a következő volt: 2x ABsolute QPCR Mix, SYBR Green (Thermo Scientific™); 20 ng DNS; 1mM génspecifikus primer szekvencia (**1. Táblázat**). A qPCR reakció kondíciói a következők voltak: 94°C 25 másodperc, 60°C 25 másodperc, 72°C 6 másodperc 30 cikluson keresztül.

Primerek	Szekvencia (5'-3')
ul23 fw	ATGACGGTCGTCTTTGACCGCCAC
ul23 rev	CGCTGATGTCCCCGACGATGAA
ul29 fw	CTGATCCTGCGCTACTGCG
ul29 rev	ACTGCATCGTGATCCCCG
ul44 fw	TCGTGAGCAGCATGATCGT
ul44 rev	GTCGCCATGATGACCAGC
ul21 fw	TCAGCTGTTTCGGGCGC
ul21 rev	ATTGAGGACGATGGAGATGTTGG

1. táblázat: a vírus validálására használt primerpárok

3.5. A fotoreaktív felületek előállításának tulajdonságai

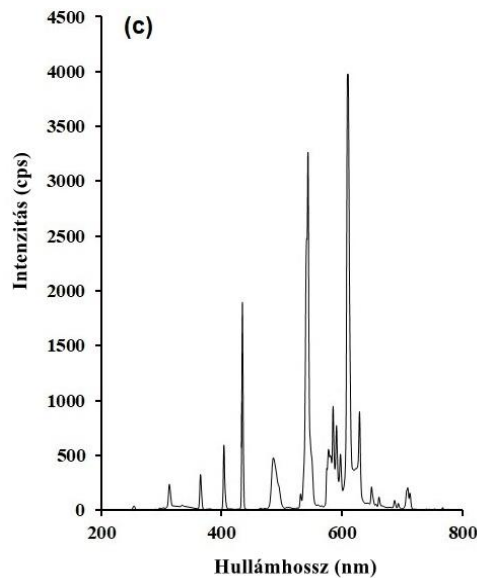
TiO₂ (Aeroxide P25[®] CAS No. 13463-67-7) típusú felületeket használtunk, 0,5 wt% AGNP-vel adalékolva. A fotokatalitikus nanofilm anyag alapja Poli(etil-akrilát-ko-metil-metakrilát) (p(EA-co-MMA) polimer. 10 wt% Ag-TiO₂ vizes szuszpenzió volt Petri-csészére feljuttatva, 15 cm-ről gravity feed airbrush segítségével (ChroMax BD-203, United Kingdom). A feljuttatott nanokompozit filmréteg 1–1.5 µm vastag. A nanofilmréteg alapjául szolgáló Petri-csésze 100 mm × 15 mm méretű. A fotoreaktív felület fotokatalizátor/polimer tömegarányai 60:40 tömeg%. A tiszta polimer és a fotokatalitikus Ag-TiO₂-t tartalmazó felület is ugyanazzal a fajlagos tömeggel rendelkezett (1 mg/cm²).

3.6. Felületek kontaminálása, szárítása. A felületről visszanyert víruspartikulumok fertőzőképességének vizsgálata

Minden vizsgálni kívánt felületre 100-100 µl vírusszuszenziót juttattunk fel szórófejes permetezővel a természetes cseppfertőzés jelenségét utánozva (**5. ábra**). A kontaminációt követően stopperrel mértük a felület száradási idejét. Az adott kísérlet típusától függően változtattuk a környezeti tényezőket, mint például a megvilágítást ($\lambda \geq 435$ nm (**6. ábra**)), a megvilágítás távolságát (15 cm és 30 cm) illetve a hőmérsékletet (szobahőmérséklet és 4°C).

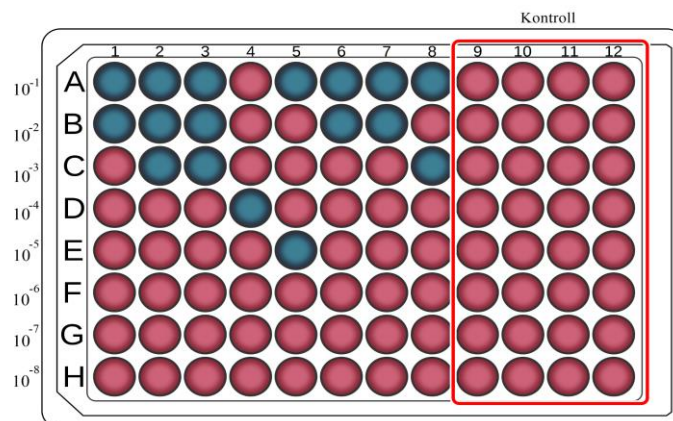


5. ábra: A kontroll Petri-csészére feljuttatott PRV vírusszuszenzió aeroszol formában.



6. ábra: A megvilágításban használt fény hullámhossza (Boldogkői és mtsai. 2021).

Minden paraméter vizsgálata 3 párhuzamos mintán történt. Az inkubációt követően a felületen lévő víruspartikulumokat 1000 μ l DMEM-mel szuszpendálva gyűjtöttük össze, majd ezen vírusszuspenziók fertőzőképességét határoztuk meg. A felületről visszanyert aktív vírusokból hígítást készítettünk. Előre elkészítettünk 8 eppendorf csőbe 900-900 μ l DMEM tápoldatot. A visszanyert vírusszuspenziót vortexeltük és 100 μ l-t helyeztünk az első eppendorf csőbe. Ezt a hígítást vortexeltük és ismét 100 μ l szuszpenziót vettünk ki és helyeztük a következő eppendorf csőbe. Ezt a folyamatot elvégeztük a maradék 6 eppendorf csővel is, így elkészítve a 8 lépcsős 10-szeres hígítási sort. Az első hígításból végigmértük a 96-os lyukú mikrolemez első sor 8 lyukát. A 9-12. lyukak kontrollként szolgáltak (**7. Ábra**). Egy lyukba 100 μ l vírusszuspenziót mértünk.



7. Ábra: Egy fiktív eredmény a TCID₅₀ kalkulációhoz. A sötétkék szín a fertőzött lyukakat jelzi, így azok pozitív mintának számítanak.

3.7. TCID₅₀

A TCID₅₀ azt a vírusedményiséget határozza meg, amely a sejtkultúra 50%-ának a megfertőzéséhez és elpusztításához szükséges. A fertőzés követően 4 nap múlva néztük meg a sejteket mikroszkóp alatt (Olympus Ix71 mikroszkóp és Olympus LUMPlanFL/IR 100x nagyításban). A fertőzött lyukakat “+” az egészséges sejtek “-” jelzést kaptak. A fertőzés meghatározásához az is pozitív értéknek bizonyul, ha a sejttenyésztő lyuk teljes mértékben fertőzött sejteket tartalmaz és az is, ha csak egy sejtcsoport mutat fertőzésre utaló morfológiai változást. A TCID₅₀ érték egyenes arányosságot mutat a titer értékével, így a fertőzőképes vírusok vizsgálatára széles körben használt módszer.

