Mukolitikumok hatásának vizsgálata *Chlamydia* fertőzésben és az indukált immunválasz

Ph.D. tézis

Dr. Kókai Dávid

Témavezető: Prof. Dr. Burián Katalin

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Orvosi Mikrobiológiai Intézet

Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar

Szeged

2022

1) Bevezetés

- **A Chlamydiae törzs jellemzői**

A Chlamydiák obligát Gram-negatív intracelluláris kórokozók, bifázisos fejlődési ciklussal. Ezen kórokozók képesek az amőbáktól az emberekig élőlényeket megfertőzni. A *Chlamydiaceae* család a Chlamydiae törzs legjobban tanulmányozott csoportja, 11 fajból áll, amelyek patogének az állatokra, köztük emberre is. A *Chlamydiaceae* családban három emberi kórokozó található: *Chlamydia trachomatis, Chlamydia psittaci* és *Chlamydia pneumoniae*.

- **A *Chlamydia pneumoniae* fertőzés**

A *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) az akut légúti fertőzések gyakori kórokozója, beleértve a közösségben szerzett tüdőgyulladás (CAP), arcüreggyulladás, torokgyulladást és a hörghurutot. A *C. pneumoniae* a tüdőgyulladásos esetek 10%-áért felelős. A populáció szeropozitivitása azt mutatja, hogy a közösség körülbelül 50-70%-a fertőződött *C. pneumoniae*-val az életében legalább egyszer. Ezenfelül a *C. pneumoniae* fertőzést atherosclerosissal is összefüggésbe hozták. A felső és alsó légutak inváziója során váladék képződik. A váladék eltávolításának megkönnyítése érdekében az orvosok gyakran írnak fel mukolitikumokat.

- **Chlamydia szaporodási ciklusa és a vele szemben kialakult immunválasz**

A *Chlamydiaceae* családba tartozó kórokozók fejlődési ciklusában két forma található meg: az elemi test (EB), illetve a retikuláris test (RB). Ezek a formák morfológiailag és funkcionálisan is különböznek egymástól. Az EB spóraszerű képződmény, és a sejtek megfertőzéséért felelős. Miután az EB-k bejutnak a gazdasejtbe, RB-kké differenciálódnak. Ez a forma a baktérium metabolikusan aktív formája. 8-10 osztódási ciklus után az RB-k EB-kké redifferenciálódnak, és az EB-k extrúzió vagy bimbózás útján távoznak a sejtből, hogy új fertőzési ciklust kezdjenek.

A chlamydia fertőzés elleni védekezés egyszerre három platformon zajlik. Az egyik elem az úgynevezett sejt-autonóm immunitás, a második az apoptózis, az utolsó pedig az immunrendszer aktiválódása. A sejt-autonóm immunitás egyik kulcseleme az indolamin 2,3-dioxigenáz (IDO) egy IFN-γ indukálható enzim, amelynek két izoformája van, az IDO-1 és az IDO-2. Ez az enzim felelős a triptofán lebontásáért a sejtben. Ez az aminosav létfontosságú a szaporodó baktériumok számára. Egy másik kulcsfontosságú elem a programozott sejthalál. Az apoptózis egyik fő eseménye a kaszpáz 3,6,7 aktiválódása, amely a sejt apoptózisához vezet. Ismert, hogy a *Chlamydiaceae* tagjai a Raf/MEK/ERK útvonalak stimulálásával próbálják kikerülni a gazdasejt apoptózisát, ezáltal indukálva a Bag1-et. A Bag1 kötődik a Bcl-2-höz, így fenntartva annak anti-apoptotikus funkcióját. Az immunrendszer aktiválásában számos citokin is szerepet játszik a *C. pneumoniae* elleni védekezésben. Az IL-12 egy heterodimer citokin, amelyet dendritikus sejtek (DC), aktivált makrofágok és neutrofil granulociták termelnek. Az IL-12 szerepet játszik a természetes ölősejtek (NK) aktiválásában, valamint a naiv T-sejtek $CD4^+$ sejtekké történő differenciálódásában. Ezen túlmenően serkenti az IFN-γ termelődését, és az IFN-γ-val együtt elősegítik a DC-k érését. Az IL-17 egy proinflammatorikus citokin család, amely 6 tagból áll IL-17(A-F). Leírták, hogy az IL-17A a kemokinek expressziójának elősegítésével neutrofil infiltrációt közvetíti a *C. pneumoniae* tüdőfertőzés során. Az IFN-γ döntő szerepet játszik mind a veleszületett, mind az adaptív immunitásban (pl. serkenti a makrofágok TNF termelését, fokozza az MHC-expressziót, ezáltal segíti az antigénprezentációt, elősegíti a fagoszóma-lizoszóma fúziót, és számos IFN-indukálható GTPázt indukál). A szurfaktán fehérjék (SP) négy fehérjéből állnak (SP A-D), amelyek közül az SP-A és SP-D a tüdő védelmében játszik szerepet. Az SP-A és az SP-D opszoninként működik, megkönnyíti a baktériumok felvételét az alveoláris makrofágok számára, illetve képesek aggregálni a baktériumokat.

- **Mukolitikumok általános leírása**

Az acetilcisztein (NAC) egy tiolcsoportot tartalmazó, a gyógyászatban gyakran használt gyógyszer Számos terápiás felhasználása van a pszichiátriában, beleértve a bipoláris zavart, a major depressziót, illetve a skizofréniát, ezenfelül antidótum az acetaminofen túladagolásában. Leggyakrabban azonban a NAC-ot nyákoldóként használják. A szervezetben háromféle hatásmechanizmussal működik: a

tiolcsoportja képes redukálni diszulfid kötéseket, a NAC a glutation szintézis szubsztrátjaként szolgálhat, illetve közvetlenül semlegesítheti az szabad gyököket. Németországban a NAC volt a második legnépszerűbb nyákoldó szer, 23,5%-os piaci részesedéssel a köptetők piacán. Az Országos Egészségbiztosítási Pénztár által rendelkezésünkre bocsátott adatai alapján 2016-ban kicsivel több mint 1 millió kiszerelt adag NAC-ot értékesítettek Magyarországon, ezzel a NAC lett leggyakrabban használt mukolitukum hazánkban. A NAC közvetlen antimikrobiális szerepe még nem tisztázott, de vannak adatok a biofilm képződést gátló hatásáról. A NAC közvetlen antimikrobiális hatást mutatott az extracelluláris kórokozókkal szemben. A tuberkulózis esetében a NAC-ról kiderült, hogy bakteriosztatikus hatása van *Mycobacterium tuberculosis* ellen.

Az ambroxolt (Ax) széles körben alkalmazzák légúti fertőzések és krónikus hörghurut kezelésére, ráadásul biztonságos gyógyszernek minősül. Továbbá az Ax jótékony hatást fejt ki a Parkinson-kór lefolyására azáltal, hogy módosítja a glükocerebrozidáz chaperon aktivitását. Az Ax immunrendszer támogató tulajdonságokat mutat az IL-10, IL-12 és IFN-γ expressziójának növelésével, az aromás csoportjának köszönhetően az Ax antioxidáns tulajdonsággal is rendelkezik. Ezenkívül arról számoltak be, hogy az Ax növeli az SP termelést, és csökkenti ERK 1/2 útvonal LPS-stimulált aktivációját. Németországban az Ax volt a legnépszerűbb nyákoldó szer, 24%-os piaci részesedéssel. Az Országos Egészségbiztosítási Pénztár által rendelkezésünkre bocsátott adatok alapján 2016-ban kicsivel több mint 605 000 kiszerelt adag Ax-ot értékesítettek Magyarországon, ezzel az Ax a második leggyakrabban használt nyákoldó szer Magyarországon. Ezenkívül az Ax-ot vírusos fertőzések során fellépő torokfájás tüneti kezelésére is használják, mivel helyi érzéstelenítő hatást fejt ki.

