

Állatorvostudományi Egyetem
Élettani- és Biokémiai Tanszék, Biokémiai Osztály



**A cecropin A immunmodulátor hatásának vizsgálata csirke
eredetű hepatikus sejtmodellen**

TDK dolgozat

Készítette:

Kósa Mária

Témavezető:

dr. Márton Rege Anna

Állatorvostudományi Egyetem, Élettani és Biokémiai Tanszék,
PhD hallgató

Dr. Mátis Gábor

Állatorvostudományi Egyetem, Élettani és Biokémiai Tanszék,
egyetemi docens

Budapest, 2023

Tartalomjegyzék

Bevezetés	3
Célkitűzés.....	4
Irodalmi áttekintés	5
Antimikrobiális rezisztencia	5
Antimikrobiális peptidek	5
Szerkezetük	6
Közvetlen antimikrobiális hatás és hatásmechanizmus	6
Az AMP-k immunmoduláló hatása.....	8
Rovar eredetű AMP-k	8
Cecropin A	8
A máj szerepe az immunfolyamatokban	10
Anyag és módszer	11
A sejtek izolálása.....	11
Sejtek mosása és a sejtfrakciók elkülönítése	12
A sejtek lerakása és tenyésztése.....	13
Sejtek kezelése	13
Mérések.....	14
Extracelluláris laktát-dehidrogenáz aktivitás mérése.....	14
IL-6, IL-10, és IFN- γ koncentráció mérése	15
TGF- β 1 koncentráció mérése.....	15
Statisztika	15
Eredmények	17
Extracelluláris laktát-dehidrogenáz aktivitása	17
IL-6 koncentrációja	18
IL-10 koncentrációja	19
IFN- γ koncentrációja	20
TGF- β 1 koncentrációja	21
Értékelés.....	22
Összefoglalás	25
Irodalomjegyzék	27
Köszönetnyilvánítás.....	30

Bevezetés

A folyamatosan növekvő mértékű antimikrobiális rezisztencia (AMR), mely világszerte súlyos problémákat okoz, főleg a helytelen és mértéktelen antibiotikumfelhasználás eredménye. Mivel a multirezisztens (multidrug resistant, MDR) baktériumok száma rendkívül gyorsan nő, sok esetben kihívást jelent a korábban antibiotikummal még jól kezelhető bakteriális fertőzések elleni fellépés. A kórházakban jelentős mértékben jelenlévő multirezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomicin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (VRSA), és egyéb MDR baktériumok növelik mind a kórházi tartózkodás hosszát, mind a gyógyszerekre fordítandó költségeket. Emellett az állategészségügyben is folyamatosan növekvő AMR veszélyezteti a humánegészségügyet és a humánélelmezést is, nagyüzemi állattartás esetén pedig komoly gazdasági károkat okoz.

E probléma mérséklésére a kutatók olyan antibiotikum-alternatívákat próbálnak alkalmazni, mint az antimikrobiális peptidek (AMP-k), melyek új lehetőséget nyitnak a MDR baktériumok elleni küzdelemben. Az AMP-k antibiotikumokkal szembeni előnyei közé tartoznak, hogy a rezisztencia kialakulása ellenük csekély, széles spektrumú antimikrobiális és biofilmellenes hatással rendelkeznek, valamint a veleszületett immunrendszer kulcsfontosságú részét képezve az immunfolyamatokat befolyásolni képesek.

Az AMP-k közé tartozó cecropin A mind a Gram-negatív, mind a Gram-pozitív baktériumok esetében hatékony alternatívának ígérkezik a MDR kórokozókkal szemben, valamint immunmoduláló hatásáról is több kutatás beszámol. Kísérletünk során célunk a cecropin A *in vitro* immunmoduláló tulajdonságának vizsgálata volt csirke eredetű májsejt-nem-parenchimális sejt ko-kultúrán.

Célkitűzés

Az antimikrobiális rezisztencia súlyosbodása visszavezethető az állattenyésztésben évekig tartó kontrollálatlan antibiotikumhasználatra, így egyezményes törekvéssé vált az antibiotikum-felhasználás csökkentése és a haszonállattartásban való megfelelő védekezés a kórokozók okozta fertőzésekkel szemben. Mivel a bakteriális fertőzések a humánegészségügyben is problémát okoznak, így a rezisztenciahelyzet romlása globális problémákat vet fel, melynek kiküszöbölésére alternatív megoldások szükségesek. A természetes AMP-k széleskörű előfordulásukkal, csekély rezisztencia kialakítására mutatott hajlamukkal és immunmodulátor hatásukkal megfelelő választásnak bizonyulhatnak.

Kutatásunk során a rovar eredetű cecropin A immunmodulátor hatását vizsgáltuk csirke eredetű májsejt-nem-parenchimális sejt ko-kultúrákon. A kísérlet során a cecropin A hatását különböző koncentrációkban önmagában alkalmazva, illetve a Toll-like receptor (TLR) 3-agonista poliinozin-policitidilsavval (Poly I:C) kiváltott gyulladás mellett tanulmányoztuk. A mintavétel a felülúszóból történt, majd a sejtek életképességét az extracelluláris (EC) laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitásának kolorimetriás mérésével határoztuk meg. A gyulladásra kifejtett hatások feltárására Luminex-módszert alkalmazva mértük az interleukin (IL)-6, interferon (IFN)- γ és az IL-10 citokinek koncentrációját, valamint ELISA-módszerrel meghatároztuk a transzformáló növekedési faktor (transforming growth factor, TGF)- β 1 szintjét.

Irodalmi áttekintés

Antimikrobiális rezisztencia

Az antimikrobiális rezisztencia okozta globális problémák megoldása egyre kevésbé halogatható. Mivel az antibiotikumok mértéktelen és felelőtlen használata régen csak minimális szabályozás alatt állt, ezért ma már sok, korábban jó prognózisú betegség ellen a hatóanyagok jelentős része csökkent hatékonyságot mutat. Bár a rezisztenciahelyzet dinamikusán változik, és a világ különböző részein eltérő mértékű, a túlzott felhasználás miatt sok hatóanyag esetén esély sincs a néhai hatékonyság visszanyerésére, amennyiben az alkalmazás továbbra is ilyen kontrollálatlan marad. Egy 2015-ös kutatás szerint az eladott antibiotikumok 80%-a az állatgyógyászatban került felhasználásra profilaxisként és hozamfokozóként, és bár az adatok az Egyesült Államokra vonatkoznak, világszerte hasonló helyzettel állunk szemben. A rezisztencia mérséklésére az Európai Unió 2006-ban betiltotta a hozamfokozás céljából adott antibiotikumok alkalmazását, 2014-ben pedig felállította az állatgyógyászatban az AntiMicrobial Expert Group (AMEG) szakértői csoportot, melyben a humán gyógyászatban jelentős antibiotikumok figyelembevételével e hatóanyagok csökkent felhasználására tesznek ajánlásokat az állatorvoslásban [1]. Ennek ellenére a rezisztencia csökkentésének legjobb módja az antibiotikum-felhasználás drasztikus mérséklése lenne, ez pedig teret enged az újabb antimikrobiális szerek alkalmazásának is, mint amilyenek az AMP-k.

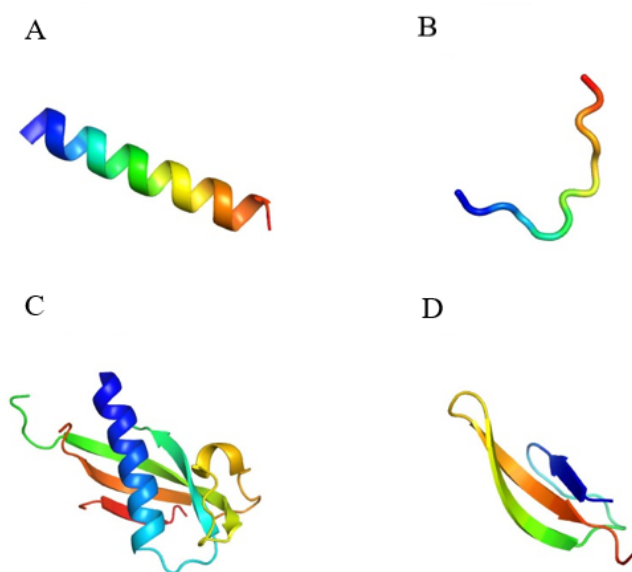
Antimikrobiális peptidek

Az AMP-ket 1939-ben fedezték fel, és egy talajlakó *Bacillus* baktériumból izolálták először. Az első állati eredetű AMP a nyúl leukocitáiból izolált defenzin volt [2]. A természetes AMP-k az élőlények többségében jelen vannak, a szervezetben jellemzően a patogéneknek kitett szövetekben és szervekben találhatók meg a veleszületett immunrendszer részeként, valamint fertőzés során befolyásolják a gazdaszervezet immunválaszát is. Utóbbit támasztja alá, hogy a Gram-negatív baktériumok pusztulása során felszabaduló lipopoliszacharid (LPS) emlősökben serkenteni képes az AMP-k termelődését [3].

A peptidek termelésében különböző sejtek vesznek részt, mint az emésztőrendszer, illetve a húgy- és nemiszervek epitél sejtjei, nyiroksejtek, limfociták és fagociták. Az AMP-ket specifikus gének expresszálják, melyek lehetnek konstitutívak, vagy meghatározott tényezők által indukálhatóak [2] [3].