A TCID₅₀ értéket az alábbi képlet szerint kalkuláltuk:

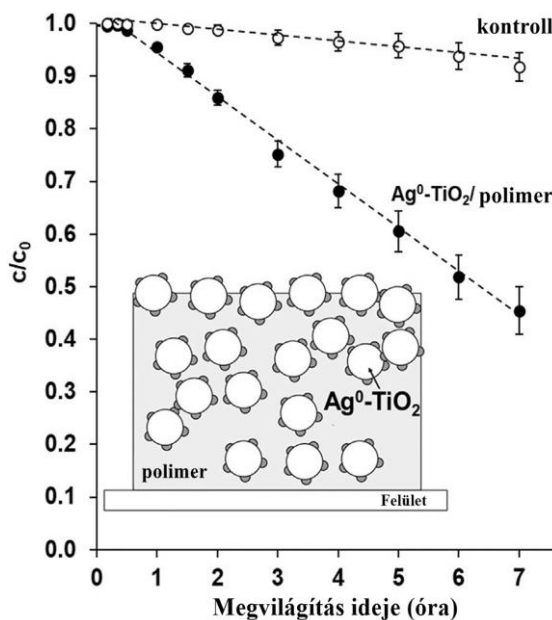
$$\text{Log10 50\% végpont hígítás} = \left[\left(\frac{\text{pozitív fertőzött lyukak száma}}{\text{egy hígítási sorban lévő lyukak száma}} \right) + 0,5 \right] \times \text{hígítási tényező 10-es alapú logaritmusa}$$

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1. A fotoreaktív felület hatása mikro és makromolekulákra

A nanohibrid filmréteg egy 100 mm × 15 mm-es Petri-csészére volt feljuttatva. A filmréteg kellően vékonyra, tiszta polimer réteg esetén $1,02 \pm 0,2 \mu\text{m}$, míg a polimerbe ágyazott fotoreaktív kompozit réteg esetén $1,45 \pm 0,1 \mu\text{m}$ vastagságúra készült. Az utóbbi esetében a fotokatalizátor/polimer arány 60:40%-ban oszlott meg.

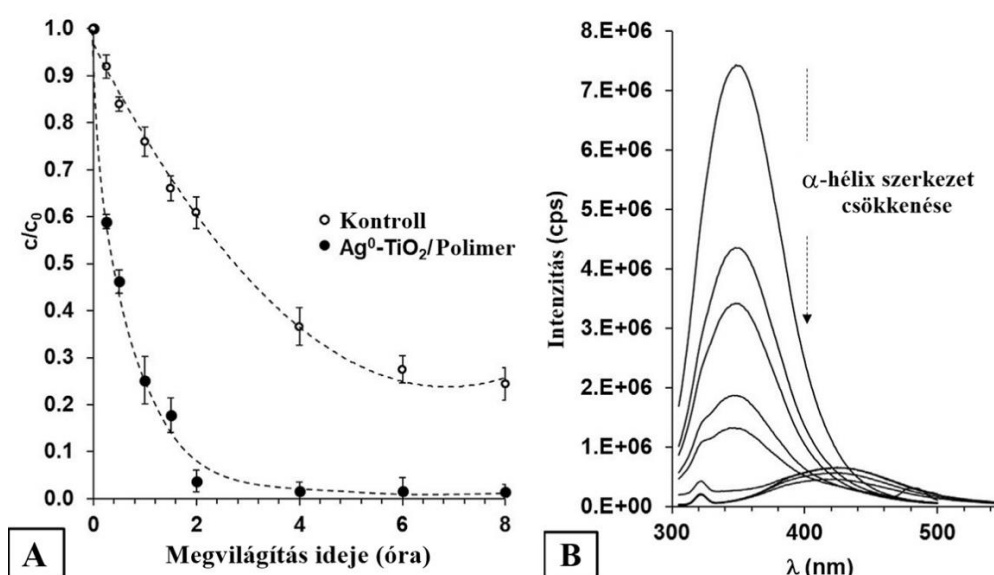
A fotoreaktív felület szabadgyökök termelésével, képes fotokatalitikusan lebontani egyszerű molekulákat is, mint például benzoetsavat, ami a kísérletben is felhasznált teszt kismolekula volt (**8. ábra**). Az eredményekből egyértelműen állítható, hogy 7 órás látható fény besugárzása után körülbelül a benzoetsav (kezdeti koncentráció: 20ppm) 55-60%-a fotodegradálódott vizes oldatban, tehát a fény által indukált felületről felszabadult szabadgyökök elbontották a felületen kötődött kismolekulákat.



8. ábra: A fotokatalitikus felületen vizsgált teszt mikromolekula (benzoetsav) degradációja (Boldogkői és mtsai. 2021).

Ezt követően a nanohibrid filmréteg hatékonysága lényegesen nagyobb molekulatömegű (66 kDa) BSA biomakromolekulán is eredményesnek bizonyult. Kontrollnak fotokatalitikus nanorészecske nélküli polimer felület készült. Maga a BSA fehérje vizes oldatban

volt jelen. A 9-es ábra „A” része mutatja a koncentráció csökkenését a BSA-nak (kezdeti koncentráció: 100ppm) 8 óra fénybesugárzás alatt. Látható, hogy fotokatalitikus tulajdonsággal nem rendelkező felületen is csökken a BSA koncentrációja fény hatására (9. ábra). A fotokatalitikus felületen a degradáció mértéke jelentősen nagyobb, 2 óra besugárzás alatt a kezdeti BSA koncentráció 3,8%-ra csökkent, míg 6 óra besugárzás után gyakorlatilag nem lehetett BSA-t detektálni. Ez a magas fotooxidatív hatás a BSA-n nem csak az Ag-TiO₂ fotokatalitikus anyag magas fotoreaktivitásából ered, hanem abból is, hogy a Ag-TiO₂ részecskék fokozzák más molekulák felületen való megkötődését.



9. ábra: (A) BSA tesztfehérje fotokatalitikus bomlásának sebessége az Ag-TiO₂/polimer nanohibrid filmen, látható fény megvilágítása mellett és a (B) BSA tesztfehérje csökkenő fluoreszcencia spektruma (Boldogkői és mtsai. 2021).

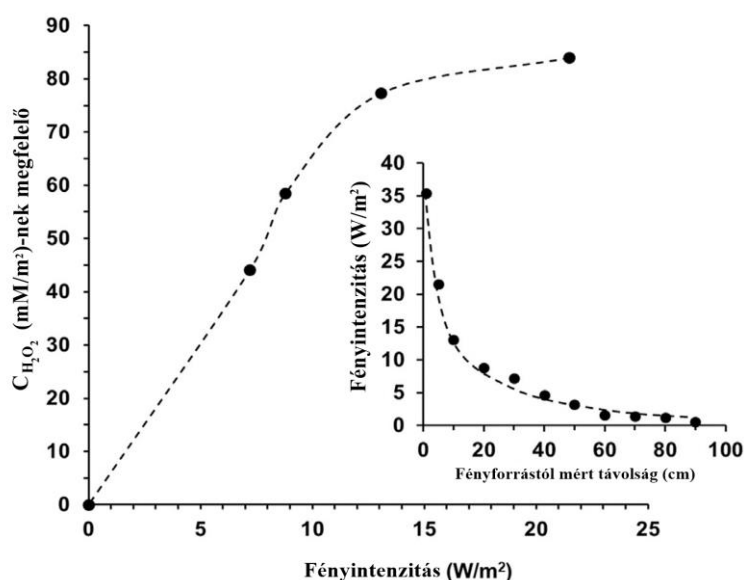
Ezt az interakciót nanorészecskék és biomakromolekulák között mások is leírták (Mariam, Dongre, és Kothari 2011). Abban a munkában ezüst nanorészecskék és BSA molekulák interakcióját vizsgálták fiziológiás pH-n, vizes oldatban, fluoreszcens spektroszkópiával. Azt tapasztalták, hogy az ezüst nanorészecskék képesek elnyelni a BSA fluoreszcenciáját, melynek magyarázata, hogy egy komplex alakul ki a BSA molekulák és az ezüst nanorészecskék között. Az ezüst nanorészecskéknek tehát két fontos szerepe van a TiO₂ felületen. Egyrészt növelik a felület fotokatalitikus hatékonyságát, másrészt fokozzák az interakciót a makromolekulák és az Ag-TiO₂

részecskék között a fent említett komplex képzés által. Mindezek egy erős fehérje fotodegradációs hatást eredményeznek.