2) Célkitűzések

A NAC hatásának vizsgálata a *C. pneumoniae* szaporodására *in vitro*;

A NAC rövid és hosszú távú kezelésének hatásának vizsgálata a *C. pneumoniae* replikációjára *in vivo* egér modellben;

A NAC hatásmechanizmusának meghatározása *C. pneumoniae* szaporodására;

NAC-ot helyettesíthető alternatív mukolitikum vizsgálata;

A magasabb koncentrációjú Ax hatásának tanulmányozása a *C. pneumoniae* szaporodására *in vivo* egerekben;

Az Ax génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata ismert anti-chlamydiális géneken *in vivo* egerekben;

Az Ax hatásának vizsgálata az IFN-γ és IL-6 termelésre fehérje szinten *in vivo* egerekben;

SP-A és SP-D fehérje hatásának vizsgálata a *C. pneumoniae* kötődésére és replikációjára egér sejtvonalon;

Az Ax kezelés hatásának tanulmányozása az ERK útvonal aktivitására

3) Anyagok és módszerek

- ***C. pneumoniae* szaporítása**

Kísérleteinkben az *C. pneumoniae* CWL029 törzsét használtuk. A *C. pneumoniae*-t HEp-2 sejtekben szaporítottuk, majd a fertőző EB-k titerét indirekt immunfluoreszcens vizsgálattal határoztuk meg. Az EB készítmény sorozathígításaival McCoy sejteket fertőztünk, majd 48 órás inkubálás után a sejteket acetonnal fixáltuk, és monoklonális anti-Chlamydia lipopoliszacharid antitesttel és FITC-jelölt egér-IgG-vel festettük. A *C. pneumoniae* zárványok számát UV-mikroszkóp alatt megszámoltuk, és a titert zárványképző egység/ml-ben (IFU/ml) fejeztük ki.

- **A NAC és az Ax hatása a *C. pneumoniae* szaporodására *in vitro***

A McCoy sejteket 13 mm-es átmérőjű fedőlemezt tartalmazó 24 lyukú szövettenyésztő lemezekben növesztettük Eagle MEM médiumban A tápfolyadék kiegészítettük 10 térfogatszázalék borjúsavóval 0,5 térfogatszázalék glükózzal, 0,3 mg/ml l-glutaminnal, 4 mM HEPES-sel és 25 µg/ml gentamicinnel. Kísérletenként öt párhuzamos sejttenyészettel dolgoztunk, amelyeket lyukanként 2×10^3 IFU *C. pneumoniae*-val fertőztünk és fertőzés időpontjában egyidejűleg NAC-cal (0,01-10 mg/ml) vagy Ax-szel (0,002-0,05 mg/ml) kezeltünk, vagy kezeletlenül hagytuk. Egy másik kísérletben a sejteket *C. pneumoniae*-val, fertőztük, amelyeket különböző NAC vagy Ax koncentrációkkal előkezeltünk 1 órán keresztül, majd fertőztük a sejteket. Harmadik kísérletben a *C. pneumoniae* EB-ket NAC-cal (0,1 mg/ml) vagy Ax-szel (0,05 mg/ml) előkezeltük folyamatos rázással szobahőmérsékleten, majd 1 óra elteltével ezeket a hatóanyagokat 13 800 *g*-n 15 percig tartó centrifugálással kimostuk, vagy mosatlanul hagytuk. Ezután NAC-cal vagy Ax-szel kezelt *C. pneumoniae*-t, vagy a nem kezelt *C. pneumoniae*-t 24 lyukú lemezekben fedőlemezeken növesztett sejtekre mértük, majd 1 órán át 800 *g*-n centrifugáltuk. 48 órás inkubációt követően a fedőlemezeken lévő sejteket acetonnal fixáltuk, és a *C. pneumoniae* zárványainak láthatóvá tételéhez a "*C. pneumoniae* szaporítása" című fejezetben leírtak szerint festettük. Ahhoz, hogy kimutathassuk a NAC vagy az Ax hatását a chlamydia EB-k gazdasejtekhez való kötődésére, McCoy vagy relevánsabb humán légúti eredetű epithél A549 sejteket NAC- vagy Ax-kezelt *C. pneumoniae* EB-kkel fertőztünk, majd 1 órás inkubációs idő és centrifugálás után a sejteket mostuk és fixáltuk, és a megkötött EB-ket indirekt immunfluoreszcenciával festettük a fent leírtak szerint.

A fluoreszcenciajeleket Olympus UV-mikroszkópiával elemeztük. A nem fertőzött vagy *C. pneumoniae*-fertőzött sejtek, illetve a hatóanyaggal kezelt *C. pneumoniae*-val fertőzött sejtek immunfluoreszcenciáját az ImageQuantTL 8.1 szoftverrel kvantitatívan elemeztük az alábbiak szerint: minden képen véletlenszerűen 6-6, a sejteket lefedő, egyenlő méretű, kör alakú területet választottunk ki, majd a kiválasztott területek háttérjeleit küszöbértékkel kiszűrtük, és a véletlenszerűen kiválasztott sejtek fluoreszcencia-intenzitás/pixel értékét számszerűsítettük.

- **Az egerek fertőzése**

A 6 hetes nőstény BALB/c egereket a Charles River Laboratories-tól szereztük be. Az egereket a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai intézet állattartó telephelyén tartottuk, *ad libitum* táplálékot és vizet biztosítva. A fertőzés előtt az egereket enyhén elaltattuk 200 µl nátrium-pentobarbitál (7,5 mg/ml) intraperitoneális injekcióval. Ezután intranazálisan megfertőztük őket 2×10^5 IFU. *C. pneumoniae-val* 20 µl SPG-ben szuszpendálva. Négy *in vivo* kísérletet végeztünk: **I.** A fertőzést követő második naptól 10 mg/ttkg NAC-cal kezeltük az egereket napi 50 µl ivóvízben feloldva *per os*. Az egereket fertőzést követő 7. napon elaltattuk és feláldoztuk. **II.** A fent leírt kísérletet megismételtük, de az egereket 19. napig kezeltük, majd a 20. napon feláldoztuk őket. **III.** Egy másik kísérletben a *C. pneumoniae*-val fertőzött egereket a fentiektől eltérően 1,25 mg/kg Ax-szel kezeltük naponta, majd a fertőzés követő 7. napon áldoztuk fel őket. **IV**. Az első fertőzést követő napon, az egereket naponta 5 mg/kg Ax-szel kezeltük, majd az egereket a 7. napon elaltattuk és feláldoztuk.

A kísérletek során az egerek viselkedését és testsúlyát naponta ellenőriztük; a kontroll egerek ugyanakkor térfogatú vizet kaptak, hogy utánozzuk a gyógyszerek beadása alatt létrejövő stresszt. Az elaltatását követően az állatok szérumát szívpunkcióval gyűjtöttük, majd a tüdőt eltávolítottuk, és homogenizáltuk. A homogenizált szövetminta felét RNS extrakcióhoz és kvantitatív polimeráz láncreakcióhoz dolgoztuk fel, míg a másik felét 1 ml SPG-ben szuszpendáltuk, hogy a visszatenyészthető *C. pneumoniae* inklúziók számát megmérjük, illetve a cytokinek szintjét megállapíthassuk.

A kísérletünket az Országos Állatkísérleti Tudományos Etikai Bizottság (2016. augusztus 10., III./3072/2016) és a Szegedi Tudományegyetem Állatjóléti Bizottsága hagyta jóvá. A kísérlet megfelel az Európai Parlament 2010/63/EU irányelvének.

- ***C. pneumoniae* visszatenyésztése az egerek tüdejéből**

Két fagyasztási-olvasztási ciklus után az egyes egerek homogenizált tüdejét lecentrifugáltuk (10 perc, 400 *g*), és a felülúszók sorozathígításaval McCoy sejteket fertőztünk. Ezután a mintákat centrifugáltuk (1 óra, 800 *g*), majd 48 órás tenyésztés után a sejteket acetonnal fixáltuk, és a fent említett „*C. pneumoniae* szaporítása" részben leírtak szerint megfestettük, hogy láthatóvá tegyük a *C. pneumoniae* zárványait.

- **RNS kivonás az *in vitro* sejtkultúrákból**

Hatlyukú lemezekben McCoy sejteket fertőztünk *C. pneumoniae*-val 4-es fertőzési multiplicitással (MOI), majd a sejteket kezeletlenül hagytuk, vagy 0,1 mg/ml NAC-ot vagy 0,05 mg/ml Ax-ot adtunk a tápfolyadékhoz. A teljes RNS-t 1 nap elteltével Tri Reagenssel extraháltuk a gyártó protokollja szerint. Az RNS-koncentrációt 260 nm-en mértük NanoDrop spektrofotométerrel.

- **RNS kivonás az egerek tüdejéből**

Az egerek homogenizált tüdejének felét, amelyet az "Egerek fertőzése" című fejezetben nyertünk ki, Tri Reagenssel dolgoztuk fel, és az extrakciót az "RNS kivonás az *in vitro* sejtkultúrákból" fejezetben leírtak szerint végeztük el.