Szerkezetük

Szerkezetüket tekintve 15-40 aminosavból álló oligopeptidek, hosszúságuk pedig meghatározza a molekula amfipatikus jellegét [4]. Az AMP-k jellemzően több csoportba sorolhatóak másodlagos szerkezetük alapján, mint például α -hélix, β -redő vagy lineárisan elnyújtott alakú, melyek közül az α -hélix és a β -redő a leggyakoribb, leginkább pedig az előbbit kutatják [5]. Néhány AMP nem tartozik egyetlen konkrét kategóriába sem (rendezetlen, másnéven random coil struktúra), és van, amelyik csak a célsejt membránjával való találkozáskor veszi fel az aktív formára jellemző szerkezetet [2]. Az AMP-kre jellemző másodlagos szerkezeti formákat az 1. ábra szemlélteti.



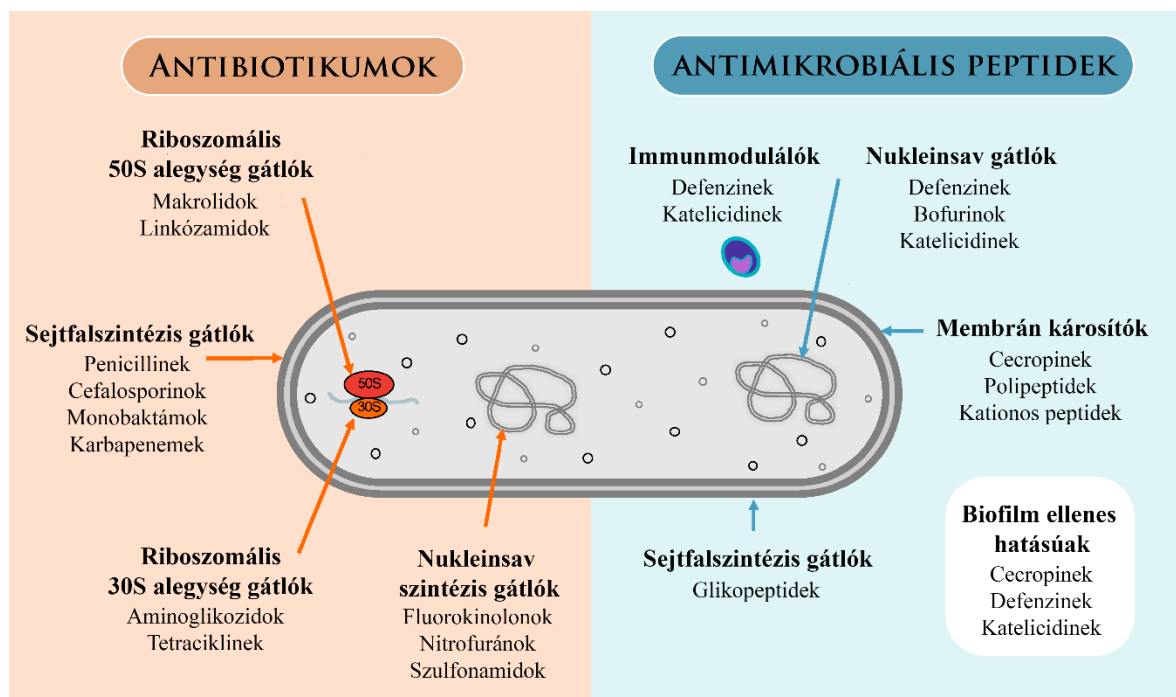
1. ábra: Az AMP-kre jellemző legfőbb másodlagos szerkezeti formák az α -hélix (A), lineárisan elnyújtott (B), rendezetlen (C) és β -redő (D) struktúra. Forrás: <https://www.profacgen.com/antimicrobial-peptides-services.htm>

A jellemzően kationos peptidek pozitív töltéséért a molekulákban jelentős mennyiségben megtalálható arginin és lizin aminosavak felelősek, melyek így közvetetten meghatározzák az AMP-k direkt baktériumellenes hatását is [6].

Közvetlen antimikrobiális hatás és hatásmechanizmus

Közvetlen antimikrobiális hatásuk kifejtése során az AMP-k célpontja elősorban a sejtfalban található negatív töltésű LPS, mely a Gram-negatív, illetve lipoteichósav (LTA), ami a Gram-pozitív baktériumok jellemzője [2] [7]. A folyamat során a kationos AMP-k hozzákapcsolódnak a negatív töltésű sejtfalhoz, amivel megváltoztatják a

membránpotenciált, ezzel károsítják a baktérium membránját, valamint a nagy méretű fehérjéket is, ami a kórokozó pusztulásához vezet (2. ábra). Az AMP-k pórusok kialakításával tovább roncsolják a baktériumok membránját, ezzel kifejtve antibakteriális hatásukat [8]. Mivel a baktérium életfunkcióiért felelős fehérjék harmada a sejtmembránhoz köthető, ezért a fehérjék AMP-k általi károsodása akkor is elpusztítja a baktériumot, ha közvetlenül nem okozza annak szétesését. Ennek ellenére minden esetben szükség van az AMP-k membránhoz való kapcsolódására a hatás elérése érdekében, ez pedig meghatározza a spektrumukat is. Az eukarióta sejtek magas koleszterintartalma és enyhe anionos töltése miatt azonban a gazdasejtek nem válnak a peptidek célpontjaivá [2]. A membránaktív AMP-k többsége amfipatikus; kationos tulajdonságuk lehetővé teszi a negatív töltésű sejtmembránnal való kölcsönhatást, hidrofób részük pedig a membránba való beépülését [9].



2. ábra: Antibiotikumok és antimikrobiális peptidek összehasonlítása hatásmechanizmus szerint. Forrás: Browne és mtsai., 2020 [1]

Néhány peptid emellett intracellulárisan is képes gátolni egyes, a baktériumokban zajló létfontosságú folyamatokat, mint a DNS-replikáció és a fehérjeszintézis (2. ábra), így akár sejtlízis nélkül is elpusztíthatják őket [10]. Emellett képesek lehetnek a sejt belüli autolizis aktiválására is, ami előidézi a baktérium szétesését. Ezek a folyamatok nem függenek össze a membránkárosító hatással, valamint érdekességük, hogy sokkal alacsonyabb AMP-koncentráció is elegendő hozzá [2].

Mindezek alapján az AMP-k hatásmechanizmusa eltér az antibiotikumokra jellemző hatásmechanizmustól, a baktériumok sokkal szélesebb spektruma ellen hatékonyak, ezért alkalmasak a sok hatóanyaggal szemben rezisztens kórokozók ellen is. Antibakteriális hatásuk mellett egyes AMP-k antimikotikus, antivirális, és biofilmellenes hatással is rendelkeznek, valamint a hagyományos antibiotikumokkal szinergista kölcsönhatásba léphetnek [3] [2].

Az AMP-k immunmoduláló hatása

Az AMP-k antimikrobiális hatásuk mellett igen jelentős immunmoduláló hatással is rendelkezhetnek, mely jelentős előnynek számít a hagyományos antibiotikumokkal szemben. A közvetlen antimikrobiális hatás mellett alternatív mechanizmusokat kínálnak fel a védekezéshez a gazdaszervezet számára, mely segít károsítani a baktériumokat. Ezek közé tartozik például a bél homeosztázisára vagy a gyulladásos folyamatokra kifejtett hatásuk. Pozitív tulajdonságuk tehát, hogy nem csak a patogénekre hatnak, hanem a fertőzésre adott immunreakció egészére [11]. A veleszületett immunitás részét képezve azt összekapcsolni képesek a szerzett immunitással, és így befolyásolni tudják az immunválaszt, a gyulladás mértékét és a homeosztázis fenntartásában is részt vesznek [12]. Gyulladáskeltő és gyulladáscsökkentő citokinek termelődésére is hathatnak, kemotaktikus tulajdonsággal rendelkezhetnek, semlegesíthetik a baktériumok pusztulása által felszabadult endotoxinokat és az immunsejtek aktivációjára is képesek lehetnek [12].

Rovar eredetű AMP-k

A rovarok rendkívül ellenállóak a bakteriális fertőzésekkel szemben, ezzel gazdag forrásai a természetes AMP-knek. A belőlük származó AMP-k 3 csoportba oszthatóak szekvenciájuk és szerkezetük szerint: α -hélix, β -redő és lineárisan elnyújtott szerkezetűek. Az α -hélix szerkezettel rendelkező peptidek, mint a cecropinek, jellemzően kevés ciszteint tartalmaznak, míg a β -redős szerkezetűek, mint a defenzinek, ciszteinben gazdagok. A lineárisan elnyújtott alakú AMP-k, mint a lebecinok, ezzel szemben különböző aminosavakból (általában prolin, arginin vagy triptofán) tartalmaznak nagyobb mennyiséget [13].

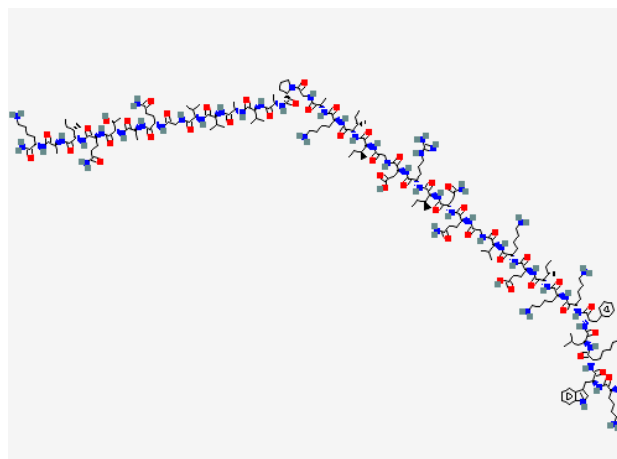
Cecropin A

A cecropinek a rovarokban természetes formában az egyik leggyakrabban előforduló AMP-k, melyek első képviselőjét a *Lepidoptera* (lepkék) törzsbe tartozó *Hyalophora cecropia* hemolimfájából sikerült izolálni. Kis méretű peptidekként nagyjából 30-40 aminosavból

állnak és α -hélix szerkezettel rendelkeznek. A cecropinek hatékonynak bizonyultak számos Gram-negatív és (ugyan kisebb mértékben, de) Gram-pozitív baktérium ellen is, ezen felül pedig gombaellenes hatással is rendelkeznek. Számos egyéb AMP-vel összehasonlítva hangsúlyozandó, hogy mind a hemolitikus hatásuk, mind a magasabb rendszertani kategóriába tartozó élőlények gazdasejtjeivel szemben mutatott toxicitásuk alacsonyabb [14].