4.2. Vírusok felvitele és a felületen történő túlélésük vizsgálata

Munkánk során az Ag-TiO₂/polimer filmmel borított felület hatását vizsgáltuk álveszettség vírussal (Tombác és mtsai. 2014) szemben. A vírus természetes körülmények között cseppeken keresztül terjed, így a felvitel során ezt a jelenséget utánoztuk. A felület tesztelését több körülmény megváltoztatásával végeztük el. Szobahőmérsékleten és 4°C-on vizsgáltuk a száradás pillanatában, illetve 10 perccel utána a felületeken megmaradt vírusokat. Mind a kontroll, mind a fotoreaktív felületeket a teljes munkafolyamat alatt megvilágítottuk, illetve sötétben tartottuk, attól függően melyik kísérletet végeztük el rajtuk.

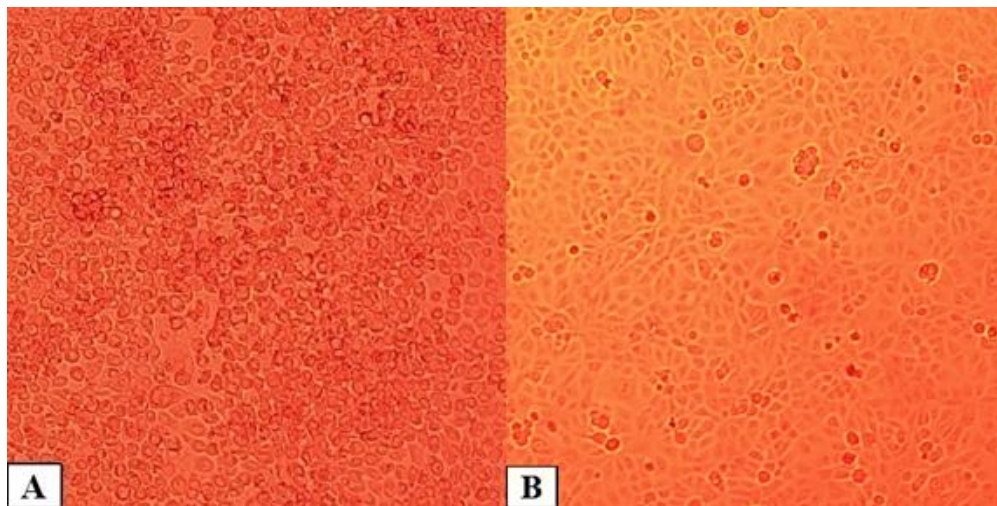
A fotoreaktív felületeken képződő reaktív oxigénformák (az ábrán a H₂O₂ mennyiség van feltüntetve) képződése 14 W/m² fényintenzitásnál egyfajta maximumot mutat (**10. ábra**). A fényforrás és a felület közti távolság csökkentésével ez a fényintenzitás növelhető, de 14 W/m² felett már nincs jelentős mértékű növekedés a H₂O₂ képződésében. Ez a fényintenzitás körülbelül 15 cm-es távolságról történő besugárzással érhető el, ezért a kísérletünkben ez a távolság szerepel.



10. ábra: A megvilágítás hatására képződő ROS koncentrációja a fotoreaktív rétegen. Az ábra a távolságtól függően mutatja a fényintenzitást. (Boldogkői és mtsai. 2021).

4.2.1. Az egészséges és az álveszettséggel fertőzött PK-15 sejtek morfológiai összehasonlítása

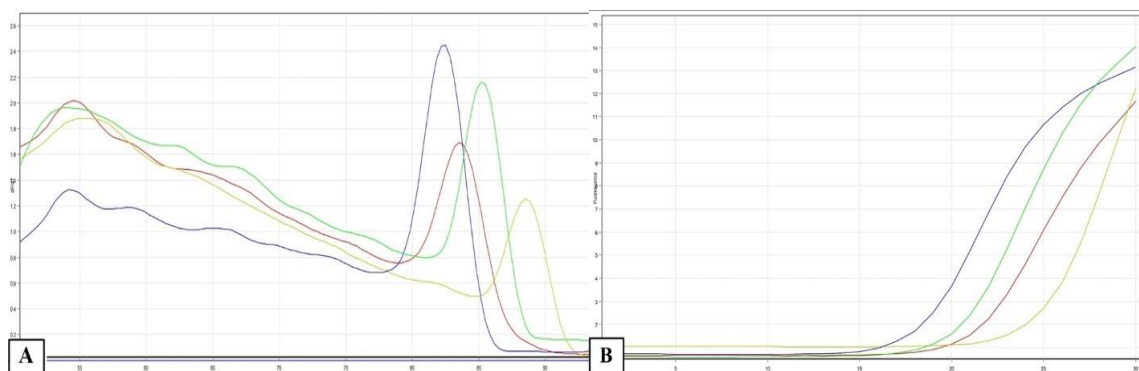
A fertőzött PK-15 sejtvonal morfológiája erős eltérést mutat az egészséges sejtvonaltól (**11. ábra**). Az egészséges sertés vese sejtek egy rétegben rendeződnek, jellegzetes nyúlványokat hoznak létre. Fertőzést követően a konfluens sejtkultúrában feltisztulási zónák alakulnak ki, ahol a sejtek először lekerekednek, majd a fertőzés előrehaladtával felválnak a tenyésztőedény aljáról.



11. ábra: (A) Fertőzött PK-15 sejtvonal részlete. Jellegzetes morfológiai elváltozást mutat, több helyen lyukak láthatók. Az elpusztult sejtek kerekednek, felváltak a tenyésztő flaska aljáról. (B) Egészséges PK-15 sejtvonal morfológiája. A sejtek letapadtak, nyúlványosok.

4.2.2. Felszaporított vírusok validálása qPCR reakcióval

A felszaporított vírusoknak négy eltérő génszakaszára specifikus primer párokat terveztünk, melyekkel validálni akartuk a nekünk szükséges vírus jelenlétét. A qPCR reakcióban a PK-15 sejtekben tenyésztett majd feltárt és tisztított vírus genomot használtuk. Ezek a génszakaszok csak a PRV-Ka vírusokban találhatók meg. A görbéken látszik, hogy a reakciók során egy-egy termék keletkezett, tehát a sejtek fertőzésre utaló morfológiáját tényleg a PRV-Ka vírus okozta (**12. ábra**).