- **cDNS szintézis**

Az RNS extrakciós protokollt követően bármely minta esetén 1 µg teljes RNS-t reverz transzkripció alá vetettünk Maxima Reverse Transcriptase segítségével a gyártó protokolljának megfelelően random hexamer primert használva.

- **Az *Ido1, Ido2, Ifng Il12, Il23, Il17a, Il17f, Ifng, Sftpa, Sftpb, Sftpc, Sftpd* és az *Actb* gének quantitatív PCR (qPCR) vizsgálata**

A qPCR mérést Bio-Rad CFX96 készülékkel végeztük, SsoFast EvaGreen qPCR Supermix keverékkel, illetve egér-specifikus primer párok felhasználásával. Az primereket a PrimerQuest Tool szoftverrel terveztük, és az Integrated DNA Technologies, Inc. szintetizálta. Az amplifikációs specifitás ellenőrzésére olvadási görbe elemzést végeztünk. Az *Ido1, Ido2, Il12, Il23, Il17a, Il17f, Ifng, Sftpa, Sftpb, Sftpc, Sftpd* és *Actb* küszöbciklusait (Ct) meghatároztuk, a relatív génexpressziókat pedig a ΔΔCt módszerrel számítottuk ki. Student-féle t-teszttel hasonlítottuk össze a ΔCt értékek statisztikai különbségeit a fertőzött és a kontroll minták között, vagy ANOVA RM és tervezett összehasonlításokat használtunk a ΔCt értékek statisztikai különbségeinek összehasonlítására a fertőzött és a kontroll mintákban, a korábban leírtak szerint, $p < 0{,}05$ szignifikanciaszintet határoztunk meg.

- **ELISA vizsgálatok**

A citokinek meghatározására a tüdő felülúszókból szendvics, egér IL-6 és egér IFN-γ ELISA kiteket használtunk. Használat előtt a tárolt tüdőmintákat felolvasztottuk, és a vizsgálatot a gyártó utasításai szerint végeztük a következő hígításokban: 10-szeres hígításban az IL-6 és 50-szeres hígításban az IFN-γ esetén. A kitek dinamikus tartománya 10 és 1000 pg/ml között volt. A lemezeket Biochrom Anthos 2010 mikrolemez-leolvasóval elemeztük. A mintákat két párhuzamosban vizsgáltuk.

- **ERK útvonal vizsgálata Western-blottal**

Annak érdekében, hogy kiderítsük a foszforiláltság mértékét a RAF proto-onkogén szerin/treonin-protein kinázban (c-Raf), valamint a kettős specificitású mitogén aktivált protein kinázban (MEK)1/2, ERK1/2, P90RSK1/2 és mitogén -és a stressz által aktivált protein kináz 1 (MSK-1)-ben, McCoy sejteket 6 lyukú lemezeken növesztettünk, és Ax-szel (0,05 mg/ml) kezeltük és/vagy 0,01 MOI *C. pneumoniae*-val fertőztük, vagy kezeletlenül hagytuk a sejteket. 12 órás inkubáció után a sejteket kétszer mostuk jéghideg PBS-sel, lekapartuk, és homogenizáló pufferben gyűjtöttük. A sejteket ultrahang homogenizátorral (10 s, 4 °C) kezeltük, majd a homogenizátumot lecentrifugáltuk (14000 × *g*, 10 perc, 4 °C). A homogenizátum fehérjekoncentrációjának meghatározására a bicinkoninsavval vizsgálatot végeztük. A 20 µg fehérjét tartalmazó mintákat 5 percig forraltuk, majd az előkészítés után a mintákat

SDS-PAGE-en választottuk el. Az elválasztás után a fehérjéket 0,45 µm-es pórusméretű nitrocellulóz membránra vittük át. A nem-specifikus kötődés megakadályozására a membránt BSA-t és Tween-20-attartalmazó oldattal inkubáltuk. Minden kísérletben a membránokat vízszintesen elvágtuk a vizsgált fehérjék molekulatömegének megfelelően. A membránokat specifikus elsődleges antitestekkel inkubáltuk a Raf-1, MEK, p90, ERK és MSK foszforilált formái ellen, valamint egy háztartási fehérje, a GAPDH ellen egy éjszakán keresztül, 4 °C-on. Az inkubálást követően a membránt mostuk, majd torma-peroxidázzal konjugált kecske anti-nyúl másodlagos antitesttel inkubáltuk 45 percig szobahőmérsékleten. A kemilumineszcencia analízist LumiGLO 20× reagenssel végeztük, majd a membránokat röntgenfilmekkel exponáltuk. Minden filmet beszkenneltünk, és a fehérjesávok sűrűségét a Quantity One szoftver 98 segítségével számszerűsítettük.

- **Apoptózis vizsgálat áramlási citométerrel**

A kaszpáz 3/7 aktivitási vizsgálatokat a FAM FLICA™ Caspase-3/7 Kit-tel és propidium-jodid festéssel végeztük. A kísérletet 4 kísérleti csoportra osztottuk. A McCoy sejtek felét 0,01 MOI *C. pneumoniae*-val fertőztük, míg a másik fele fertőzetlenül maradt. A fertőzött, illetve a nem fertőzött csoportokat 0,05 mg/ml Ax-szel kezelt vagy kezeletlen csoportokra osztottuk. 12 órás inkubáció után az apoptózis vizsgálatot a gyártó utasításai szerint végeztük, és a sejteket áramlási citométerrel elemeztük. A módszer képes különbséget tenni az életképes (kaszpáz 3/7-/PI-), a korai apoptotikus (kaszpáz 3/7+/PI-) és a késői apoptotikus (kaszpáz 3/7+/PI-) sejtek között. A sejtpopulációk fluoreszcenciáját a festés után azonnal elemeztük Aria Fusion áramlási citométerrel.

- ***Az SP-A és SP-D in vitro hatása* a *C. pneumoniae* proliferációjára és kötődésére**

A McCoy sejteket ($2{,}5 \times 10^5$ sejtet) tenyésztettünk 24 lyukú lemezekbe, és egy éjszakán át inkubáltuk. A *C. pneumoniae*-t (0,01 MOI) 1 ml médiumban szuszpendáltunk, SP-A (1 µg/ml) vagy SP-D (1 µg/ml) jelenlétében, vagy kezeletlenül hagytuk. A szuszpenziókat 37 °C-on, 1 órán át ráztuk, majd 1 órán keresztül 800× *g*-n centrifugáltuk a sejtek megfertőzése érdekében. 48 óra múlva a sejteket acetonnal fixáltuk és festettük a „*C. pneumoniae* szaporítása”pontban leírtak szerint. Az SP-A és SP-D fehérjéknek a *C. pneumoniae* J-774 sejtekhez való kötődésére gyakorolt hatásának kimutatására a fent leírt kísérletet a következő módosítással megismételtük. Az 1 órás centrifugálás után a sejteket azonnal megfestettük, a korábban leírtak szerint. A fluoreszcencia jeleket az Olympus IX83 Live Cell Imaging rendszer és a scanR High-Content Screening Station mikroszkópia segítségével elemeztük. A fluoreszcenciát pedig az ImageQuantTL 8.1 segítségével kvantitatívan elemeztük „A NAC és az Ax hatása a *C. pneumoniae* szaporodására *in vitro”* pontban leírtak szerint.

- **Statisztikai analízis**

A Welch-féle t-próbát vagy egyirányú ANOVA RM tervezett összehasonlításokkal a GraphPad Prism 8.0.1 szoftver segítségével végeztük el. Az adatokat átlag ± standard eltérésként fejeztük ki. A $p < 0{,}05$ értéket szignifikánsnak tekintettük.

4) Eredmények

- **NAC növeli a *C. pneumoniae in vitro* replikációját**

Elsődlegesen *in vitro* körülmények között akartuk ellenőrizni a NAC potenciális chlamydia ellenes hatását. Kísérleteink során a NAC különböző koncentrációit kétféle megközelítéssel alkalmaztuk. Először a NAC csökkenő koncentrációját közvetlenül a *C. pneumoniae*-val kevertük, és a gazdasejteket azonnal megfertőztük. Az alkalmazott koncentrációk közül a 10 mg/ml és a 2 mg/ml NAC dózisok toxikusak voltak a sejtekre. Meglepő módon a 0,1 mg/ml NAC a McCoy sejtekben a *C. pneumoniae* zárványok számának közel hatszoros növekedését eredményezte a kezeletlen *C. pneumoniae* fertőzés után megfigyelt számhoz képest. Ennek megfelelően ezt a koncentrációt választottuk a későbbi vizsgálatokban.