Korábbi kutatások már *in vivo* körülmények között is vizsgálták a cecropinek immunmoduláló hatását, többek között a pontyok bél mikrobiomjára vonatkozóan, valamint egerek esetén mesterségesen kiváltott gyulladásos bélbetegségben (inflammatory bowel disease, IBD) is [15] [16]. Baromfi esetén pedig már voltak korábbi kutatások a peptidek növekedési erélyre, a bél morfológiájára, a vakbél mikroflórájára és immunfolyamatokra kifejtett hatásának feltérképezésére. Ebből kiderült, hogy a cecropinek alkalmazása kedvezően hatott a növekedésre, az izomzat fejlődésére, meggátolta a káros bélbaktériumok elszaporodását, míg serkentette a hasznos bélbaktériumok proliferációját és erősítette az immunrendszert [17].

A cecropinek egyik legintenzívebben kutatott tagja, a cecropin A egy 37 aminosavból álló, az egyes rovarokban természetes körülmények között termelődő AMP, melynek szerkezetét a 3. ábra szemlélteti [14]. Széles spektrumú közvetlen antimikrobiális hatása mellett a cecropin A korábbi kutatások eredményei alapján bizonyítottan immunmoduláns tulajdonsággal is rendelkezik [18]. *In vitro* körülmények között RAW 264.7 egér makrofág- és IPEC-J2 sertés bélhám-sejtvonalon is, gyulladás kiváltása után a peptid gátló hatást fejtett ki az LPS okozta gyulladásos citokinek termelődésére, mint a tumor nekrosis faktor α (TNF α), interleukin (IL)-1 β , IL-6 és IL-8, valamint makrofág gyulladásos fehérje (macrophage inflammatory protein, MIP)-1 és MIP-2. Mindezek mellett már *in vivo* körülmények között is fény derült a cecropin A gyulladáscsökkentő hatására, egerek *intraperitoneális* kezelése után. *Escherichia colival* indukált hashártyagyulladásban a peptid alkalmazása után javult az állatok túlélése, továbbá csökkent a plazma TNF α - és endotoxin-koncentrációja is [19]. Egerek kísérletesen kiváltott IBD-je során pedig cecropin A hatására a tünetek enyhülését és egyes gyulladásos citokinek (TNF α , IL-1 β és IL-6) szintjének lokális csökkenését írták le [20].



3. ábra: A cecropin A szerkezete. Forrás: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cecropin-A>

A máj szerepe az immunfolyamatokban

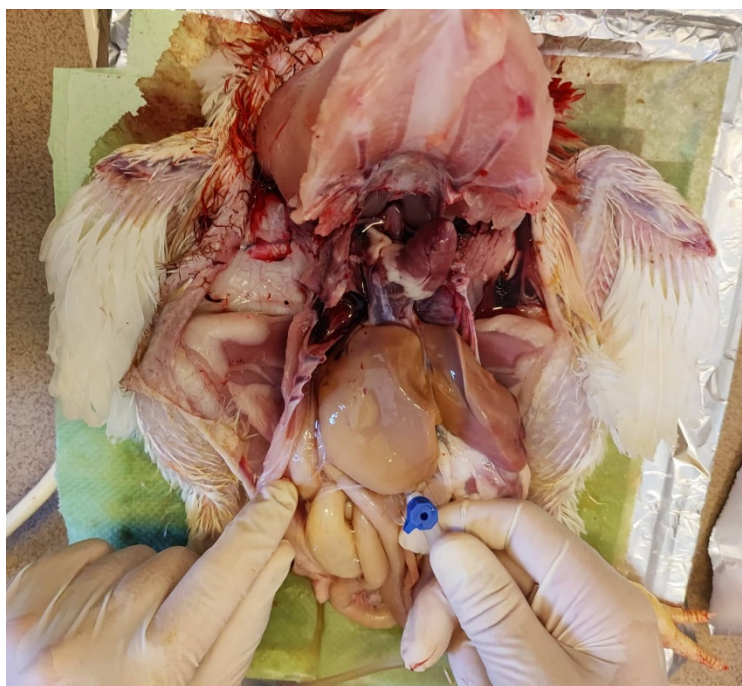
A máj méregtelenítő szerepe szoros kapcsolatban áll a béltraktussal. Innen a tápanyagokon kívül a baktériumok és toxinjaik is a májba kerülnek, melyet az anatómiailag is szoros közelségben lévő bél-máj tengely tesz lehetővé. A folyamat során a bélből a portális keringésen keresztül a májba jutnak a felszívódni képes molekulák, így akár a bélfertőzés során felszabaduló LPS és egyéb kórokozó eredetű metabolitok is, ami hosszútávon károsíthatja a máj szerkezetét és funkcióját. A felszaporodott patogén-asszociált molekuláris mintázatok (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) és sérülés-asszociált molekuláris mintázatok (damage-associated molecular pattern, DAMP) közvetlenül is hatással lehetnek a hepatocitákra és a májban lévő, a veleszületett immunitás részét képező egyéb sejtekre, pl. Kupffer-sejtekre is, melyek a felületükön elhelyezkedő Toll-like receptorok (TLR) által aktiválják az immunfolyamatokat. Az immunológiailag aktiválódott máj pro-inflammatorikus, apoptotikus és antivirális folyamatokat is elindíthat, mely lehet pozitív és negatív hatású is a szervezetre, a folyamatok intenzitásától függően [21]. A máj regenerálódásához, szerkezeti átépüléséhez és metabolizmusához szintén szükségesek a gyulladásos folyamatokban résztvevő anyagok, de ez a szervezet túlterheltsége esetén erőteljes immunválaszt képes kiváltani [22].

Anyag és módszer

A sejtek izolálása

A kísérlet során a sejtizoláláshoz 6 hetes hímivarú Ross-308 brojlersirkét alkalmaztunk, és a kutatócsoport által már korábban kidolgozott protokoll szerint jártunk el. [23] Az állatot a beérkezése után azonnal felhasználtuk, így az Állatorvostudományi Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának (MÁB) álláspontja szerint állatkísérleti engedélyre nem volt szükség [23]. Amennyiben a továbbiakban nincsen erre vonatkozó külön megnevezés, minden szükséges anyagot és reagenst a Merck Kft.-től (Darmstadt, Németország) szereztünk be.

Szén-dioxiddal való kábítás után az állatot dekapitáltuk, a ventrális területről eltávolítottuk a tollakat, majd dorzális fektetésben rögzítettük. A bőrfelület etanollal történő megtisztítása után tompa fejtéssel feltártuk a testüreget, majd 22G-s vénakanüllel kanüláltuk a v. *gastropancreaticoduodenalis*, melyen keresztül később perfúziós folyadékot vezettünk a májba (4. ábra). A szív kanülálása a jobb pitvaron ejtett metszéssel, majd üvegkanül behelyezésével történt, melyen keresztül a vénán bevezetett oldatokat elvezethettük.



4. ábra: A máj perfúziója a v. *gastropancreaticoduodenalis* kanülálásán keresztül

A kísérlet során háromlépcsős perfúziót alkalmaztunk, ahol a perfúzió állandó sebessége 30 ml/perc volt, az oldatok pedig 40°C-on kerültek felhasználásra, melyeket előzőleg Carbogennel (95% O₂ és 5% CO₂) buborékolattunk át.

Először 150 ml 0,5 mmol/l etilén-glikol-tetraacetát (EGTA) tartalmú HANKS-puffert vezettünk át a rendszeren a máj vértelenítése és a sejtközötti állományban fellelhető kationok (Ca^{2+} és Mg^{+} ionok) megkötése érdekében. Az EGTA így kelátokat képezve a sejtkapcsolatokban jelen lévő ionokkal fellazítja a szöveteket, ami segíti a sejtizolációt.

Ezután 150 ml EGTA-mentes HANKS-puffer következett, melyet az EGTA teljes eltávolítása céljából vezettünk át a rendszeren, hogy a reziduumok az ionok megkötésével ne befolyásolják kedvezőtlenül a későbbi emésztési folyamatot.

Ezt követően 100 ml kollagenáz oldat perfúziójával megkezdjük az interstícium emésztését. Az oldat 100 mg IV. típusú, frissen feloldott kollagenázt, valamint 7 mmol/l CaCl_2 -vel és ugyanennyi MgCl_2 -vel kiegészített HANKS-oldatot tartalmazott. A jobb pitvaron át elfolyó oldatot steril tripszinező lombikban felfogtuk, majd vízfürdőn melegen tartva ismét recirkuláltattuk a rendszeren, míg fel nem tűnt a 3. ábrán is látható, a májparenchima felbomlására jellemző rajzolat.

Sejtek mosása és a sejtfrakciók elkülönítése

A perfúziót követően a májat eltávolítottuk, és egy steril főzőpohárba helyeztük. A sejtizolálás során a továbbiakban végig steril fülke alatt dolgoztunk a kontamináció elkerülése érdekében. A Glisson-tokot steril ollóval és csipesszel felvagtuk, majd 50 ml szarvasmarha szérumban albuminnal (bovine serum albumin, BSA) kiegészített hideg HANKS-oldatba helyeztük a sejtek összetapadásának elkerülése érdekében. Az emésztett májparenchimát óvatosan, steril csipesz használatával nyertük ki. A szuszpenziót 3 réteg steril gézen át szűrtük az emésztetlen részek és az összetapadt sejtcsoportok eltávolítása érdekében, majd 50 ml-es steril centrifugacsőbe mértük, ezután pedig a sejtsuszpenziót BSA-tartalmú HANKS-oldatban, jeges hűtéssel, 50 percig inkubáltuk. A sejtsuszpenzió sejtfrakciók szerinti szétválasztása ezután differenciáló centrifugálással történt. Ennek során a hepatocitákat választottuk szét a nem-parenchimális sejtektől úgy, hogy az első centrifugálási sorozat során nyert üledék a hepatocitákat, a második pedig a nem-parenchimális sejteket tartalmazta.