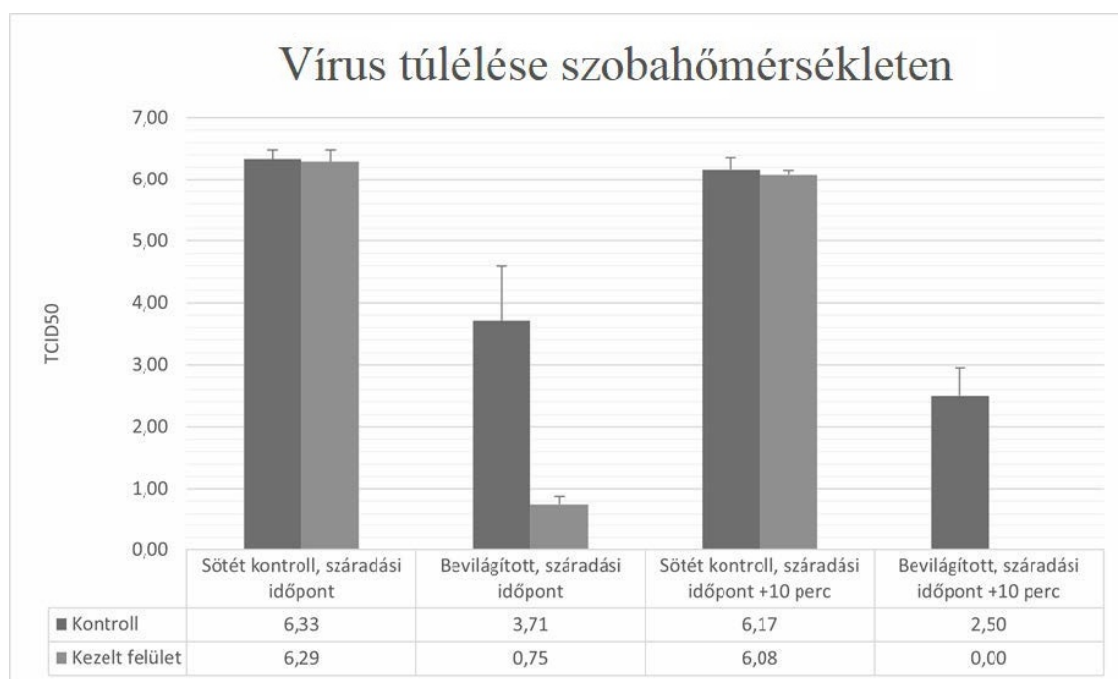


12. ábra: Piros: ul21, Sárga: ul23, Kék: ul29, Zöld: ul44 (A) qPCR reakció során kapott termékek olvadási görbéje és a (B) qPCR amplifikációs görbéje.

4.2.3. Szobahőmérsékleten vizsgált fotoreaktív felület virucid hatása

A szobahőmérsékleten megvilágított fotoreaktív felület drasztikus hatással volt a vírus fertőzőképességére a kontrollhoz képest. Gyakorlati vonatkozásban a nyálcseppek által felületre került vírusok beszáradnak, ezért kísérleteinkben ezt a folyamatot imitáltuk a vírusszuspenzió beszárításával. A kísérletet 3-3 párhuzamos mintán végeztük el. Az első mintavétel az aeroszol kiszáradásának időpontja, a második pedig a száradást követően 10 perccel történt. A vírusok fotoreaktív eliminálása eredményesnek bizonyult (**13. ábra**) (**2. táblázat**). Eredményeinkből látszik, hogy a felületre került vírusok túlélése jelentősen csökkent a beszáradás időpontjában, illetve a száradást követően 10 perccel a csökkenés még jelentősebb volt.

Átlagosan három nagyságrenddel több vírusrészecske volt a megvilágított, de kezeletlen felületen, mint a kezelt, fotoreaktív felületen. 10 perccel a száradást követően a fotoreaktív felületen nem volt fellelhető fertőzőképes vírus részecske, míg a kontroll felületen a vírusok egy jelentős része túlélte. Megfigyelhető továbbá, hogy a megvilágítás, mint egyedüli tényező is egyfajta virucid hatással bírt a kontroll felületen. A sötétben lévő kezelt és kezeletlen felületek között nincs nagy különbség, tehát mindenféleképpen szükséges a megvilágítás a virucid hatás érdekében. A beszáradás utáni 10 percnél önmagában nincs virucid hatása, mivel a vírus titer nem csökkent lényegesen a sötétben tartott felületen.



13. ábra: A fotokatalitikus felület virucid hatása szobahőmérsékleten.

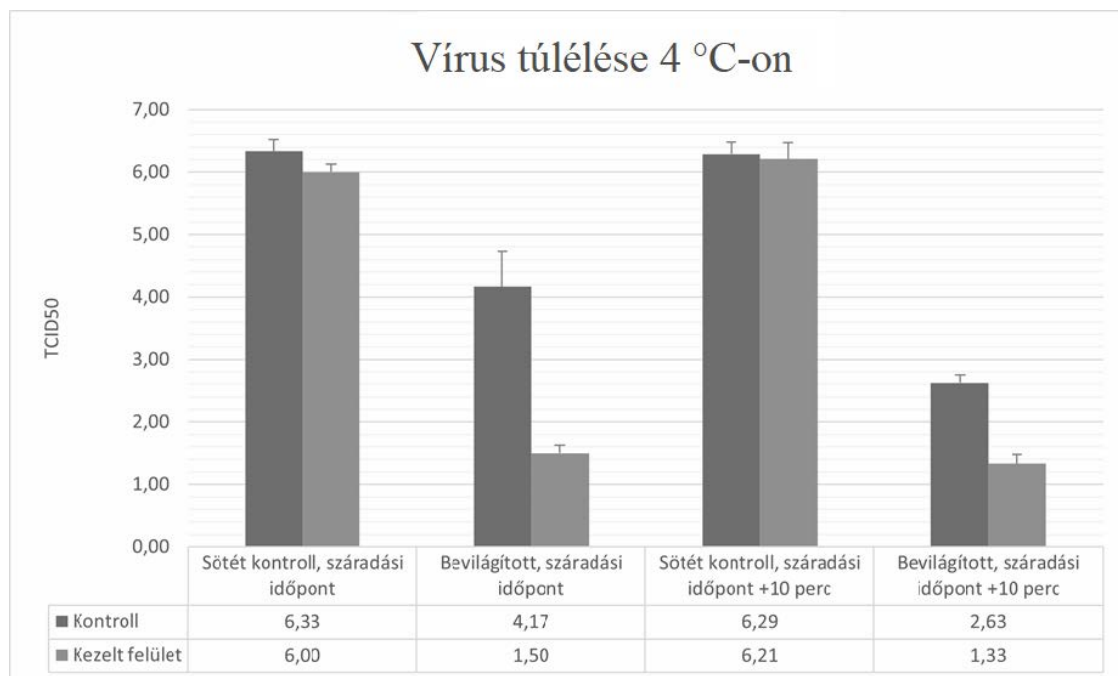
	TCID50				
	1.	2.	3.	Átlag	Szórás
Kontroll	4,50	2,75	3,88	3,71	0,89
Kezelt felület	0,75	0,625	0,875	0,75	0,13
Kontroll + 10'	2,125	2,375	3	2,50	0,45
Kezelt felület 10'	0	0	0	0,00	0,00
Sötét kontroll	6,25	6,50	6,25	6,33	0,14
Sötét, kezelt felület	6,50	6,13	6,25	6,29	0,19
Sötét, Kontroll + 10'	6,00	6,13	6,38	6,17	0,19
Sötét, kezelt felület + 10'	6,13	6,00	6,13	6,08	0,07

2. táblázat: A TCID50 értéke három párhuzamos kísérletben. A felületeket szobahőmérsékleten inkubáltuk.