A második megközelítésben a *C. pneumoniae*-t előinkubáltuk NAC-cal az előbb említett három koncentrációban úgy, hogy a *C. pneumoniae* és a NAC keverékét a sejtek megfertőzése előtt 1 órán keresztül folyamatosan rázogattuk. Nem volt szignifikáns különbség az 1 órán át NAC-cal előkezelt *C. pneumoniae* és az azonnal a sejtekre mért NAC-kezelt *C. pneumoniae* szaporodása között (p>0,05).

- **NAC növeli a *C. pneumoniae* kötődését a gazdasejthez**

Annak vizsgálatára, hogy a NAC képes-e befolyásolni a *C. pneumoniae* kötődését, a McCoy, illetve relevánsabb, humán légúti eredetű A549 epithélsejteket NAC-előkezelt *C. pneumoniae*-val vagy kezeletlen *C. pneumoniae*-val fertőztük meg. Azt kaptuk eredményül, hogy a NAC-kezelt *C. pneumoniae* szignifikánsan nagyobb fluoreszcencia-intenzitást eredményezett a McCoy sejtekben, mint a kezeletlen *C. pneumoniae*. Hasonló hatás volt megfigyelhető a légúti eredetű A549 sejtek esetében is. A kontroll sejtek nem mutattak fluoreszcenciát. A későbbi kísérletek azt mutatták, hogy a NAC eltávolítása a *C. pneumoniae* tápfolyadékából mosási lépéssel, nem módosította jelentősen a szaporodó *C. pneumoniae* számát a mosatlan *C. pneumoniae*-val történő fertőzés eredményéhez képest. A NAC hozzáadása a sejtekhez 6 vagy 24 órával a *C. pneumoniae* fertőzés után nem változtatta meg a *C. pneumoniae* által képzett zárványok számát. Továbbá a gazdasejtek NAC-cal való előinkubálása 48 órával a *C. pneumoniae* fertőzés előtt sem változtatta meg a *C. pneumoniae* szaporodását.

- **NAC kezelés fokozza a *C. pneumoiae* visszatenyészhetőségét és meghosszabbítja a fertőzés időtartamát *in vivo* egér modellben**

In vivo kísérleteink során szerettük volna megvizsgálni, hogy a NAC rövid távon súlyosbíthatja-e a chlamydia fertőzést. Húsz egeret fertőztünk meg *C. pneumoniae*-val, ebből 10 egeret 10 mg/kg NAC *per os* kezeltünk 6 napig, abban a koncentrációban, amelyet emberi légúti fertőzéseknél alkalmaznak nyákoldóként az egér súlyára számolva. A hetedik napon az egereket feláldoztuk; a tüdőt eltávolítottuk a visszatenyészthető *C. pneumoniae* meghatározására. Azt találtuk, hogy 6 napos NAC-expozíció után a *C. pneumoniae* fertőzés súlyossága fokozódott. A NAC-kezelt csoportban a visszatenyészthető chlamydia zárványok átlaga körülbelül háromszor nagyobb volt, mint a NAC kezelés nélkül *C. pneumoniae*-fertőzött egerekben. Ezután megvizsgáltuk, hogy a NAC meghosszabbítja-e a *C. pneumoniae* kiürülését a tüdőből. Tizenhat egeret fertőztünk meg *C. pneumoniae*-val, és nyolc egeret 19 napig NAC-cal kezeltünk. A huszadik napon az egereket feláldoztuk, és a tüdejüket eltávolítottuk az életképes *C. pneumoniae* kimutatására. A NAC-cal kezelt csoportban az összes egér *C. pneumoniae* pozitív volt, és a *C. pneumoniae* zárványok száma 2,5-szer magasabb volt, mint a kontrollcsoportban. Továbbá a kontrollcsoportban két egér tenyésztés-negatív lett (a módszerünk érzékenysége <40 IFU/tüdő volt), ami a betegségből való felépülésre utalt.

- **Ax kezelés nem befolyásolja a fertőző *C. pneumoniae* számát *in vivo* egérben**

A NAC jobb alternatívájának keresése érdekében az Ax *C. pneumoniae* replikációra gyakorolt hatását *in vitro* és *in vivo* rendszerekben vizsgáltuk. Ax nem okozott szignifikáns változást a baktériumok szaporodásában a McCoy sejtekben 0,002 és 0,01 mg/ml koncentrációkat használva, de 0,05 mg/ml Ax erős antimikrobiális hatást fejtett ki, és ez a *C. pneumoniae* inklúziók számát a kezeletlen sejteknél megfigyelt szám körülbelül egyötödére csökkentette. Az Ax egyik alkalmazott koncentrációja sem befolyásolta a gazdasejtek életképességét. A dózis 0,25 mg/ml-re történő emelése az Ax toxikusnak bizonyult a sejtekre nézve. Ezután meg kívántuk határozni az Ax antimikrobiális aktivitásának hátterében megbújó mechanizmusokat. A NAC-cal végzett kísérlettel azonos kísérletet végeztünk. Ax-szel kezelt és kezeletlen *C. pneumoniae*-t oltottunk McCoy és A549 sejtekre, majd a sejteket immunfluoreszcens módszerrel festettük meg. Az immunfluoreszcencia változást ebben az esetben nem figyeltük meg, és arra következtettünk, hogy az Ax kezelés nem módosította a sejtmembránhoz tapadó *C. pneumoniae* elemi testek számát. A korábban leírtak alapján az IDO1,2 antimikrobiális aktivitást mutat, mert metabolizálja a triptofánt, Ez az aminosav nélkülözhetetlen a chlamydia szaporodásához. Ezután megvizsgáltuk, hogy az Ax befolyásolhatja-e az IDO1,2 expresszióját mRNS szinten. Az Ax 2,5-szeres növekedést okozott az IDO-2 expressziójában a *C. pneumoniae*-fertőzött sejtekben a kezeletlen sejtek expressziójához képest. Kísérleteinkben a NAC kezelés nem befolyásolta az IDO1,2 expresszióját a *C. pneumoniae*-fertőzött sejtekben Az Ax *C. pneumoniae* fertőzés során betöltött szerepének további vizsgálatához egereinket *C. pneumoniae*-val fertőztük meg, és a második naptól

kezdve csapvízzel hígított Ax-szel kezeltük, ugyanolyan koncentrációban, mint amilyenben humán légúti fertőzéseknél javasolják, amikor nyákoldóként alkalmazzák (1,25 mg/kg). A kontroll egerek csapvizet kaptak. A 7 napos időszak alatt az állatok viselkedése (aktivitás és étvágy) és súlya nem változott jelentősen a csoportok között. Az egereket 7 nappal a fertőzés után feláldoztuk, és a tüdőből indirekt immunfluoreszcenciával megszámoltuk a visszatenyészthető *C. pneumoniae* inklúziók számát. Az eredmények azt mutatták, hogy az Ax kezelés nem befolyásolta szignifikánsan a visszatenyészthető *C. pneumoniae* számát.

- **Az emelt dózisú Ax csökkentette a visszatenyészthető *C. pneumoniae* számát egerek tüdejéből**

Ezt követően az volt a célunk, mivel az Ax jól tolerálható szer, meghatározzuk, hogy egy magasabb Ax koncentráció befolyásolja-e a chlamydia szaporodását. Ezért az egereket *C. pneumoniae*-val fertőztük meg (2×10^5 IFU/egér); az egerek felét az 1. naptól kezdve naponta kezeltük az Ax 5 mg/kg koncentrációjával. Ez 4x magasabb koncentráció, mint a gyakori légúti fertőzésekben nyákoldóként használt dózis. Hét nappal fertőzést követően az egereket elaltattuk, és a tüdőt eltávolítottuk az életképes *C. pneumoniae* kimutatására. Szignifikáns különbséget találtunk a visszanyerhető *C. pneumoniae* száma között az Ax-kezelt és a kezeletlen csoportok között. Az életképes *C. pneumoniae* IFU-k átlagos száma az Ax-kezelt és a kezeletlen csoportokban $3{,}1 \times 10^4$ és $7{,}3 \times 10^4$ IFU/tüdő volt. Az Ax-kezelt csoportban az egerek kevésbé súlyos tüneteket mutattak, mint a kontrollcsoportban.