A hepatociták elkülönítéséhez egymás után háromszor, 3 percig 100 g fordulatszámon történt a centrifugálás, először BSA-val kiegészített HANKS-oldattal, majd kétszer William's Medium E tápfolyadékkal. A tápfolyadékot előzetesen 0,22 % Na-bikarbonáttal, 50 mg/l gentamicinnel, 2 mmol/l glutaminnal, 5 % fetális borjú szérummal (fetal bovine serum,

FBS), 4 µg/l dexametazonnal, 20 IU/l inzulinnal és 0,5 µg/ml amfotericinnel egészítettük ki. Az így nyert üledéket végül reszuszpendáltuk William's Medium E-ben, amivel hepatocitákban gazdag szuszpenziót nyertünk.

Az életképes sejtek számának meghatározását Bürker-kamra alatt végeztük tripánkék festéssel, ahol életképes sejteknek a nem festődő alakokat tekintettük. Ennek magyarázata, hogy tripánkék festés során csak a károsodott sejtmembránon képes átjutni a festék, így a kézzel festődött sejtek életképtelennek minősülnek, míg a festetlen sejtek életképesek. A sejtszuszenzió akkor tekinthető használatra alkalmasnak, ha az életképes sejtek aránya a mintában 90% feletti. Az életképesség meghatározása után sejtszámlálást végeztünk, majd a tömény sejtszuszenziót 10^6 /ml-re hígítottuk a sejtszámnak megfelelően.

A nem-parenchimális sejtek nyeréséhez a korábban a hepatociták izolációja során kapott felülúszók elegyét centrifugáltuk 350 g-n, 10 percig. Ezután a felülúszókat ismét 10 percig centrifugáltuk, ezúttal azonban már 800 g-n. A centrifugálások után kapott nem-parenchimális sejteket tartalmazó üledéket 5 ml William's Medium E-ben reszuszpendáltuk, majd tripánkék festéssel, Bürker-kamra felhasználásával a korábbihoz hasonlóan megállapítottuk az életképes sejtek arányát. A tömény sejtszuszenzió hígítása sejtszámlálás után ebben az esetben is 10^6 /ml-re történt.

Végül a hepatocitákat és nem-parenchimális sejteket tartalmazó frakciókat 6:1 arányban elegyítettük egymással a ko-kultúra létrehozásához.

A sejtek lerakása és tenyésztése

A sejtszuszenziót 300 µl/lyuk mennyiségben 24 lyukú sejtenyésztő lemezekre mértük. A lerakást megelőzően a lemezeket I-es típusú kollagénnel ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) vontuk be a sejtek letapadásának elősegítése céljából. A lemezeket ezután 100%-os relatív páratartalmú és 5% CO_2 -tartalmú, 37°C -os inkubátorba helyeztük. Tápfolyadék cseréjére 4 óra, 37°C -on történő inkubációt követően került sor, amit egy szintén 37°C -os, 24 órás inkubáció követett, melynek eredményeként összefüggő sejtenyészeteket nyertünk.

Sejtek kezelése

Az inkubációt követően a sejtenyészeteket önmagában, illetve 50 µg/ml Poly I:C-vel kiváltott gyulladás mellett kezeltük különböző koncentrációjú cecropin A-oldatokkal. A kezelési csoportokat az 1. táblázat szemlélteti.

1. táblázat: Csirke eredetű májsejt-nem-parenchimális ko-kultúrákon alkalmazott kezelési csoportok.

Kezelési csoport	Cecropin A	Poly I:C
Kontroll	—	—
Cec-1	1 µg/ml	—
Cec-2	3,125 µg/ml	—
Cec-3	6,25 µg/ml	—
Cec-4	12,5 µg/ml	—
Cec-5	25 µg/ml	—
PI:C	—	50 µg/ml
PI:C+Cec-1	1 µg/ml	50 µg/ml
PI:C+Cec-2	3,125 µg/ml	50 µg/ml
PI:C+Cec-3	6,25 µg/ml	50 µg/ml
PI:C+Cec-4	12,5 µg/ml	50 µg/ml
PI:C+Cec-5	25 µg/ml	50 µg/ml

Minden kezelési csoport 6 párhuzamos minta alkalmazásával történt, így csoportonként később 6 mérést végeztünk, és ezek átlagát vettük eredményként. A kezelések után sejtenyészeteinket 24 órán át, 37°C-on inkubáltuk, majd ennek leteltével mintát vettünk a felülúszóból, ezeket pedig további felhasználásig -80°C-on tároltuk.

Mérések

Extracelluláris laktát-dehidrogenáz aktivitás mérése

Az LDH intracellulárisan katalizálja a reverzibilis piruvát-laktát átalakulást, amely NADH+H⁺ termelődéséhez vezet. A sejthártya sérülésekor azonban az enzim a tápfolyadékba jut, így a képződött NADH+H⁺ mennyiségének mérésével meghatározható az LDH aktivitása, ezáltal a membránkárosodás mértéke és a sejtek életképessége. A mérés során, a Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit alkalmazásával, a gyártó utasításai szerint 50 µl/lyuk puffer- és szubsztráttartalmú Master Reaction Mixet mértünk a mintákra, amit 37°C hőmérsékleten, fénytől védve, 2-3 perces inkubáció követett. Ezután 450 nm-en, Multiscan GO 3.2 reader (Thermo Fisher Scientific Kft., Waltham, MA, USA) segítségével határoztuk meg az abszorbanciákat, amit a továbbiakban 5 percenként elvégeztünk, amíg a legaktívabb minta értéke elérte a legtöményebb standard abszorbanciáját.

IL-6, IL-10, és IFN- γ koncentráció mérése

Az IL-6, IL-10, és IFN- γ citokinek koncentrációit Milliplex Chicken Cytokine/Chemokine Panel 1 – Immunology Multiplex Assay felhasználásával, a Pécsi Tudományegyetem Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézetében, Luminex-módszerrel vizsgáltuk, melynek nagy előnye, hogy kis mennyiségű mintából is akár 100 különböző analit koncentrációja meghatározható. A mérés során egy 96 lyukú lemezre lyukanként 25 μ l-t vittünk fel a mintából, ezen felül 25 μ l antitesttel bevont, színezett gyöngyöt mértünk minden lyukba. A lemezt egy éjszakán keresztül inkubáltuk, majd a mosási fázist követően biotinilált detektáló antitestet, sztreptavidint és fikoeritrin adtunk hozzá. A végső mosás után 150 ml drive folyadékot mértünk a lyukakhoz, a gyöngyöket 5 percre lemezzázógépre tettük és reszuszpendáltuk, majd Luminex MAGPIX gép segítségével leolvastuk az eredményeket. Ezt követően Luminex xPonent 4.2 szoftvert használtunk az adatok kiértékeléshez, és a Belysa Immunoassay Curve Fitting szoftver segítségével kalibrációs görbéket készítettünk [24].

TGF- β 1 koncentráció mérése

A TGF- β 1 koncentrációját csirkespecifikus szendvics ELISA-módszerrel határoztuk meg (Chicken Transforming Growth Factor Beta 1 ELISA Kit, MyBioSource, San Diego, CA, USA), melyhez a mintákat foszfátpufferelt sóoldattal (phosphate-buffered saline, PBS) hígítottuk. A mérés a kithez tartozó 96 lyukú lemezen történt, ahol 100 μ l/lyuk standard, minta és vak hozzáadása után 90 percig tartó, 37°C-on történő inkubáció következett. Ezután két mosási fázisra került sor, majd 100 μ l/lyuk Biotinylated Antibody bemérése után a lemezt 60 percen át, 37°C-on inkubáltuk. Három mosás követte a folyamatot, mely után a vak kivételével minden lyukba 100 μ l Enzyme Conjugate oldatot mértünk, amit ezután 30 percig, 37°C-on tovább inkubáltunk. Ezután ötszöri mosást követően 100 μ l/lyuk Colour Reagent (A+B) bemérése történt, majd sötétben, 37°C-on a legtöményebb standard látványos elsötétedéséig (~20 perc után) ismét inkubáció következett. Ezt követően 100 μ l/lyuk Colour Reagent C bemérése történt, majd összekeverés után 450 nm-en 10 percen belül Multiscan GO 3.2 reader segítségével mértük meg a minták abszorbanciáját.