4.2.4. 4°C-on vizsgált fotoreaktív felület virucid hatása

A 4 °C-on történő fotoreaktív hatás némileg alacsonyabb volt, mint szobahőmérsékleten. A megvilágított kísérletsorozatban közel két nagyságrenddel több víruspartikulum volt a kontrollon, mint a kezelt felületen (**14. ábra**) (**3. táblázat**). A virucid hatás csak kis mértékben nőtt, ha száradás után további 10 percet hagytuk a vírusokat a felületen. Itt is megfigyelhető a fény virucid hatása, mivel a beszáritást követően 10 perccel csökkent a vírus titer mennyisége a megvilágított kontroll felületen. Maga a száradás nincs virucid

hatással, ez megfigyelhető a sötét kísérletsorozat felületein. Összességben elmondható, hogy magasabb hőmérsékleten jelentősebb a fotoreaktív felület virucid hatása, de a hidegebb környezetben is jelentősen csökkent a víruspartikulumok száma a kontrollhoz képest.



14. ábra: A fotokatalitikus felület virucid hatása 4°C-on.

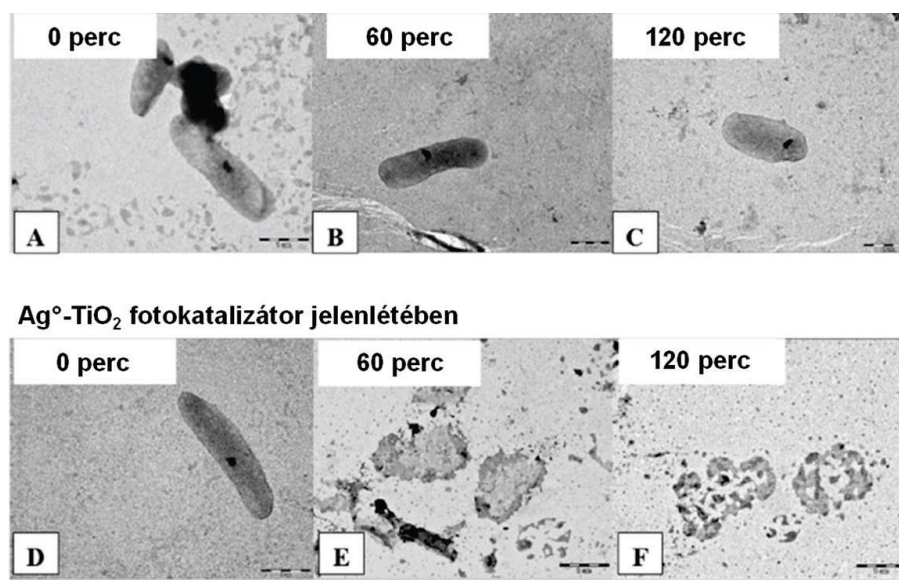
	TCID50			Átlag	Szórás
	1.	2.	3.		
Kontroll	4,75	4,13	3,63	4,17	0,56
Kezelt felület	1,625	1,5	1,375	1,50	0,13
Kontroll + 10'	2,5	2,75	2,625	2,63	0,13
Kezelt felület 10'	1,25	1,5	1,25	1,33	0,14
Sötét kontroll	6,38	6,50	6,13	6,33	0,19
Sötét, kezelt felület	6,12	6,25	6,50	6,29	0,19
Sötét, Kontroll + 10'	6,00	6,13	5,88	6,00	0,13
Sötét, kezelt felület + 10'	6,50	6,13	6,00	6,21	0,26

3. táblázat: A TCID50 értéke, három párhuzamos kísérletben. A felületeket 4°C-on inkubáltuk.

4.3. A fotoreaktív felület antibakteriális hatása

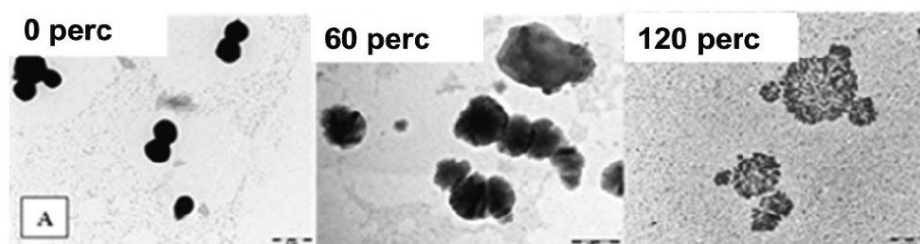
Számos vizsgálat alapján tudjuk, hogy a baktériumok sejtfala negatív töltés többlettel bír. Ezt Gram-negatív baktériumoknál a lipoproteinek és lipopoliszacharidok, míg Gram-pozitívnál a teichonsav jelenléte okozza. A negatív töltés miatt mindkét típusú baktérium képes elektrosztatikusan kötődni a fotoreaktív felület pozitív töltésű katalizátor nanorészecskéihez. A negatív töltéssűrűség nagyobb a Gram-pozitív baktériumoknál, mivel a sejtfalukon a teichonsav szerkezetéből adódóan több karboxil-csoport található. A fotoreaktív hatás mértéke függ a bakteriális sejtfal típusától. A Gram-pozitív MRSA (Methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus*) sejtfala például különösen érzékeny a kémiai hatásokra, így az antibakteriális felületen történő tesztelés alapján eredményesen eliminálható (Tallósy 2016).

A fotoreaktív felületek antibakteriális hatásait a Szegedi Tudományegyetem, Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék vizsgálta. A fotoreaktív filmréteg látható fénnnyel való megvilágítása képes hatékonyan eliminálni mind a Gram-pozitív, mind a Gram-negatív baktériumokat **(15. és 16. ábra)**. Az Ag-TiO₂ bevonatú felületen lévő MRSA telepek száma a kezdeti állapothoz képest 24 órás megvilágítást követően körülbelül 30%-ra csökkent, 48 órás megvilágítást követően a telepek csaknem teljes mennyisége degradálódott. Az eredményekből az következtethető, hogy a fotokatalitikus rendszer hatásfoka elegendően nagy ahhoz, hogy 2 nap alatt egy adott térben a jelenlévő bakteriális kórokozók közel 100%-át elpusztítsa.

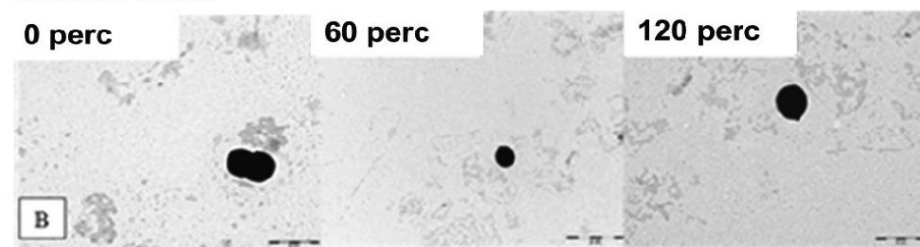


15. ábra: (A,B,C) kontroll felületen lévő Escherichia coli baktériumból izolált peptidoglikán struktúra változása idő függvényében. (D,E,F) Ag-TiO₂ katalizátor nanorészecskével borított felület hatása az idő függvényében. A megvilágítás LED ($\lambda_{\max}=405\text{ nm}$) típusú fényforrással történt (Dékány és mtsai. 2020).