- **Ax kezelés módosítja a génexpressziót, illetve az IFN-γ protein szintjét a *C. pneumoniae*-fertőzött egerek tüdejében**

Későbbi kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy az Ax kezelés befolyásolja-e a *C. pneumoniae* fertőzés indukálta citokinprofil génexpressziót. Azt találtuk, hogy az IL-12, IL-23, IL-17A és IFN-γ relatív expressziója szignifikánsan magasabb volt a *C. pneumoniae*-fertőzött/Ax-kezelt csoportban, mint a kezelés nélküli *C. pneumoniae*-fertőzött csoportban (2,22-, 3,07-, 2,46-, illetve 2,27-szeres).

Korábban már beszámoltunk arról, hogy az Ax kezelés megemeli az ismert anti-chlamydiális enzim, az IDO-2 expresszióját az A549 sejtvonalban; ez az emelkedés azonban nem szignifikáns, ha a *C. pneumoniae*-fertőzött egereknek humán egyenértékű mg/kg dózist adunk. Ezért megvizsgáltuk, hogy az Ax megemelt dózisa növeli-e az IDO-1 és IDO-2 expresszióját egerek tüdejében. Az emelt dózis ellenére sem tudtunk kimutatni szignifikáns különbséget az expressziós szintekben a *C. pneumoniae*-fertőzött egerek és a *C. pneumoniae*-fertőzött/Ax-kezelt egerek között. Ugyanakkor Virok és munkatársai eredményeivel összhangban, akik kimutatták, hogy az IDO-1 és IDO-2 aktív a *C. pneumoniae*-fertőzött egerekben, - a korábbi eredményekkel ellentétben- mi is szignifikáns növekedést találtunk mind az IDO-1, mind az IDO-2 expressziós szintjében a *C. pneumoniae* fertőzés során a kezeletlen/nem fertőzött csoportéhoz képest (15,14-, illetve 10,81-szeres).

Az SP-k döntő szerepet játszanak a tüdő homeosztázisának fenntartásában; továbbá az SP-D *C. trachomatis* ellenes aktivitást mutatott genitális egérmodellben. Ezért meghatároztuk az SP-k relatív expresszióját az egerek tüdejében. Azt találtuk, hogy a kezeletlen/fertőzött egerekben minden SP szignifikánsan fokozódott a nem fertőzött/kezeletlen csoporthoz képest (SP-A, 4,55-szörös; SP-B, 5,72-szörös; SP-C, 5,28-szoros; SP-D, 4,26-szoros), ami arra utal, hogy ezek a chlamydia ellenes mechanizmusok természetes módon fordulnak elő a *C. pneumoniae* fertőzött egértüdőben. Figyelemre méltó, hogy a kezelt/fertőzött csoportban az egerek SP-A expressziós szintjének szignifikáns emelkedését figyeltük meg a kezeletlen/fertőzött csoportéhoz képest (2,89-szeres).

Miután megállapítottuk, hogy az *Ifng* gén relatív mRNS-expressziója szignifikánsan magasabb volt az Ax-kezelt/fertőzött egerekben, mint a kezeletlen/fertőzött egerekben, megvizsgáltuk az IFN-γ fehérje expressziós szintjét. Megmértük a citokin koncentrációját a tüdő felülúszóban, és azt találtuk, hogy az IFN-γ szintje szignifikánsan magasabb volt a *C. pneumoniae*-fertőzött/Ax-kezelt csoportban, mint a kezeletlen/fertőzött csoportban ($p = 0{,}0041$). Megmértük az IL-6 pro-inflammatorikus citokin szintjét is; azonban nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a *C. pneumoniae*-fertőzött és a *C. pneumoniae*-fertőzött/Ax-kezelt csoportok expressziós szintjei között.

- **SP kezelés fokozza a *C. pneumoniae* kötődését a makrofágokhoz, és csökkenti a baktérium szaporodását**

Miután kimutattuk, hogy az Ax kezelés növeli az SP-k relatív expresszióját *C. pneumoniae*-val fertőzött egerek tüdejében, megvizsgáltuk SP fehérjék hatását a *C. pneumoniae* replikációjára és a makrofágokhoz való kötődésre *in vitro*. Azt találtuk, hogy az EB-k SP-A-val vagy SP-D-vel történő előkezelése szignifikánsan csökkentette a *C. pneumoniae* zárványok számát (0,18-szoros) (p = 0,021), illetve (0,57-szeres) (p = 0,034) a fertőzött sejtekben. Ez az anti-chlamydiális hatás kifejezettebb volt az SP-A kezelés esetén, mint az SP-D kezelésben. Ezek az eredmények megfelelnek Oberley és munkatársai megállapításainak, akik kimutatták, hogy az SP-A és SP-D képes aggregálni a chlamydiákat, ezáltal gátolni a sejtek fertőzését. Ezt követően szerettük volna megvizsgálni, hogy *C. pneumoniae*-t J-774 egér makrofág sejtek nagyobb hatékonysággal vesznek-e fel, ha SP-A-val vagy SP-D-vel vannak előkezelve. Ennek következtében *C. pneumoniae* EB-ket SP-A-val vagy SP-D-vel kezeltük, majd a mintákkal J-774 sejteket fertőztünk. 1 órás centrifugálás után a sejteket Chlamydia-specifikus immunfluoreszcens antitestekkel festettük meg, és azt találtuk, hogy a FITC átlagos pixelintenzitása szignifikánsan megemelkedett mindkét típusú SP-vel végzett kezelés után a kezeletlen EB-vel fertőzött sejtekhez képest. Ez azt jelzi, hogy a J-774 sejtekhez szignifikánsan nagyobb számú *C. pneumoniae* tapadt hozzá SP kezelés után. Ez a hatás szembetűnőbb volt az SP-A-val kezelt *C. pneumoniae*-ban, mint az SP-D-vel kezelt *C. pneumoniae* esetén (SP-A 2,74-szeres (p = 0,014)) és (SP-D 2,05-szöröse (p = 0,024)). Ez az eredményünk is egybevág Oberley és munkatársai megállapításaival, akik kimutatták, hogy THP-1 humán monocyta sejtek magasabb hatásfokkal vették fel a SP-A-val vagy SP-D-vel kezelt chlamydiát.

- **Ax kezelés nem indukál apoptózist kaszpáz függő útvonalon, de csökkenti az ERK1 1/2 aktivitását *C. pneumoniae* fertőzött sejtekben**

Kimutatták, hogy a *C. pneumoniae* képes megakadályozni a gazdasejt apoptózisát; ezért megvizsgáltuk, hogy az Ax kezelés befolyásolja-e a gazdasejt pusztulását a *C. pneumoniae* fertőzés során. Galle és munkatársai szerint a *C. pneumoniae*-val fertőzött sejtekben az annexin V festéssel történő apoptózis értékelése nem pontos, mivel a *C. pneumoniae* által kiváltott fertőzés következtében foszfatidil-szerin a gazdasejt membránján externalizálódik, amely kötőhelyet biztosít az annexin V-nek, és álpozitív apoptózis jelet eredményez. Ennek elkerülésére áramlási citometriával határoztuk meg a kaszpáz 3/7 aktivitását. Az elemzés kimutatta, hogy a kaszpáz 3/7 aktivitása nem különbözött szignifikánsan a kezelt/fertőzött csoport és a kezeletlen/fertőzött csoportok között.

A *C. pneumoniae* aktiválja az ERK 1/2 útvonalat, hogy számos esszenciális molekulát szerezzen be a gazdasejtekből, és hogy elkerülje a gazdasejt apoptózisát. Ezért megvizsgáltuk az Ax kezelés hatását a MAPK/ERK aktivitásra *C. pneumoniae*-val fertőzött sejtekben. Western blot analízis kimutatta, hogy az ERK-1 (1,49-szeres; $p < 0,05$) és az ERK-2 (2,04-szeres; $p < 0,05$) fehérje expressziós szintje szignifikánsan megemelkedett a kezeletlen/fertőzött sejtekben a kezeletlen/fertőzetlen sejtekhez képest. Azt is megfigyeltük, hogy a *C. pneumoniae* fertőzés szignifikánsan (2,25-szörösére) növelte az MSK-1 szintet a kezeletlen/fertőzött sejtekben a kezeletlen/fertőzetlen sejtekhez képest. Az MSK-1 felelős a B-sejt nukleáris faktor kappa aktiválásáért és a korai gének, például a *c-fos*, a *junB* és az *mkp-1* indukciójáért. A *C. pneumoniae*-val fertőzött sejtek Ax kezelése szignifikánsan csökkentette a c-RAF (0,42-szeres), az ERK-1 (0,16-szoros), az ERK-2 (0,15-szeres), a P90RSK1 (0,61-szeres), a P90RSK2 (0,67-szeres) és az MSK-1 (0,19-szeres) szintjét ($p < 0,05$) a kezeletlen/fertőzött csoporthoz képest.