Statisztika

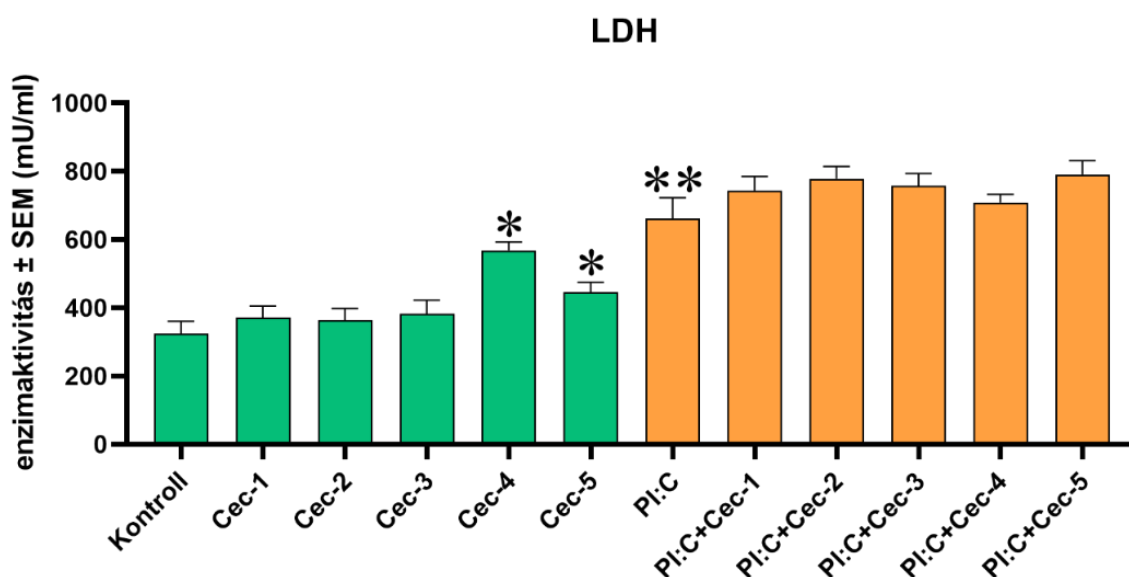
Statisztikai vizsgálataink során a kezelési csoportok eredményeinek páronkénti összehasonlításához az R v. 4.0.3 (R Core Team, 2020) program használatával a Wilcoxon-próbát alkalmaztuk, szignifikáns különbségnek pedig a 0,05-nél kisebb p értéket tekintettük.

Az önmagában cecropin A-t tartalmazó kezelési csoportokat (Cec-1-5) és a Poly I:C által kiváltott gyulladást (PI:C) a Kontroll csoporthoz, míg a Poly I:C és a cecropin A kombinációs kezeléseit (PI:C+Cec-1-5) a PI:C csoporthoz hasonlítottuk. Az ábrák a Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, V 9.2.1) program segítségével készültek.

Eredmények

Extracelluláris laktát-dehidrogenáz aktivitása

Eredményeink alapján a cecropin A alacsonyabb koncentrációinak (1; 3,125 és 6,25 µg/ml) hatására nem változott az LDH aktivitása, azonban magasabb koncentrációi (12,5 és 25 µg/ml) esetén szignifikáns növekedés ($p=0,0159$ és $p=0,0381$) volt észlelhető. A Poly I:C-okozta gyulladás esetén az LDH aktivitása szignifikáns növekedést ($p=0,0095$) mutatott a Kontroll csoporthoz képest (5. ábra).

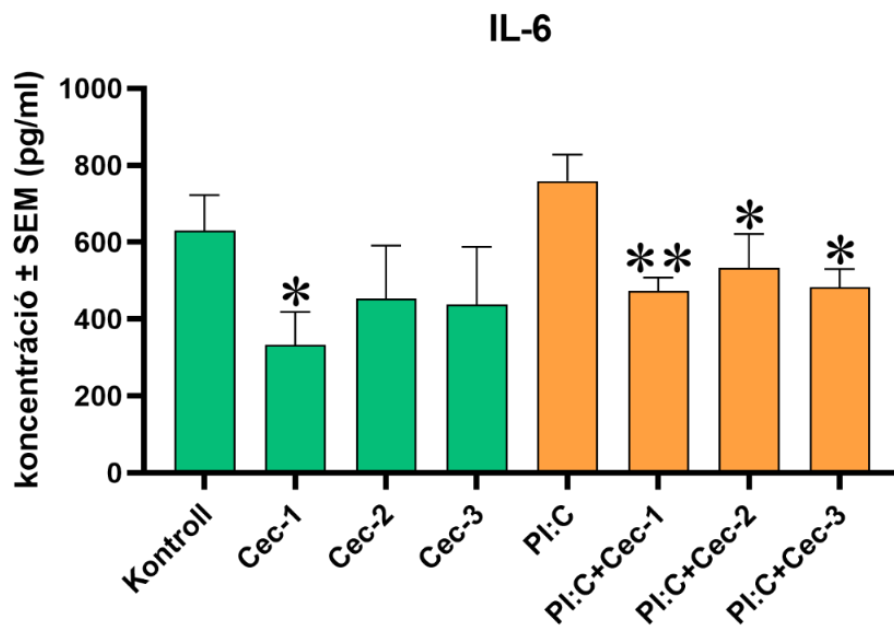


5. ábra: Az EC LDH enzim aktivitása csirke eredetű májsejt-nem-parenchimális sejt ko-kultúrán, cecropin A- és Poly I:C-kezelés hatására. Cec-1: 1 µg/ml cecropin A; Cec-2: 3,125 µg/ml cecropin A; Cec-3: 6,25 µg/ml cecropin A; Cec-4: 12,5 µg/ml cecropin A; PI:C: 50 µg/ml Poly I:C. * $p<0,05$; ** $p<0,01$

Az EC LDH aktivitásának meghatározása során kapott eredmények alapján a cecropin A immunmodulátor hatását már csak a peptid alacsonyabb koncentrációjú (1; 3,125 és 6,25 µg/ml) kezelési csoportjaira vonatkozóan vizsgáltuk.

IL-6 koncentrációja

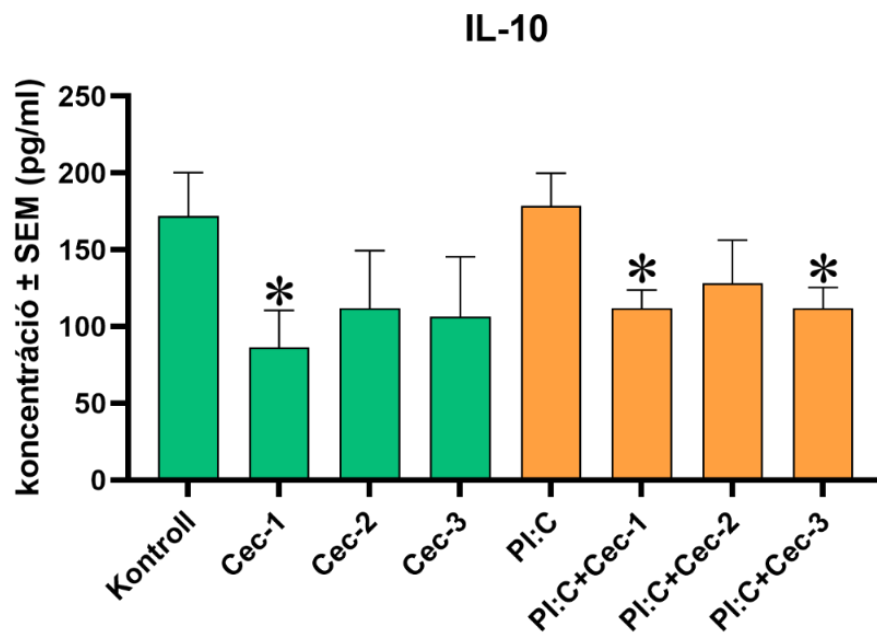
Kísérletünkben a sejttenyészetekhez önmagában adott 1 µg/ml koncentrációjú, valamint 50 µg/ml Poly I:C-vel kiváltott gyulladás esetén az 1; 3,125 és 6,25 µg/ml koncentrációjú cecropin A az IL-6 termelésében szignifikáns csökkenést eredményezett ($p=0,0381$, $p=0,0022$, $p=0,0411$ és $p=0,0152$) (6. ábra).



6. ábra: Az IL-6 koncentrációja csirke eredetű májsejt nem-parenchimális sejt ko-kultúrán, cecropin A- és Poly I:C-kezelés hatására. Cec-1: 1 µg/ml cecropin A; Cec-2: 3,125 µg/ml cecropin A; Cec-3: 6,25 µg/ml cecropin A; PI:C: 50 µg/ml Poly I:C. * $p<0,05$; ** $p<0,01$

IL-10 koncentrációja

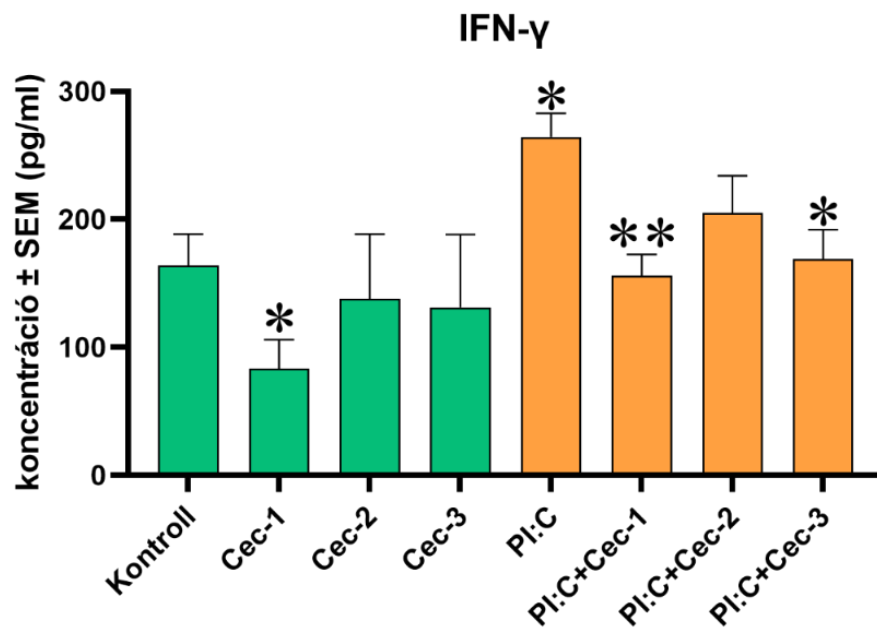
IL-10 esetén a sejtenyészetekhez önmagában adott 1 µg/ml koncentrációjú, valamint 50 µg/ml Poly I:C-vel kiváltott gyulladás esetén az 1 és a 6,25 µg/ml koncentrációjú cecropin A a citokin termelésében szignifikáns csökkenést eredményezett ($p=0,0381$, $p=0,0260$ és $p=0,0411$) (7. ábra).