Fotokatalizátor jelenlétében



Kontroll minta



16. ábra: (A sor) Ag-TiO₂ katalizátor nanorészecskével borított felület hatása Staphylococcus aureus baktériumok peptidoglikán rétegének struktúra változása az idő függvényében. (B sor) Kontroll felületen lévő peptidoglikán struktúra változás idő függvényében. Mindkét esetben a fényforrás egy LED (típusú $\lambda_{\max}=405\text{ nm}$) lámpa (Janovák és mtsai. 2019).

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A multirezisztens baktériumok terjedése, illetve az új mutáns vírusok megjelenése korunk egyik legjelentősebb kérdése. Az antibiotikum rezisztens baktériumok miatt bekövetkezett halálesetek száma évről évre nő, 2019-ben 1,27 millió ember halálát okozták. Több halálesetért felelősek, mint a HIV, vagy a malária. Becslések szerint az antibiotikum rezisztenciával összefüggésben lévő halálesetek száma 2050-re elérheti akár a 10 millió főt is. Jelentős szempont továbbá, hogy ezeknek a baktériumoknak a jelenléte megnehezítik az egyes fertőzések kezelését, műtéti eljárásokat és kemoterápiás kezeléseket. E probléma ellen jelenthetnek jövőbeli megoldást az öntisztuló felületeknek az alkalmazása, amelyek képesek lehetnek eliminálni különböző patogéneket. Az Ag-TiO₂/Polimer alapú, nanohibrid film mindössze 1-1,5 µm vastagságú. Látható fénnel ($\lambda \geq 435$ nm) történő bevilágítás hatására a fotoreaktív filmréteg felületén reaktív oxigén formák keletkeznek. Az eredményekből megállapítható, hogy az Ag-TiO₂ katalizátor nanorészecskék elegendő felületi ROS-t (~ 80 mM/m² H₂O₂) állítanak elő ahhoz, hogy sikeresen degradáljanak kis szerves molekulákat (benzoesav) és a nagy molekulatömegű fehérjéket (BSA) is. A BSA fehérjében bekövetkezett szerkezetbeli elváltozások miatt feltételeztünk egy lehetséges mikrobaellenes hatást, melyet laborunk a PRV vírussal le is tesztelt. A PRV az alphaherpeszvírusok közé tartozik, mely korunk legintenzívebben fertőző vírusfajaihoz (koronavírus, influenzavírus) hasonlóan épülnek fel. Az előbbieken említett víruscsaládok minden tagja cseppferőzéssel terjed, így különböző felületekre kerülve megtartják fertőzőképességüket. A munkánk során megfigyeltük, hogy a fotoreaktív felületre került vírusoknak drasztikusan csökkent a fertőzőképességük a kontroll felületekhez képest. Mind az aeroszol, mind a szárított állapotú vírusok életképessége csökkent, mely ígéretesnek tűnik a felület jövőbeli használatának szempontjából. Az antibakteriális hatás vizsgálatát a Szegedi Tudományegyetem, Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék laborjában végezték, mely a mi laborunkkal kollaborációban áll. Munkájuk során mind Gram-pozitív (*Staphylococcus aureus*) és Gram-negatív (*Escherichia coli*) baktériumokkal is megfigyelték a fotoreaktív felület antibakteriális hatását. Tesztelésük során használt mind két baktérium beletartozik azokhoz, melyek a világviszonylatban kialakult antibiotikum rezisztencia problémában szerepet játszanak.

6. JÖVŐBELI TERVEK

A fotokatalitikus nanorészecskék antimikrobiális hatásának vizsgálatában még a kísérletünk elején tartunk. Laborunkban a fotoreaktív felület vírusokra gyakorolt hatásának vizsgálata volt a fő cél. Mivel a fotokatalitikus felület elengedhetetlen része a rögzítő polimer molekula, így ezen a területen is folyamatban vannak további fejlesztések, hiszen tapasztaltuk korábban, hogy a különféle polimer anyagok erősen kihatnak a vizsgált fotoreaktív felület hatásosságára. Célunk, hogy a jövőben több fajta fémmel adalékolt TiO_2 felület hatását is megvizsgáljuk, különböző vírusokat alkalmazva. Illetve további jövőbeli terv a kísérlet egyes részeinek minél pontosabb standardizálása. Mint például a vírus szuszpenzió felületre juttatásának a gépésítése, standardizált cseppméretekkel és mennyiségekkel, illetve a különböző felület típusok eltérő száradási pontjának az egységesítése.

7. KONKLÚZIÓ

A fotoreaktív Ag- TiO_2 felület széleskörű alkalmazása innovatív és hatékony megoldásnak tűnik a kórokozók csíraszámának csökkentésének szempontjából. A különböző felületekről történő megfertőződés igen gyakori a cseppfertőzéssel terjedő vírusok és baktériumok között. A kórházak, közösségi területek, iskolák elemei ily módon könnyen kontaminálódhatnak, és fertőzhet meg indirekt módon számos embert.

A fotoreaktív tulajdonságú filmréteg egészségügyi intézményekben (kórházi váró termek, műtők, korlátok), valamint a járványok terjedésében nagy szerepet játszó iskolákban, munkahelyeken, tömegközlekedési eszközökön való hasznosítása lenne az elsődleges szempont. Különböző légtisztító egységekbe beépítve, hatékonyan tisztíthatóvá válnának nagyobb belső terek légtere. A kórházi környezet kedvezően hat a multirezisztens baktériumok szelekciójában és terjedésében. Így az egészségügyi intézetben való hasznosítása nagyban lecsökkentené a multirezisztens kórokozók kialakulásának esélyét. Mivel egészségügyileg biztonságos anyagról van szó, ruhaiparban is zajlanak fejlesztések ezen anyagok alkalmazásában. A fotoreaktív filmréteget élelmiszeripari munkaruhák, egészségügyi ruhák anyagára is fel lehet juttatni.