5) Diszkusszió

A NAC egy többféle indikációval rendelkező gyógyszer, amelyet különböző betegségek kezelésére használnak, viszont főként nyákoldóként használatos. Viszonylag olcsó és a kereskedelemben vény nélkül kapható. Kimutatták, hogy a glutation S-transzferáz aktivitásának növelésével növeli a glutation, a szervezet fő antioxidánsának szintjét. Ezenfelül a NAC erős antioxidáns és alkalmas a szabad oxigéngyökök keletkezésével jellemezhető betegségek kezelésére. A NAC például terápiás lehetőség lehet a krónikus obstruktív tüdőbetegségben. Egy 1392 beteg bevonásával végzett nyílt vizsgálatban a

NAC csökkentette a köpet viszkozitását, mérsékelte a köhögés súlyosságát és könnyítette a köptet eltávolítását a betegeknél 2 hónapos kezelés után. Továbbá a NAC lényegesen enyhítette az influenza tüneteit a placebóval kezelt csoporttal összehasonlítva. Vizsgálatunkban azt találtuk, hogy ahelyett, hogy a NAC csökkentette volna a baktériumok szaporodását, növelte a szaporodó *C. pneumoniae* számát mind *in vitro*, mind *in vivo* fertőzésekben.

In vitro kísérletünk alapján bizonyítottuk, hogy a NAC fokozta a *C. pneumoniae* elemi testek kötődését a gazdasejthez. Lazarev és munkatársai az intracelluláris GSH szerepét vizsgálták a *C. trachomatis* fertőzésben, és azt találták, hogy a sejtek butionin-szulfoximinnal való kezelése után, amely a GSH bioszintézis irreverzibilis gátlását vagy a GSH hidrogén-peroxid által kiváltott oxidációját okozza, csökkentette a *C. trachomatis* zárványok számát. Ezzel az eredménnyel ellentétben a *C. trachomatis* elemi testek NAC-cal való kezelése növelte a chlamydia zárványok számát. Viszont a kutatók nem próbálták meg ennek az okát kideríteni Ezenfelül, a kutatók arra a következtetésre jutottak, hogy a GSH döntő szerepet játszik a chlamydia szaporodásában. Kísérleteikben azonban a NAC-ot a GSH prekurzorként használták, és nem kísérelték meg a NAC chlamydia ellenes hatásának vizsgálatát. Ismert azonban, hogy a Chlamydia fajok fertőzőképessége az OmcB nevű sejtmembrán fehérje diszulfidhídjainak redukált státuszától függ. Hipotézisünkkel összhangban az elemi testek NAC kezelése közvetlenül növeli a baktérium kötődését a gazdasejthez, valószínűleg az OmcB redukálásával, ami nem származhatott a GSH megnövekedett szintjéből, mivel a NAC-ot kísérleteink egy részében eltávolítottuk a tápfolyadékból. *In vivo* eredményeink szerint a NAC jelentősen növelte a *C. pneumoniae* szaporodását mind az akut fertőzés korai fázisában, mind az akut fertőzés késői fázisában. A kísérlet során az egerek súlyosabb fertőzési tüneteket mutattak (pl. testsúly, testtartás, viselkedés megváltozása) a NAC-cal kezelt csoportban, mint a kezeletlen csoportban, ami arra utal, hogy a fertőzés súlyosabb volt. A NAC akut *C. pneumoniae* fertőzésre gyakorolt negatív hatása mellett figyelembe kell vennünk a hatóanyag egy másik lehetséges hatását is. A *Chlamydiaceae* családba tartozó *C. trachomatis* az egyik leggyakoribb szexuális úton terjedő kórokozó. Sajnos a fertőzés az esetek akár 70%-ában tünetmentes. A krónikus *C. trachomatis* fertőzés súlyos következményei a méhen kívüli terhesség, a meddőség vagy a kismedencei gyulladás. A legrosszabb esetben a folyamatban lévő légúti betegségek kezelésében alkalmazott NAC nemcsak a *C. pneumoniae* növekedését fokozhatja, hanem a *C. trachomatis* szaporodását is serkentheti. A NAC *C. pneumoniae* fertőzést súlyosbító hatásának megkerülése érdekében olyan jobb nyákoldó szert kerestünk, amely nem fokozza a *C. pneumoniae* okozta légúti betegség súlyosságát. *In vitro* vizsgálatunkban az Ax jelentős chlamydia ellenes aktivitást mutatott. Az Ax teljes antimikrobiális mechanizmusát nem elemeztük, de az Ax kezelés növelte az anti-chlamydiális IDO-2 expresszióját, ami részben felelős lehet a kórokozók számának csökkenéséért. Az *in vitro* kísérleteink igazolására *in vivo* kísérletünkben *C. pneumoniae*-val fertőztünk, majd a humán gyógyászatban alkalmazott koncentrációban kezeltük Ax-szel az egereket. A kísérlet alapján nem találtunk szignifikáns különbséget a visszatenyészthető *C. pneumoniae* számában az Ax-kezelt és a kezeletlen csoportok között. Yang és munkatársai megállapították, hogy az Ax 10 mg/kg/nap (ami nyolcszor nagyobb, mint az embernél alkalmazott dózis) jelentősen csökkentette a H3N2 influenzavírus letális dózisával megfertőzött egerek halálozását. A *C. pneumoniae* gyakori légúti kórokozó, és sajnos nem mindig diagnosztizálják megfelelően, ezért hipotézisünk szerint, ha az orvos NAC-ot javasol nyákoldóként, az ronthatja, illetve késleltetheti a beteg felépülését a fertőzésből. A *C. pneumoniae* fertőzés prevalenciája alapján sok beteg szenvedhet elhúzódó légúti megbetegedésben a NAC kezelés következtében. Összességében eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a NAC súlyosbítja és meghosszabbítja a *C. pneumoniae* által okozott fertőzést állatmodellben. Ez az információ hasznos lehet az orvosok számára, akik a NAC-ot nyálkaoldóként ajánlják a nem azonosított etiológiájú légzőszervi megbetegedésekben. *C. pneumoniae* fertőzés esetén a helyes laboratóriumi diagnózis elengedhetetlen, mert ennek hiányában a NAC alkalmazása ronthatja a beteg gyógyulási esélyeit. Fontos lenne, hogy laboratóriumi eredményeink klinikai vizsgálatok során is bizonyítást nyerjenek.

Az Ax, a brómhexin metabolitja, biztonságos OTC gyógyszerként tartják számon. Elsősorban köptető szerként ajánlják különböző légúti betegségek kezelésére, amelyek kiterjedt nyáktermeléssel járnak. Az Ax kezelés növeli a felületaktív anyagok szintézisét és elősegíti azok szekrécióját a II. típusú pneumocitákból. Az Ax továbbá feszültségfüggő nátriumcsatorna-gátló tulajdonságokkal rendelkezik, ami a torokfájással járó betegségek esetén előnyös lehet az Ax pasztillákba való beépítésével. Az Ax a Gaucher-kór kezelésében is alkalmazható, és a Parkinson-kór kezelésében kiegészítő gyógyszerként