7. ábra: Az IL-10 csirke eredetű májsejt-nem-parenchimális sejt ko-kultúrán, cecropin A- és Poly I:C-kezelés hatására. Cec-1: 1 µg/ml cecropin A; Cec-2: 3,125 µg/ml cecropin A; Cec-3: 6,25 µg/ml cecropin A; PI:C: 50 µg/ml Poly I:C. * $p<0,05$

IFN- γ koncentrációja

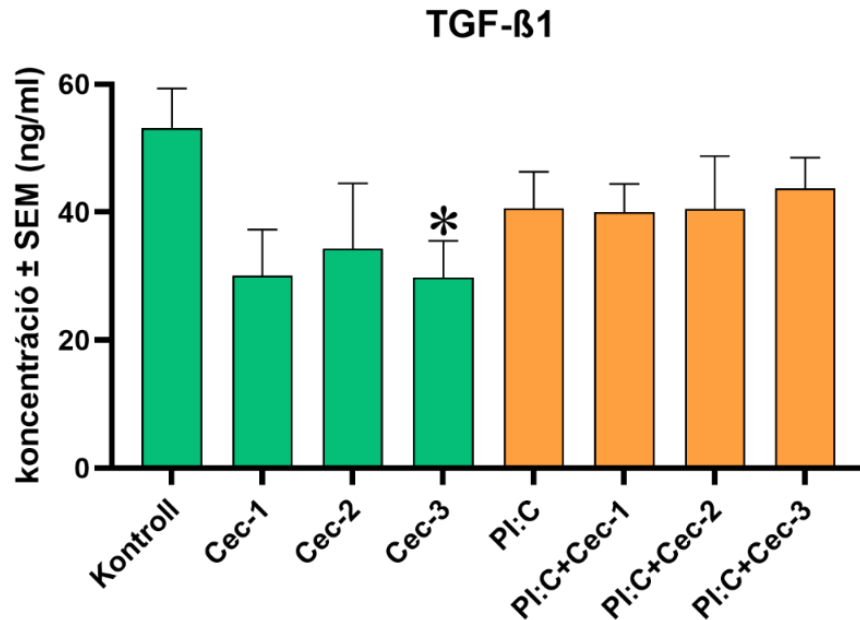
A sejttenyészeteken önmagában alkalmazott 1 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú cecropin A-oldat szignifikáns csökkenést okozott az IFN- γ koncentrációjában ($p=0,0381$). A Poly I:C által kiváltott gyulladás során az interferon szignifikánsan nagyobb mértékben termelődött a Kontroll csoporthoz képest ($p=0,0191$), melyet a cecropin A 1 és 6,25 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációinak hozzáadása szignifikánsan csökkenteni volt képes ($p=0,0022$ és $p=0,0152$) (8. ábra).



8. ábra: Az IFN- γ koncentrációja csirke eredetű májsejt-nem-parenchimális sejt ko-kultúrán, cecropin A- és Poly I:C-kezelés hatására. Cec-1: 1 $\mu\text{g/ml}$ cecropin A; Cec-2: 3,125 $\mu\text{g/ml}$ cecropin A; Cec-3: 6,25 $\mu\text{g/ml}$ cecropin A; PI:C: 50 $\mu\text{g/ml}$ Poly I:C. * $p<0,05$; ** $p<0,01$

TGF- β 1 koncentrációja

TGF- β 1 esetén csak az önmagában alkalmazott, 6,25 μ g/ml-es koncentrációjú cecropin A oldatának hozzáadása eredményezett szignifikáns csökkenést ($p=0,0416$) (9. ábra).



9. ábra: Az TGF- β 1 koncentrációja csirke eredetű májsejt-nem-parenchimális sejt ko-kultúrán, cecropin A- és Poly I:C-kezelés hatására. Cec-1: 1 μ g/ml cecropin A; Cec-2: 3,125 μ g/ml cecropin A; Cec-3: 6,25 μ g/ml cecropin A; PI:C: 50 μ g/ml Poly I:C. * $p<0,05$

Értékelés

A globális problémaként fellépő antimikrobiális rezisztencia a haszonállattartásban az egészségügyi kockázaton kívül jelentős gazdasági károkat is okoz. A baromfifajok kifejezetten érzékenyek a bél eredetű fertőzésekre, így nagyüzemi állattartásban az antimikrobiális szerek alkalmazása a rezisztencia ellenére továbbra is szükséges. Erre alternatív megoldást kínálnak az AMP-k, melyek a szervezetben a veleszületett immunitás részeként veszik fel a harcot a patogénekkal szemben. Az antibiotikumokkal összehasonlítva jelentős előnyük, hogy immunmoduláló hatásuk révén változatos közvetett antimikrobiális hatással rendelkeznek, mely így csökkentheti a hatóanyaggal szembeni rezisztencia kialakulásának mértékét, valamint részt vesznek többek között a gyulladásos folyamatok modulációjában is [25].

Kísérletünkben a cecropin A immunmodulátor hatását vizsgáltuk csirke eredetű májsejt-nem-parenchimális sejt ko-kultúrán. A gyulladás kiváltásához a szintetikus dsRNS-analóg Poly I:C-t használtuk, mely a TLR3 receptorhoz kötődik. Ez a nuclear factor- κ B (NF- κ B) aktivációját eredményezi a jelátviteli úton keresztül, így képes immunválaszt kiváltani a szervezetben [26]. E molekula korábbi kísérletek alapján megfelelő gyulladáskeltő anyagnak minősült csirke eredetű sejttenyészetek alkalmazásakor [27] [28].

Bár korábbi kutatások már bizonyították, hogy a cecropin A toxicitása az eukarióta sejtekre igen kismértékű, a vizsgálatok eddig csak az emlősök irányából közelítették meg a biztonságosság kérdését, baromfifajokra vonatkozóan még nem született kellő mennyiségű releváns információ [13]. E tulajdonság vizsgálatára az EC LDH aktivitását követtük nyomon, mely a cecropin A nagyobb dózisainak alkalmazása során szignifikánsan megnőtt. Ez a membránintegritás csökkenésére utal, ami pedig a károsodott sejtek mennyiségéről ad információt. Kísérletünkből kiderült, hogy az alacsonyabb koncentrációkban alkalmazott cecropin A vélhetően biztonságosan alkalmazható lenne baromfifajok esetén, magasabb koncentrációkban azonban már számolnunk kell a hepatikus sejtek károsodásának lehetőségével. Méréseinkkel egybevág az a 2022-es tanulmány is, melyben a cecropin A toxicitását humán szájüregi hámsejteken vizsgálták. E kísérletben szintén magasabb koncentrációk esetén ($\geq 10 \mu\text{g/ml}$) volt csak észlelhető szignifikáns eltérés a sejtek életképességét tekintve [29]. A cecropin A azonban korábbi kutatások alapján RAW 264.7 egér makrofág-, illetve IPEC-J2 sertés bélhám-sejtvonalon nem fejtett ki toxikus hatást a

sejtekre. Mindezek alapján koncentrációfüggő, és az egyes sejttípusokra vonatkozóan eltérő sejtkárosító hatásának részletesebb megismeréséhez még további kutatások szükségesek.

A sejtek életképessége mellett sejtmmodellünkön a cecropin A immunmodulátor hatását vizsgáltuk. Mivel az immunválasz magába foglalja a pro- és az anti-inflammatorikus folyamatokat is, így a gyulladásokeltő citokinek közül az IL-6 és IFN- γ , a gyulladáscsökkentők közül pedig az IL-10 és TGF- β 1 koncentrációját határoztuk meg.

Az IL-6 befolyásolja a B-sejtek differenciálódását, a T-sejtek proliferációját, elősegíti a máj akutfázis fehérjéinek termelődését, ezáltal szabályozza az immunválaszt és jelentős szerepe van az immunrendszer aktiválásában [30]. Kísérletünkben az önmagában adott 1 μ g/ml koncentrációjú, valamint a Poly I:C-vel kezelt tenyészetek esetén az 1; 3,125 és 6,25 μ g/ml koncentrációjú cecropin A szignifikáns csökkenést eredményezett az IL-6 termelődésében. Korábbi kutatások már kimutatták, hogy a cecropin A *Escherichia coli* baktériumokkal együtt tenyésztett IPEC-J2 sejtvonalon szintén képes volt csökkenteni az IL-6 szintjét [18].

Az IL-10 szintén jellemzően mikrobiális hatásokra termelődik a szerzett és a veleszületett immunitás sejteit által, anti-inflammatorikus hatása révén pedig sejtszinten gátolni képes a gyulladásos folyamatokat [31]. Kísérletünkben az önmagában alkalmazott cecropin A 1 μ g/ml koncentrációban, valamint Poly I:C-vel kiváltott gyulladás mellett 1 és 6,25 μ g/ml koncentrációban szignifikáns csökkenést eredményezett az IL-10 termelésében. A cecropin A IL-10-re mutatott hatása egybevág egy másik már vizsgált cecropin, a *Musca Domestica* cecropin (Mdc) *Salmonella typhimurium*-eredetű gyulladásra kifejtett hatásával, melyet egérmodellen vizsgáltak [32]. Ez a csökkentő hatás utalhat arra a feltételezésre, hogy a cecropin A okozta, a gyulladásokeltő citokinek termelődésére kifejtett csökkentő hatás miatt a szervezet már eleve gyengébb immunválasszal reagált, így nem volt szükség az IL-10 termelődésének serkentésére.