A vírusok jelenlétének kimutatására szolgáló TCID₅₀ módszer alkalmazása megfelelőnek bizonyult a hagyományos nukleinsav kimutatásokkal szemben, ugyanis a felület antivirális hatásának köszönhetően, olyan vírusok örökítőanyaga is kimutatásra került volna, amelyek már nem voltak életképesek az adott vizsgálati időpontban.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Antinone, Sarah Elizabeth, és Gregory Allan Smith. 2010. „Retrograde Axon Transport of Herpes Simplex Virus and Pseudorabies Virus: a Live-Cell Comparative Analysis”. *Journal of Virology* 84 (3): 1504–12. <https://doi.org/10.1128/JVI.02029-09>.
- Aziz, Ann-Marie. 2013. „The role of healthcare strategies in controlling antibiotic resistance”. *British Journal of Nursing* 22 (18): 1066–74. <https://doi.org/10.12968/bjon.2013.22.18.1066>.
- Boldogkői, Zsolt, Kamill Balint, Gautam B. Awatramani, David Balya, Volker Busskamp, Tim James Viney, Pamela S. Lagali, és mtsai. 2009. „Genetically Timed, Activity-Sensor and Rainbow Transsynaptic Viral Tools”. *Nature Methods* 6 (2): 127–30. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1292>.
- Boldogkői, Zsolt, Zsolt Csabai, Dóra Tombácz, László Janovák, Lilla Balassa, Ágota Deák, Péter S. Tóth, Csaba Janáky, Ernő Duda, és Imre Dékány. 2021. „Visible Light-Generated Antiviral Effect on Plasmonic Ag-TiO₂-Based Reactive Nanocomposite Thin Film”. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2021.709462>.
- Cesarman, Ethel, Yuan Chang, Patrick S. Moore, Jonathan W. Said, és Daniel M. Knowles. 1995. „Kaposi’s Sarcoma–Associated Herpesvirus-Like DNA Sequences in AIDS-Related Body-Cavity–Based Lymphomas”. *New England Journal of Medicine* 332 (18): 1186–91. <https://doi.org/10.1056/NEJM199505043321802>.
- Charpentier, P. A., K. Burgess, L. Wang, R. R. Chowdhury, A. F. Lotus, és G. Moula. 2012. „Nano-TiO₂/Polyurethane Composites for Antibacterial and Self-Cleaning Coatings”. *Nanotechnology* 23 (42): 425606. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/23/42/425606>.
- Chisholm, Cary, és Lisa Lopez. 2011. „Cutaneous Infections Caused by Herpesviridae: A Review”. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 135 (10): 1357–62. <https://doi.org/10.5858/arpa.2010-0156-RS>.
- Dékány, Imre, László Janovák, Ágota Deák, László Mérai, Szabolcs Péter Tallós, és Erzsébet Nagy. 2020. „Antimikrobiális környezet kialakítására alkalmas öntisztuló kompozit bevonatok fejlesztése”.
- Dharma, Hadi Nugraha Cipta, Juhana Jaafar, Nurul Widiastuti, Hideto Matsuyama, Saied Rajabsadeh, Mohd Hafiz Dzarfan Othman, Mukhlis A. Rahman, és mtsai. 2022. „A Review of Titanium Dioxide (TiO₂)-Based Photocatalyst for Oilfield-Produced Water Treatment”. *Membranes* 12 (3): 345. <https://doi.org/10.3390/membranes12030345>.
- Dickstein, Y., R. Nir-Paz, C. Pulcini, B. Cookson, B. Beović, E. Tacconelli, D. Nathwani, és mtsai. 2016. „Staffing for Infectious Diseases, Clinical Microbiology and Infection Control in Hospitals in 2015: Results of an ESCMID Member Survey”. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 22 (9): 812.e9–812.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.06.014>.

- Fu, Guifen, Patricia S. Vary, és Chhiu-Tsu Lin. 2005. „Anatase TiO₂ Nanocomposites for Antimicrobial Coatings”. *The Journal of Physical Chemistry. B* 109 (18): 8889–98. <https://doi.org/10.1021/jp0502196>.
- Gershon, Anne A., Judith Breuer, Jeffrey I. Cohen, Randall J. Cohrs, Michael D. Gershon, Don Gilden, Charles Grose, és mtsai. 2015. „Varicella Zoster Virus Infection”. *Nature Reviews Disease Primers* 1 (1): 1–18. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.16>.
- Goncalves, Priscila H., Joseph Ziegelbauer, Thomas S. Uldrick, és Robert Yarchoan. 2017. „Kaposi-Sarcoma Herpesvirus Associated Cancers and Related Diseases”. *Current opinion in HIV and AIDS* 12 (1): 47–56. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000330>.
- Gupta, Kiran, R P Singh, Ashutosh Pandey, és Anjana Pandey. 2013. „Photocatalytic antibacterial performance of TiO₂ and Ag-doped TiO₂ against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli*”. *Beilstein Journal of Nanotechnology* 4 (június): 345–51. <https://doi.org/10.3762/bjnano.4.40>.
- Halasi, Gyula, Imre Ugrai, és Frigyes Solymosi. 2011. „Photocatalytic decomposition of ethanol on TiO₂ modified by N and promoted by metals”. *Journal of Catalysis - J CATAL* 281: 309–17. <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2011.05.016>.
- Janovák, László, Ágota Deák, László Mérai, Szabolcs Tallósy, és I. Dekany. 2019. „Öntisztuló felületek alkalmazása szerves anyagok eliminálására, ill. biológiai rendszerek ártalmatlanítására”. *Magyar Kémiai Folyóirat* 125 (január): 83–90. <https://doi.org/10.24100/MKF.2019.02.83>.
- Kampf, Günter. 2020. „How long can nosocomial pathogens survive on textiles? A systematic review”. *GMS Hygiene and Infection Control* 15 (május): Doc10. <https://doi.org/10.3205/dgkh000345>.
- Klupp, Barbara G., Christoph J. Hengartner, Thomas C. Mettenleiter, és Lynn W. Enquist. 2004. „Complete, Annotated Sequence of the Pseudorabies Virus Genome”. *Journal of Virology* 78 (1): 424–40. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.1.424-440.2004>.
- Kőrösi, László, Albert Oszkó, Gábor Galbács, Andre Richardt, Volker Zöllmer, és Imre Dékány. 2007. „Structural Properties and Photocatalytic Behaviour of Phosphate-Modified Nanocrystalline Titania Films”. *Applied Catalysis B: Environmental* 1–2 (77): 175–83. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2007.07.019>.
- Kun, Robert, Sándor Tarján, Albert Oszkó, Torben Seemann, Volker Zöllmer, Matthias Busse, és Imre Dékány. 2009. „Preparation and Characterization of Mesoporous N-Doped and Sulfuric Acid Treated Anatase TiO₂ Catalysts and Their Photocatalytic Activity under UV and Vis Illumination”. *Journal of Solid State Chemistry* 11 (182): 3076–84. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2009.08.022>.
- Liu, Yun-Tao, Jonathan Jih, Xinghong Dai, Guo-Qiang Bi, és Z. Hong Zhou. 2019. „Cryo-EM Structures of Herpes Simplex Virus Type 1 Portal Vertex and Packaged Genome”. *Nature* 570 (7760): 257–61. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1248-6>.