tartják számon, mivel növeli a glükocerebrozidáz aktivitást. Emellett egy nemrégiben publikált tanulmány szerint, ha az Ax-et antibiotikumokkal együtt adják, a szekréciót támogató funkciójának köszönhetően magasabb antibiotikum koncentráció érhető el a tüdőben. Számos tanulmány kimutatta, hogy az Ax antimikrobiális tulajdonságokkal rendelkezik. Az Ax kezelés visszafordíthatja a *Candida albicans* fluconazollal szembeni rezisztenciáját. Továbbá gátolja a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid átalakulását, illetve elősegíti a ciprofloxacin biofilmekkel szembeni baktericid hatását. Ezenfelül az Ax gátolja a rhinovírus szaporodást humán légcsőhámsejtek primer tenyészeteiben. Az Ax biofilm ellenes tulajdonságokat is mutat; az Ax-szel 7 napig kezelt *Pseudomonas aeruginosa* által képzett biofilm vékonyabb és töredezettebb volt, mint a kezeletlen sejtek által képzett biofilm. Ismert, hogy az Ax kedvező kockázat-haszon profillal rendelkező gyógyszer; ezért megvizsgáltuk az Ax dózis négyszeresének hatását a *C. pneumoniae* fertőzés esetén. *In vivo* vizsgálatunkban azt találtuk, hogy 5mg/kg Ax jelentősen csökkentette az egerek tüdejében az életképes *C. pneumoniae* mennyiségét. A *C. pneumoniae* fertőzésben leírták több citokin szerepét. Az IL-17A neutrofil beáramlást okoz a tüdőben; a *C. pneumoniae*-val fertőzött és anti-IL-17A antitestekkel kezelt egereknél magasabb volt a visszatenyészthető *C. pneumoniae* inklúziók száma. Az IL-23-ról leírták, hogy alapvető fontosságú a *C. pneumoniae*-specifikus Th17-válasz indukálásához. Vizsgálatunkban a *C. pneumoniae*-fertőzött egerek Ax kezelése jelentősen megnövelte az IFN-γ, IL-12, IL-17A és IL-23 relatív expressziós szintjét a kezeletlen/fertőzött egerekéhez képest; emellett az Ax-kezelt *C. pneumoniae*-fertőzött egerek tüdejében magasabb volt az IFN-γ koncentrációja protein szintje, mint a fertőzött/nem kezelt egereké. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az Ax kezelés fokozhatja a gyulladást a tüdőben és elősegítheti a chlamydia ellenes választ, ami a baktérium számának csökkenését eredményezheti. Ezenfelül további tényezők is hozzájárulhatnak a visszatenyészthető *C. pneumoniae* zárványok számának csökkenéséhez. Az SP-A és SP-D immunológiai szerepet játszik a tüdő homeosztázisának fenntartásában. Kimutatták, hogy ezek a fehérjék képesek a *C. trachomatis* aggregálására, és elősegíthetik a baktériumok felvételét a humán makrofágokba. A qPCR eredményeink emelkedett relatív SP-A mRNS szintet mutattak, ami szintén hozzájárulhat a baktériumok jobb eliminációjához az Ax-kezelt egerekben. *In vitro* eredményeink összhangban vannak ezzel a jelenséggel, mivel azt találtuk, hogy a *C. pneumoniae* SP-A-val vagy SP-D-vel történő előkezelése csökkentette a *C. pneumoniae* McCoy sejtvonalban való visszatenyészthetőségét, ami valószínűleg az SP-A és SP-D aggregáló hatásának köszönhető. Ezenfelül eredményeink szerint az SP-A és az SP-D növelte a *C. pneumoniae* kötődését az egér makrofág sejtekhez, hasonlóan a humán makrofág sejteknél talált eredményekhez.

Ismert, hogy a *C. pneumoniae* a fertőzés korai szakaszában gátolja a sejtek apoptózisát, viszont a fertőzés késői szakaszában a pro-apoptotikus folyamatok dominálnak a fertőzött sejtben. Korábban kutatócsoportunk is megállapította, hogy a chlamydia-fertőzött sejtekben egyszerre jelennek meg pro- és anti-apoptotikus folyamatok. Egerek méh epithel sejtjeit *C. trachomatis*-szal fertőztük és IFN-γ-val kezeltük, ezt követően DNS-chip analízissel transzkriptom analízist végeztünk. Megállapítottuk, hogy mind az apoptózis pozitív, illetve a negatív szabályozása erősen fokozódott, ami összességében az apoptózis hiányát eredményezte a *C. trachomatis*-fertőzött és az IFN-γ kezelt sejtekben. Eredményeink összhangban vannak ezekkel az eredményekkel, mivel nem tudtunk kimutatni emelkedett kaszpáz 3/7 aktivitást 12 h *p.i.*. Emellett ismert, hogy *C. pneumoniae* serkenti az ERK 1/2 útvonal aktivitását, annak érdekében, hogy megakadályozza a kaszpáz-független apoptózist. Hasonlóképpen azt találtuk, hogy a *C. pneumoniae* fertőzés jelentősen fokozta az ERK 1/2 útvonal aktivitását a nem fertőzött/kezeletlen sejtekhez képest. Figyelemre méltó, hogy felfedeztünk egy új lehetséges mechanizmust, amelyen keresztül a *C. pneumoniae* megakadályozza a gazdasejtek apoptózisát, miszerint a *C. pneumoniae* jelentősen megemeli a foszforilált MSK-1 szintjét, ami szintén elősegítheti a BCL-2-asszociált BAD foszforilációját, és ez a BAD-indukált apoptózis elfojtásához vezethet. Ezzel szemben, amikor a sejteket Ax-szel kezeltük a *C. pneumoniae*-val fertőzött sejteket a MAPK/ERK aktivitás jelentősen csökkent. Ez az eredmény arra utalhat, hogy az Ax chlamydia ellenes aktivitása részben a csökkent MAPK/ERK 1/2 aktivitásnak tulajdonítható. Ezenfelül MAPK/ERK 1/2 útvonal a szaporodó baktériumok táplálkozásában is döntő szerepet játszik, és e folyamat gátlása végzetes a kórokozó számára; kimutatták, hogy a MAPK-gátlók képesek gátolni a *C. pneumoniae* fertőzést. A P90RSK1/2 fehérje szintje is jelentősen csökkent; ez a fehérje kulcsfontosságú több antiapoptotikus fehérje, például a halál doménhez társított fehérje kináz 1(DAPK-1) és a BAD foszforilálásában. Emellett a foszforilált MSK-1 szintje is szignifikánsan csökkent, ami közismerten apoptózist eredményez. Ezek az eredmények arra

utalnak, hogy az Ax-kezelés apoptózist indukálhat a *C. pneumoniae*-fertőzött sejtekben, ezáltal gátolva a baktériumok szaporodását.

Egy fázis 2. klinikai vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy az Ax jól tolerálható a standard 1,25 mg/kg adagoláson túl is. Tekintettel a COVID-19 világjárványra, több vizsgálat is kimutatta, hogy az Ax kiegészítő gyógyszerként alkalmazható a COVID-19 kezelésére. Figyelemre méltó, hogy a MAPK/ERK-aktiváció további bakteriális fertőzésekben, köztük a Chlamydia fertőzésekhez hasonló *Coxiella burnetii*-fertőzésekben is központi szerepet játszik. Ezért úgy gondoljuk, hogy érdemes lehet megvizsgálni az Ax szerepét a *C. burnetii* okozta fertőzésekben is.

6) Az értekezés új megállapításai

1. A NAC növeli a *C. pneumoniae* szaporodását *in vitro*
2. A NAC fokozza a *C. pneumoniae* szaporodását *in vivo* egérben és késlelteti a baktérium kiürülését a tüdőből
3. A NAC fokozza az elemi testek hozzákapcsolódását a gazdasejthez, amely megnövekedett baktérium bejutást eredményezhet a sejtbe, így növelve a baktérium szaporodását
4. Az Ax-nek nincs anti-chlamydiális hatása az emberi gyógyászatban használt koncentrációban *in vivo* egérben
5. Az Ax anti-chlamydiális hatással bír 4x magasabb koncentrációban, mint ami használatos az emberi gyógyászatban *in vivo* egérben
6. Az Ax szignfikánsan emeli az IL-12, IL-17A, IL-23, IFN-γ és a SP-A relatív expresszióját a *C. pneumoniae* fertőzött tüdőben, amely egy erősebb gyulladásra utal, így fokozva a baktérium eltávolítását
7. Az Ax szignifikánsan emeli a IFN-γ fehérje koncentrációját a *C. pneumonia*e fertőzött tüdőfelülúszóban, amely egy erőteljesebb celluláris immun választ eredményez
8. A *C. pneumoniae* fokozza a foszforilált MSK-1 szintet, amely anti-apoptotikus folyamatokat eredményez
9. Az Ax csökkenti az ERK1/2 aktivitását, ami fokozott apoptózishoz vezet, így a *C. pneumoniae* nagyobb mértékű pusztulása figyelhető meg

7) Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Burián Katalin**nak, aki erejét és idejét nem kímélve mindig támogatott, amióta 2015-ben tudományos diákköröskénti elkezdtem a laboratóriumában dolgozni. Köszönöm továbbá **Müllerné Deák Györgyi** asszisztensünknek, aki mindig segített, amikor elvesztem a sok munkában. Köszönöm kollégáimnak, **Endrész Valériának** és **Somogyvári Ferencn**ek, akik nagy segítségemre voltak a doktori munkám során. Köszönetemet fejezem ki barátaimnak, **Benkő Ernőn**ek és **Lőrinczi Bálint**nak. Köszönöm nagyszüleimnek, egész életemben nyújtott szeretetüket. A legnagyobb hálával édesanyámnak és édesapámnak tartozom, a soha véget nem érő szeretetük és gondoskodásuk nélkül semmit sem tudtam volna elérni az életben. Külön köszönetemet fejezem ki **menyasszonyom**nak, aki mindig támogatott a doktori tanulmányaim során.