Az IFN- γ pro-inflammatorikus hatással rendelkezik, serkenti az antigénprezentációt és növeli a fehérvérsejtek infiltrációját [33]. Kísérletünkben az önmagában alkalmazott cecropin A 1 μ g/ml koncentrációban szignifikáns csökkenést eredményezett az IFN- γ termelésében, Poly I:C-vel kiváltott gyulladás esetén 1 és 6,25 μ g/ml koncentrációban való alkalmazásakor pedig szintén szignifikáns csökkenés volt tapasztalható az IFN- γ szintjében. Bár a cecropin A hatását erre az interferonra még nem vizsgálták, két másik cecropin esetében hasonló változásról szintén beszámol a szakirodalom [34], [35].

Az AMP-kkel kapcsolatban ritkábban vizsgált TGF- β (jelen tanulmányban a TGF- β 1 izoforma) baromfira gyakorolt gyulladáscsökkentő hatásáról már készült korábban tanulmány [36]. Ezen felül azonban a TGF- β -nak jelentős szerepe van a sejtproliferációban és -differentiálódásban, a szöveti homeosztázisban, részt vesz az extracelluláris mátrix kialakításában és fibrotikus folyamatokban is [37] [38]. Eredményeink alapján csak az önmagában alkalmazott, 6,25 μ g/ml-es koncentrációjú cecropin A alkalmazása eredményezett szignifikáns csökkenést a TGF- β 1 szintjében, de gyulladás kiváltása mellett nem volt hatással a koncentrációjára [39]. Bár a szakirodalom nem említi a cecropin A TGF- β termelődésére gyakorolt hatását, a cecropin P1 AMP esetén *in vitro* körülmények között szintén csökkentő hatás volt megfigyelhető [40]. Gyulladáscsökkentő szerepe ellenére leírták, hogy a máj sejtei kifejezetten érzékenyek lehetnek a TGF- β -ra, ami magas koncentrációban hepatikus sejthalált idézhet elő, így termelődésének gátlása a májfunkció megőrzését támogatja. Mindezek alapján a TGF- β 1 csökkentése a jelen kísérletben akár arra is engedhet következtetni, hogy a cecropin A jótékony hatást fejtett ki a hepatikus sejtekre [41], [42].

Kísérletünkéből kiderült, hogy bár a cecropin A csökkentette a pro-inflammatorikus citokinek termelődését (IL-6, IFN- γ), hasonló hatással volt az anti-inflammatorikus (IL-10, TGF- β 1) citokinek termelődésére is, ezért hatását nem tekinthetjük pusztán gyulladáscsökkentőnek. Ez további kérdéseket vet fel, mivel amennyiben a gyulladásos folyamat esetén a hatás mindkét irányban jelentős, úgy tovább mérlegelendő, pontosan milyen immunológiai következményekkel jár a cecropin A alkalmazása. Kísérletünk során azonban bizonyosságot nyert, hogy képes volt csökkenteni a Poly I:C által kiváltott emelkedést az IFN- γ koncentrációjában, ezért vélhetőleg jótékony hatású lehet a gyulladásos folyamatok mérséklésében. Hangsúlyozandó, hogy az AMP-k immunmodulátor hatása rendkívül összetett, számos biológiai tényező függvénye, így sejtszintű hatásaik feltérképezése, melyhez kutatásunkkal hozzájárulni kívántunk, rendkívül fontos. Szakirodalmi adatok és a kísérletünk alapján tehát elmondható, hogy a cecropin A komplex antimikrobiális és immunmodulátor tulajdonságai révén potenciális jelöltnek számíthat új antimikrobiális hatóanyagok fejlesztésre, azonban későbbiekben való alkalmazásához további kutatások szükségesek sejtszintű hatásainak minél részletesebb megismerése érdekében.

Összefoglalás

Az antimikrobiális rezisztencia növekedése világszerte súlyos problémát jelent, mely hatással van az állat- és a humánegészségügyre egyaránt. A probléma orvoslása érdekében megnőtt a kereslet az antibiotikumokat helyettesítő alternatív hatóanyagok alkalmazása iránt. Az antimikrobiális peptidek (AMP-k) kis méretű oligopeptidek, melyek természetes körülmények között is megtalálhatóak a szervezetben a veleszületett immunitás részeként. Az antibiotikumokkal szembeni jelentős előnyük, hogy közvetlen antimikrobiális hatásuk mellett a rezisztencia kialakítására való hajlamuk alacsonyabb, valamint immunmodulátor hatással is rendelkezhetnek. Az AMP-k alkalmazása az állatgyógyászat területén is kedvező megoldást kínál, azonban a peptidek haszonállatokban kiváltott sejtszintű hatásairól még csak csekély mennyiségű adat áll rendelkezésre.

A máj jelentős szerepet játszik a homeosztázis fenntartásában, valamint a gyulladásos folyamatokban, ezért kísérletünkben a cecropin A nevű AMP immunmodulátor hatását csirke eredetű májsejt-nem-parenchimális sejt ko-kultúrákon vizsgáltuk. A kísérlet során a cecropin A-t különböző koncentrációkban (1; 3,125; 6,25; 12,5 és 25 µg/ml) önmagában, és a virális nukleinsav-analóg poliinozin-policitidilsavval (Poly I:C, 50 µg/ml) kiváltott gyulladás mellett is alkalmaztuk. A felülúszóból történő mintavétel után a sejtek életképességét az extracelluláris laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitásának kolorimetriás mérésével vizsgáltuk. Emellett a cecropin A (1; 3,125 és 6,25 µg/ml) immunválaszra kifejtett hatását az interleukin (IL)-6, IL-10 és interferon (IFN)- γ szintjének Luminex-módszerrel, valamint a transzformáló növekedési faktor (TGF)- β 1 koncentrációjának ELISA-módszerrel történő mérésével követtük nyomon.

Eredményeink alapján a cecropin A alacsonyabb koncentrációinak (1; 3,125; 6,25 µg/ml) hatására nem változott az LDH aktivitása, azonban magasabb koncentrációi (12,5; 25 µg/ml) esetén szignifikáns csökkenés volt észlelhető a membrán integritásában. A sejtenyészetekhez önmagában adott 1 µg/ml koncentrációjú, valamint Poly I:C-vel kiváltott gyulladás esetén az 1 és 6,25 µg/ml – valamint IL-6 esetén 3,125 µg/ml – koncentrációjú cecropin A az IL-6, IL-10, és IFN- γ termelésében szignifikáns csökkenést eredményezett. TGF- β 1 esetén az önmagában alkalmazott cecropin A 6,25 µg/ml-es koncentrációjú oldatának hozzáadása szignifikáns csökkentést mutatott a citokin termelésére vonatkozóan.

Kísérletünkben az alacsony koncentrációban alkalmazott cecropin A nem befolyásolta a sejtek életképességét, így vélhetően biztonságosan alkalmazható lenne az élő szervezetben,

nagyobb dózisának használata azonban a máj szempontjából megfontolandó. Emellett eredményeink alapján immunmodulátor hatással is rendelkezik a vizsgált paraméterekre vonatkozóan, mivel képes volt befolyásolni az IL-6, IL-10, IFN- γ és TGF- β 1 termelődésének mennyiségét. Mindezek alapján a cecropin A ígéretes jelölt lehet a jövőben új antimikrobiális hatóanyagok fejlesztésére.

Irodalomjegyzék

- [1] K. Browne és mtsai., „A New Era of Antibiotics: The Clinical Potential of Antimicrobial Peptides”, doi: 10.3390/ijms21197047.
- [2] A. Adem Bahar és D. Ren, „Antimicrobial Peptides”, *Pharmaceuticals*, köt. 6, o. 1543–1575, 2013, doi: 10.3390/ph6121543.
- [3] J. Lei és mtsai., „The antimicrobial peptides and their potential clinical applications”, *Am J Transl Res*, köt. 11, sz. 7, o. 3919, 2019, Elérés: 2023. szeptember 6. [Online]. Elérhető: /pmc/articles/PMC6684887/
- [4] O. Tőke, „Antimikrobiális peptidek szerkezetének és hatásmechanizmusának vizsgálata szilárd fázisú mágneses magrezonanciával = Investigation of the Structure and Mode of Action of Antimicrobial Peptides by Solid-State Nuclear Magnetic Resonance”, 2010.
- [5] J. P. S. Powers és R. E. W. Hancock, „The relationship between peptide structure and antibacterial activity”, *Peptides (N.Y.)*, köt. 24, sz. 11, o. 1681–1691, 2003, doi: 10.1016/j.peptides.2003.08.023.
- [6] A. Shrestha, D. Duwadi, J. Jukosky, és S. N. Fieringid, „Cecropin-like antimicrobial peptide protects mice from lethal E.coli infection”, 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0220344.
- [7] É. Szentirmai, A. R. Massie, és L. Kapás, „Lipoteichoic acid, a cell wall component of Gram-positive bacteria, induces sleep and fever and suppresses feeding”, *Brain Behav Immun*, köt. 92, o. 184, febr. 2021, doi: 10.1016/J.BBI.2020.12.008.
- [8] J. Li, J. J. Koh, S. Liu, R. Lakshminarayanan, C. S. Verma, és R. W. Beuerman, „Membrane active antimicrobial peptides: Translating mechanistic insights to design”, *Front Neurosci*, köt. 11, sz. FEB, o. 244777, febr. 2017, doi: 10.3389/FNINS.2017.00073/BIBTEX.
- [9] N. Papo, Z. Oren, U. Pag, H. G. Sahl, és Y. Shai, „The consequence of sequence alteration of an amphipathic α -helical antimicrobial peptide and its diastereomers”, *Journal of Biological Chemistry*, köt. 277, sz. 37, o. 33913–33921, szept. 2002, doi: 10.1074/jbc.M204928200.
- [10] K. A. Brogden, „Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?”, *Nature Reviews Microbiology* 2005 3:3, köt. 3, sz. 3, o. 238–250, márc. 2005, doi: 10.1038/nrmicro1098.
- [11] S. Wang, X. Zeng, Q. Yang, és S. Qiao, „Antimicrobial peptides as potential alternatives to antibiotics in food animal industry”, *International Journal of Molecular Sciences*, köt. 17, sz. 5. MDPI AG, 2016. május 3. doi: 10.3390/ijms17050603.
- [12] C. Auvynet és Y. Rosenstein, „Multifunctional host defense peptides: Antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity”, *FEBS J*, köt. 276, sz. 22, o. 6497–6508, nov. 2009, doi: 10.1111/J.1742-4658.2009.07360.X.
- [13] D. Brady, A. Grapputo, O. Romoli, és F. Sandrelli, „Insect Cecropins, Antimicrobial Peptides with Potential Therapeutic Applications”, *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol. 20, Page 5862, köt. 20, sz. 23, o. 5862, nov. 2019, doi: 10.3390/IJMS20235862.
- [14] E. Lee, A. Shin, és Y. Kim, „ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF CECROPIN A AND ITS MECHANISM OF ACTION”, *Arch Insect Biochem Physiol*, köt. 88, sz. 1, o. 31–44, jan. 2015, doi: 10.1002/ARCH.21193.