- MacLachlan, N. James, és Edward J. Dubovi, szerk. 2017. „Chapter 9 - Herpesvirales”. In *Fenner’s Veterinary Virology (Fifth Edition)*, 189–216. Boston: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800946-8.00009-X>.
- Mariam, Jessy, P. M. Dongre, és D. C. Kothari. 2011. „Study of Interaction of Silver Nanoparticles with Bovine Serum Albumin Using Fluorescence Spectroscopy”. *Journal of Fluorescence* 21 (6): 2193. <https://doi.org/10.1007/s10895-011-0922-3>.
- Martra, G, S Coluccia, L Marchese, V Augugliaro, V Loddo, L Palmisano, és M Schiavello. 1999. „The Role of H₂O in the Photocatalytic Oxidation of Toluene in Vapour Phase on Anatase TiO₂ Catalyst A FTIR Study”. *Catalysis Today*, 8.
- Mei, Lin, Zhentan Lu, Wei Zhang, Zhongming Wu, Xinge Zhang, Yanan Wang, Yuting Luo, Chaoxing Li, és Yanxia Jia. 2013. „Bioconjugated Nanoparticles for Attachment and Penetration into Pathogenic Bacteria”. *Biomaterials* 34 (38): 10328–37. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.09.045>.
- Mettenleiter, T. C. 2008. „Pseudorabies Virus”. In *Encyclopedia of Virology (Third Edition)*, szerkesztette Brian W. J. Mahy és Marc H. V. Van Regenmortel, 341–51. Oxford: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00480-5>.
- Mettenleiter, Thomas C. 2000. „Aujeszky’s Disease (Pseudorabies) Virus: The Virus and Molecular Pathogenesis - State of the Art, June 1999”. *Veterinary Research* 31 (1): 99–115. <https://doi.org/10.1051/vetres:2000110>.
- Moldován, Norbert, Dóra Tombácz, Attila Szűcs, Zsolt Csabai, Michael Snyder, és Zsolt Boldogkői. 2018. „Multi-Platform Sequencing Approach Reveals a Novel Transcriptome Profile in Pseudorabies Virus”. *Frontiers in Microbiology* 8 (január): 2708. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02708>.
- Murray, Christopher JL, Kevin Shunji Ikuta, Fablina Sharara, Lucien Swetschinski, Gisela Robles Aguilar, Authia Gray, Chieh Han, és mtsai. 2022. „Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis”. *The Lancet* 399 (10325): 629–55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).
- Oláh, Péter, Dóra Tombácz, Nándor Póka, Zsolt Csabai, István Prazsák, és Zsolt Boldogkői. 2015. „Characterization of pseudorabies virus transcriptome by Illumina sequencing”. *BMC Microbiology* 15 (július): 130. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0470-0>.
- „New Report Calls for Urgent Action to Avert Antimicrobial Resistance Crisis”. é. n. Elérés 2022. március 22. <https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>.
- Pellett, Philip, A.J. Davison, R. Eberle, Bernhard Ehlers, G.S. Hayward, Vincent Lacoste, A.C. Minson, és mtsai. 2011. „Herpesvirales”. *Virus Taxonomy*, 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 99–107.
- Pomeranz, Lisa E., Ashley E. Reynolds, és Christoph J. Hengartner. 2005. „Molecular Biology of Pseudorabies Virus: Impact on Neurovirology and Veterinary Medicine”. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69 (3): 462–500. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.3.462-500.2005>.

- Ranger-Rogez, S., C. Venot, és F. Denis. 1999. „[Human herpesviruses 6 and 7 (HHV-6 and HHV-7)]”. *La Revue Du Praticien* 49 (20): 2227–31.
- Richter, Elizabeth R., James K. Dias, James E. Gilbert, és Sally S. Atherton. 2009. „Distribution of HSV-1 and VZV in Ganglia of the Human Head and Neck”. *The Journal of infectious diseases* 200 (12): 1901–6. <https://doi.org/10.1086/648474>.
- Rodríguez-Baño, Jesús, Antonio Oliver, José Ramón Paño-Pardo, és Álvaro Pascual. 2013. „Antimicrobial Stewardship Programs: A Public Health Priority in Spain. The SEIMC-REIPI Initiative”. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 31: 1–2. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(13\)70125-3](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(13)70125-3).
- Sykes, Jane E., és Sarah D. Cramer. 2014. „Chapter 25 - Pseudorabies”. In *Canine and Feline Infectious Diseases*, szerkesztette Jane E. Sykes, 257–60. Saint Louis: W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0795-3.00025-9>.
- Tallósy Szabolcs Péter. 2016. „Reaktív hibrid nanokompozit felületek antibakteriális hatása”. PhD, Szeged, Hungary: Szegedi Tudományegyetem. <https://doi.org/10.14232/phd.3092>.
- Tallósy, Szabolcs Péter, László Janovák, Judit Ménesi, Elisabeth Nagy, Ádám Juhász, László Balázs, István Deme, Norbert Buzás, és Imre Dékány. 2014. „Investigation of the Antibacterial Effects of Silver-Modified TiO₂ and ZnO Plasmonic Photocatalysts Embedded in Polymer Thin Films”. *Environmental Science and Pollution Research* 21 (19): 11155–67. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2568-6>.
- Tombácz, Dóra, Donald Sharon, Péter Oláh, Zsolt Csabai, Michael Snyder, és Zsolt Boldogkői. 2014. „Strain Kaplan of Pseudorabies Virus Genome Sequenced by PacBio Single-Molecule Real-Time Sequencing Technology”. *Genome Announcements* 2 (4): e00628-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00628-14>.
- Veres, Agnes, Judit Ménesi, Adam Juhasz, Otto Berkesi, Nóra Ábrahám, Gabriella Bohus, Albert Oszkó, és mtsai. 2014. „Photocatalytic performance of silver-modified TiO₂ embedded in poly(ethylacrylate-co-methyl metacrylate) matrix”. *Colloid and Polymer Science* 292 (január). <https://doi.org/10.1007/s00396-013-3063-1>.
- Whitley, Richard J. 1996. „Herpesviruses”. In *Medical Microbiology*, szerkesztette Samuel Baron, 4th kiad. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8157/>.
- Wiedbrauk, Danny L. 2010. „Chapter 37 - Herpes Simplex Virus”. In *Molecular Diagnostics*, szerkesztette Wayne W. Grody, Robert M. Nakamura, Charles M. Strom, és Frederick L. Kiechle, 453–60. San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369428-7.00037-9>.
- Yang, HongNa, Hui Han, Hao Wang, Yi Cui, Han Liu, és ShiFang Ding. 2019. „A Case of Human Viral Encephalitis Caused by Pseudorabies Virus Infection in China”. *Frontiers in Neurology* 10. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2019.00534>.
- Zanella, Marie-Céline, Samuel Cordey, és Laurent Kaiser. 2020. „Beyond Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus: a Review of Viruses Composing the Blood Virome of Solid Organ Transplant and Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients”. *Clinical Microbiology Reviews* 33 (4): e00027-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00027-20>.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Csabai Zsoltnak, hogy szakértelmével támogatást nyújtott a TDK pályamunkám elkészítésében.

Köszönöm Dr. Tombácz Dórának, hogy támogatta a dolgozatom elkészülését.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Boldogkői Zsoltnak, hogy lehetővé tette, hogy a csoportjában dolgozhassak az MSc-s diplomamunkámon.

Köszönöm Dr. Kredics Lászlónak, hogy elfogadta a belső konzultációra való felkérésemet és támogatta dolgozatom elkészülését.

Köszönettel tartozom a Szegedi Tudományegyetem, Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék kutatóinak, Prof. Dr. Dékány Imrének, Dr. Janovák Lászlónak és Dr. Deák Ágotának.

Hálával tartozom családomnak, páromnak és a barátaimnak, hogy nyugodt környezetet és támogatást nyújtottak a dolgozatom elkészítésben, illetve tanulmányaim során.

Tételes szerzői hozzájárulás:

Alulírott Dani Virág Éva a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a

- PK-15 sejtvonal tenyésztése és fenntartását
- PK-15 sejtek feltárása ultracentrifugálását
- Vírus DNS izolálását
- A qPCR-hez szükséges primerek megtervezését
- qPCR reakció összemérését
- TCID50 kiértékelését és a hozzá tartozó grafikonok elkészítését

végeztem el.

Szerző: Dani Virág Éva

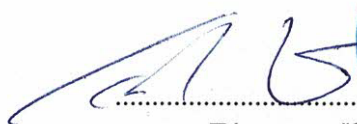
Levelezési cím: dani.virag.eva@stud.u-szeged.hu

Témavezetők: Dr. Csabai Zsolt

csabai.zsolt@med.u-szeged.hu

Dr. Tombáczi Dóra

tombacz.dora@med.u-szeged.hu


.....

.....
Témavezetők




.....
Hallgató