Doktori disszertációmat szeretteimnek ajánlom, akik ma már nem lehetnek velünk: **Sarolta**, **János** és **Gabriella**

8) Közlemények

Tézis témájához kapcsolódó pulikációk:

1. N-acetyl-cysteine increases the replication of *Chlamydia pneumoniae* and prolongs the clearance of the pathogen from mice.

   David Kokai, Timea Mosolygo, Dezso Peter Virok, Valeria Endresz, Katalin Burian
   JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY 67: 5 pp. 702-708. , 7 p (2018).
   doi: 10.1099/jmm.0.000716

   Q2 IF_{2018}: 1.926

2. Ambroxol Treatment Suppresses the Proliferation of *Chlamydia pneumoniae* in Murine Lungs

   Dávid Kókai, Dóra Paróczai, Dezso Peter Virok, Valéria Endrész, Renáta Gáspár, Tamás Csont, Renáta Bozó and Katalin Burián
   MICROORGANISMS 9: 4 p. 880 , 14 p. (2021)
   https://doi.org/microorganisms9040880

   Q2 IF_{2020}: 4.128*

Kumulatív impakt faktor: 6.054

Tézis témájához nem kapcsolódó publikációk:

1. Indoleamine 2,3-dioxygenase activity in *Chlamydia muridarum* and *Chlamydia pneumoniae* infected mouse lung tissues

   Dezső Virok, Tímea Raffai, **David Kokai**, Dóra Paróczai, Anita Bogdanov, Gábor Veres, László Vécsei, Szilard Poliska, László Tiszlavicz, Ferenc Somogyvári, Valéria Endrész, Katalin Burián
   FRONTIERS IN CELLULAR AND INFECTION MICROBIOLOGY 9
   Paper: 192, 12 p. (2019)
   doi: 10.3389/fcimb.2019.00192

   D1 IF_{2019}: 4.123

3. Aerodynamic properties and in silico deposition of isoniazid loaded chitosan/thiolated chitosan and hyaluronic acid hybrid nanoplex DPIs as a potential TB treatment

   Mahwash Mukhtar, Edina Pallagi, Ildikó Csóka, Edit Benke, Árpád Farkas, Mahira Zeeshan, Katalin Burián, **Dávid Kókai**, Rita Ambrus
   INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES 165 pp. 3007-3019. , 13 p. (2020)
   https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.192

   Q1 IF_{2020}:6.953

2. Chlamydia pneumoniae Influence on Cytokine Production in Steroid-Resistant and Steroid-Sensitive Asthmatics

   Paróczai, Dóra; Mosolygó, Tímea; **Kókai, Dávid**; Endrész, Valéria; Virók, Dezső Péter; Somfay, Attila; Burián, Katalin
   PATHOGENS 9: 2 Paper: 112, 13 p. (2020)
   doi: 10.3390/pathogens9020112

   Q2 IF_{2020}: 3.492

4. Beneficial Immunomodulatory Effects of Fluticasone Propionate in *Chlamydia pneumoniae*-Infected Mice

   Dóra Paróczai, Anita Sejben, **Dávid Kókai**, Dezso P. Virok, Valéria Endrész and Katalin Burián
   PATHOGENS 10: 3 Paper: 338, 13 p. (2021)
   https://doi.org/10.3390/pathogens10030338

   Q2 IF_{2020}: 3.492

5. Freeze-dried vs spray-dried nanoplex DPIs based on chitosan and its derivatives conjugated with hyaluronic acid for tuberculosis: *In vitro* aerodynamic and in silico deposition profiles

   Mahwash Mukhtara, Zsolt Szakonyi, Árpád Farkas, Katalin Burian, **Dávid Kókai**, Rita Ambrus
   EUROPEAN POLYMER JOURNAL 160 Paper: 110775, 14 p. (2021)
   https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110775

   Q1 IF_{2020}: 4.598

6. Indoleamine 2,3-dioxygenase cannot inhibit Chlamydia trachomatis growth in HL-60 human neutrophil granulocytes

   Dezso Peter Virok, Ferenc Tömösi, Anita Varga-Bogdanov, Szilard Poliska, Bella Bruszel, Zsuzsanna Cseh, **David Kokai**, Dóra Paróczai, Valeria Endresz, Tamas Janaky, Katalin Burián

   FRONTIERS IN IMMUNOLOGY 12 Paper: 717311, 14 p. (2021)

   Q1 IF_{2020}:7.561

7. Physico-Chemical, In Vitro and Ex Vivo Characterization of Meloxicam Potassium-Cyclodextrin Nanospheres

   Patrícia Varga , Rita Ambrus , Piroska Szabó-Révész , **Dávid Kókai** , Katalin Burián , Zsolt Bella , Ferenc Fenyvesi , Csilla Bartos
   PHARMACEUTICS 13: 11 Paper: 1883, 14 p. (2021)
   https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111883

   Q1 IF_{2020}:6.321

Kumulatív impakt faktor:36.54

Tézis témájához kapcsolódó absztraktok:

1. Katalin, Burián; Bettina, Magyari; Tímea, Mosolygó; Valéria, Endrész; Dezső, Virók; **Dávid, Kókai**
   Effects of mucolitics in in vitro and in vivo *Chlamydophila pneumoniae* infection
   Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica 64: Suppl.1. pp. 115-116., 2 p. (2017)

2. Katalin, Burian; **David, Kokai**; Tímea, Mosolygó; Dezso, Virok; Valeria, Endresz
   N-acetyl-cysteine increases the replication of *Chlamydia pneumoniae* and prolongs the clearance of the pathogen from mice
   In: 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (28th ECCMID)(2018)

3. **David Kokai**; Dora Paroczai; Dezso Virok; Valeria Endresz; Katalin Burian
   Antimicrobial Effect Of The Commonly Used Mucolytic Agent, Ambroxol
   In: A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2018. évi Nagygyűlése és a XIII. Fermentációs Kollokvium :(2018) 70 p. p. 33

4. **Dávid, Kókai**; Dóra, Paróczai; Dezső, Virók; Valéria, Endrész; Katalin, Burián
   Antimicrobial effect of the commonly used mucolytic agent, ambroxol
   Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica 66: Suppl. 1 pp. 52-52, 1 p. (2019)

5. **Kókai, Dávid**; Paróczai, Dóra; Burián, Katalin
   Egy mukolitikum in vitro és in vivo anti-chlamydiális hatással
   Medicina Thoracalis (BUDAPEST) 73: 1 pp. 15-16, 2 p. (2020)

6. **David, Kokai**; Dora, Paroczai; Dezso, Virok; Valeria, Endresz; Katalin, Burian
   Ambroxol Possesses An Antichlamydial Effect *In Vitro* And *In Vivo* (2020)
   18th German Chlamydia Workshop 2020 2020-02-05 Lübeck, Germany

Tézis témájához nem kapcsolódó absztraktok:

1. **Dávid, Kókai**; Dóra, Paróczai; Dezső, Virók; Valéria, Endrész; Dezső, Csupor; Katalin, Burián
   Growth modulating effect of Hedera helix extract on bacteria
   Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica 66: Suppl. 1pp. 156-157. 2 p.(2019)

2. **Kókai, Dávid**; Paróczai, Dóra; Virók, Dezső Péter; Endrész, Valéria; Somogyvári, Ferenc; Bozó, Renáta; Burián, Katalin
   Viscum Album Tumorellenes Hatásának Vizsgálata (2020)
   A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2020. évi Nagygyűlése és a XIV. Fermentációs Kollokvium 2020-10-14 Kecskemét, Magyarország

3. **Dávid, Kókai**; Dóra, Paróczai; Dezső, Péter Virók; Valéria, Endrész; Ferenc, Somogyvári; Renáta, Bozó; Katalin, Burián
   Antitumor Effect of Viscum Album
   Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica 68: Supplement 1 p. 24 (2021)

4. **Dávid, Kókai**; Dóra, Paróczai; Zain, Baaity; Dezső, P. Virók; Valéria, Endrész; Rita, Ambrus; Renáta, Bozó; Katalin, Burián
   Investigation of antiviral properties of hyaluronic acid (2021)
   23rd Annual Conference of the European Society for Clinical Virology