- [15] F. Ke és mtsai., „Effects of Nisin, Cecropin, and *Penthorum chinense* Pursh on the Intestinal Microbiome of Common Carp (*Cyprinus carpio*)”, *Front Nutr*, köt. 8, o. 729437, okt. 2021, doi: 10.3389/FNUT.2021.729437/BIBTEX.
- [16] Z. Zhai és mtsai., „Cecropin A alleviates inflammation through modulating the gut microbiota of C57BL/6 mice with DSS-induced IBD”, *Front Microbiol*, köt. 10, sz. JULY, o. 470962, júl. 2019, doi: 10.3389/FMICB.2019.01595/BIBTEX.
- [17] L. Jie, L. YunNan, és D. JiaXi, „Application of cecropin in chicken feeding.”, *Modern Food Science and Technology*, köt. 25, sz. 4, o. 416–434, 2009.
- [18] Z. Zhai és mtsai., „Cecropin a modulates tight junction-related protein expression and enhances the barrier function of porcine intestinal epithelial cells by suppressing the MEK/ERK pathway”, *Int J Mol Sci*, köt. 19, sz. 7, júl. 2018, doi: 10.3390/ijms19071941.
- [19] A. Giacometti és mtsai., „Effect of mono-dose intraperitoneal cecropins in experimental septic shock”, 2001.
- [20] Z. Zhai és mtsai., „Cecropin A alleviates inflammation through modulating the gut microbiota of C57BL/6 mice with DSS-induced IBD”, *Front Microbiol*, köt. 10, sz. JULY, o. 470962, júl. 2019, doi: 10.3389/FMICB.2019.01595/BIBTEX.
- [21] P. C. Konturek és mtsai., „Gut–Liver Axis: How Do Gut Bacteria Influence the Liver?”, *Medical Sciences 2018, Vol. 6, Page 79*, köt. 6, sz. 3, o. 79, szept. 2018, doi: 10.3390/MEDSCI6030079.
- [22] M. W. Robinson, C. Harmon, és C. O’Farrelly, „Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis”, *Cellular & Molecular Immunology 2016 13:3*, köt. 13, sz. 3, o. 267–276, ápr. 2016, doi: 10.1038/cmi.2016.3.
- [23] M. Mackei és mtsai., „Cellular effects of T-2 toxin on primary hepatic cell culture models of chickens”, *Toxins (Basel)*, köt. 12, sz. 1, 2020, doi: 10.3390/toxins12010046.
- [24] C. Sebök és mtsai., „Immunomodulatory effects of chicken cathelicidin-2 on a primary hepatic cell co-culture model”, *PLoS One*, köt. 17, sz. 10 October, okt. 2022, doi: 10.1371/journal.pone.0275847.
- [25] S. Wang, X. Zeng, Q. Yang, és S. Qiao, „Antimicrobial peptides as potential alternatives to antibiotics in food animal industry”, *International Journal of Molecular Sciences*, köt. 17, sz. 5. MDPI AG, 2016. május 3. doi: 10.3390/ijms17050603.
- [26] R. Miyata és mtsai., „Poly(I:C) induced microRNA-146a regulates epithelial barrier and secretion of proinflammatory cytokines in human nasal epithelial cells”, *Eur J Pharmacol*, köt. 761, o. 375–382, aug. 2015, doi: 10.1016/J.EJPHAR.2015.04.031.
- [27] M. Matsumoto és T. Seya, „TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C)”, *Adv Drug Deliv Rev*, köt. 60, sz. 7, o. 805–812, ápr. 2008, doi: 10.1016/J.ADDR.2007.11.005.
- [28] N. Barjesteh, S. Behboudi, J. T. Brisbin, A. I. Villanueva, és E. ‘ Nagy, „TLR Ligands Induce Antiviral Responses in Chicken Macrophages”, *PLoS One*, köt. 9, sz. 8, o. 105713, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0105713.
- [29] H. A. ; Alhadrami, A. M. ; Sayed, H. M. ; Hassan, és M. E. ; Rateb, „Citation”, 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics.

- [30] M. Mihara, M. Hashizume, H. Yoshida, M. Suzuki, és M. Shiina, „IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions”, *Clin Sci*, köt. 122, sz. 4, o. 143–159, febr. 2012, doi: 10.1042/CS20110340.
- [31] A. Howes, P. Stimpson, P. Redford, L. Gabrysova, és A. O’Garra, „Interleukin-10: Cytokines in anti- inflammation and tolerance”, *Cytokine Frontiers: Regulation of Immune Responses in Health and Disease*, o. 327–352, jan. 2014, doi: 10.1007/978-4-431-54442-5_13/COVER.
- [32] G. Grant és mtsai., „Musca domestica Cecropin (Mdc) Alleviates Salmonella typhimurium-Induced Colonic Mucosal Barrier Impairment: Associating With Inflammatory and Oxidative Stress Response, Tight Junction as Well as Intestinal Flora”, *Front. Microbiol*, köt. 10, o. 522, 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.00522.
- [33] G. Kak, M. Raza, és B. K. Tiwari, „Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases”, *Biomol Concepts*, köt. 9, sz. 1, o. 64–79, 2018, doi: 10.1515/BMC-2018-0007.
- [34] J. Dai és mtsai., „The Antimicrobial Peptide Cecropin AD Supplement Alleviated Soybean Meal-Induced Intestinal Inflammation, Barrier Damage, and Microbial Dysbiosis in Juvenile Turbot, *Scophthalmus maximus*”, *Front Mar Sci*, köt. 7, o. 584482, nov. 2020, doi: 10.3389/FMARS.2020.584482/BIBTEX.
- [35] L. Zhang és mtsai., „Musca domesticaCecropin (Mdc) alleviates salmonella typhimurium-induced colonic mucosal barrier impairment: Associating with inflammatory and oxidative stress response, tight junction as well as intestinal flora”, *Front Microbiol*, köt. 10, sz. MAR, o. 443452, márc. 2019, doi: 10.3389/FMICB.2019.00522/BIBTEX.
- [36] T. V. Leshchinsky és K. C. Klasing, „Divergence of the inflammatory response in two types of chickens”, *Dev Comp Immunol*, köt. 25, sz. 7, o. 629–638, szept. 2001, doi: 10.1016/S0145-305X(01)00023-4.
- [37] L. M. A. Zimmermann, A. Correns, A. G. Furlan, C. E. S. Spanou, és G. Sengle, „Controlling BMP growth factor bioavailability: The extracellular matrix as multi skilled platform”, *Cell Signal*, köt. 85, o. 110071, szept. 2021, doi: 10.1016/J.CELLSIG.2021.110071.
- [38] I. Gans és mtsai., „Administration of TGF- β Inhibitor Mitigates Radiation-induced Fibrosis in a Mouse Model”, *Clin Orthop Relat Res*, köt. 479, o. 468–474, 2021, doi: 10.1097/CORR.0000000000001286.
- [39] H. A. Ogaly, S. A. A. Abdulmani, F. A. M. Al-Zahrani, és R. M. Abd-Elsalam, „D-Carvone Attenuates CCl4-Induced Liver Fibrosis in Rats by Inhibiting Oxidative Stress and TGF- β 1/SMAD3 Signaling Pathway”, *Biology (Basel)*, köt. 11, sz. 5, máj. 2022, doi: 10.3390/biology11050739.
- [40] Y. C. Han és B. S. Shepherd, „Cecropin P1 antimicrobial peptide modulates differential expression of immune relevant genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill cell line, RTgill-W1”, *Fish Shellfish Immunol*, köt. 137, o. 108756, jún. 2023, doi: 10.1016/J.FSI.2023.108756.
- [41] T. Nakamura, R. Sakata, T. Ueno, M. Sata, és H. Ueno, „Inhibition of transforming growth factor β prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats”, *Hepatology*, köt. 32, sz. 2, o. 247–255, aug. 2000, doi: 10.1053/JHEP.2000.9109.
- [42] D. M. Bissell, D. Roulot, és J. George, „Transforming growth factor β and the liver”, *Hepatology*, köt. 34, sz. 5, o. 859–867, nov. 2001, doi: 10.1053/JHEP.2001.28457

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Márton Rege Anna témavezetőmnek, aki nélkül e dolgozat nem születhetett volna meg, és aki rengeteg türelmével és szakértelmével az utolsó pillanatig segítette munkámat.

Köszönöm Dr. Mátis Gábornak a lehetőséget a TDK megírására.

Hálával tartozom anyukámnak és barátaimnak odaadó támogatásukért és türelmükért.