

**A *Chlamydia pneumoniae* fertőzés kimenetelét befolyásoló
gyógyszerek és a kórokozó által kiváltott immunválasz vizsgálata**

Ph.D. értekezés tézisei

Dr. Paróczai Dóra



Témavezető: Dr. habil. Burián Katalin Ph.D.

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet

Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Szeged

2021

1. Bevezetés

- **Chlamydia fertőzések általános jellemzői**

A Chlamydiák Gram-negatív, bifázisos fejlődési ciklussal rendelkező intracelluláris baktériumok, melyek széles körben képesek a gazdaszervezetet fertőzni az amőbáktól az emberi szervezetheg. A *C. pneumoniae* közösségben szerzett atípusos tüdőgyulladást, bronchitist, pharyngitist és sinusitist képes okozni és szerepet játszik az asztma patogenezisében és az obstruktív tüdőbetegségek akut exacerbációinak kialakulásában is.

A Chlamydia fertőzések során túlnyomórészt sejt immunválasz alakul ki, mely során a CD4⁺ és CD8⁺ T-sejtek IFN- γ termelése fokozódik. Az IFN- γ aktiválja az indolamin-2,3-dioxigenázt (IDO), amely képes az L-triptofán N-formilkinureninné való lebontására, így a triptofán szint csökkenéséhez vezethet. Mivel a Chlamydiák triptofán auxotróf baktériumok, a triptofán megvonása a Chlamydia fertőzés eliminálásához vagy a patogén úgynevezett perzisztens állapotához vezethet. Egy korábbi vizsgálat során, az IFN- γ -val kezelt, Chlamydia-fertőzött egér epithél sejtek transzkriptom analiziséből kiderült, hogy az IFN- γ szignifikánsan fokozta a T-sejt kemokinek, mint például a MIG/CXCL-9, IP-10/CXCL-10, I-TAC/CXCL-11 expresszióját, továbbá szintén fokozta azon gének expresszióját, melyek a neutrophil sejtek és a monociták működésében játszanak szerepet. Az IDO aktivitást különféle tényezők, például IL-10, TNF- α , IFN- γ vagy az oxidatív stressz válthatják ki, mely kulcsfontosságú szerepet játszik a vírusos vagy bakteriális fertőzések eliminálásában. Egy korábbi tanulmány kimutatta, hogy az IL-17A neutralizálása *C. pneumoniae* fertőzött egerekben nagyobb mennyiségű visszatenyészhető *C. pneumoniae*-et, csökkent neutrophil sejt számot és csökkent citokin termelést eredményezett, ami arra enged következtetni, hogy az IL-17A indirekt módon fokozza az neutrophil sejtek anti-chlamydiás aktivitását.

- **A *C. pneumoniae* és a fertőzés indukálta asztma**

Egyre több tanulmány áll rendelkezésre a *C. pneumoniae* fertőzés az asztma súlyosságának összefüggéseiről, ezek alapján a perisztens *C. pneumoniae* fertőzés hozzájárul a súlyos asztma kialakulásához, és kockázati tényezőt jelent az asztmás tünetek és exacerbációk kialakulásában. Az asztmás betegekben megfigyelhető *C. pneumoniae* antitestek magasabb szintje vetette fel a fertőzés szerepét az asztma patogenezisében. Ezen szerológiai markerek a betegek légzésfunkciós értékeinek csökkenését is meghatározták, ami a fokozott légúti limitációra utalt a *C. pneumoniae* fertőzött asztmás betegek esetében. A *C. pneumoniae* befolyásolhatja az asztmás betegek citokin termelését, ezáltal hatással lehet a terápia kimenetelére. A *C. pneumoniae* fokozza az IL-8, TNF- α szekrécióját a perifériás vér mononukleáris sejtjeiben (PBMC), indukálja az NF- κ B aktivitást és kiváltja a légúti epithél sejtek IFN- γ termelését.

- **A kortikoszteroid kezelés és a fertőzések közötti összefüggések**

Az inhalációs kortikoszteroidokat (ICS) az asztma és a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD) egyik leghatékonyabb kezelésének tartják az exacerbáció kockázatának csökkentésére és a légzésfunkciós paraméterek javítására, azonban az ICS-eket a tüdőgyulladás fokozott kockázatával társítják. Korábbi tanulmányok nem szolgáltattak egyértelmű adatokkal arra, hogy az ICS-ek használata a tüdőgyulladás kialakulására potenciális kockázati tényezőt jelent-e. A budezonid (BUD) és a flutikazon-propionát (FP) farmakokinetikai, fizikai-kémiai és még immunszuppresszív tulajdonságaikban is különbségeket mutatnak, ami megmagyarázhatja a légúti fertőzésekre és exacerbációkra gyakorolt eltérő hatásukat.

- **Szteroid-rezisztens asztma és a *C. pneumoniae* fertőzés kapcsolata**

Az asztmás betegek körülbelül 5-10% -a nem reagál teljes mértékben a szteroid terápiára, és ezek a betegek magasabb halálozási és morbiditási arányt is mutatnak. A szteroid rezisztencia klinikai diagnózisa akkor állítható fel, amikor a betegek poszt-bronchodilatátor erőltetett kilégzési másodperc térfogata (FEV1) <15%-os javulást mutat 14 napos *per os* prednizolon terápia után. Korábban *C. pneumoniae* fertőzést átesett asztmásoknál nagyobb valószínűséggel alakul ki szteroid-rezisztens asztma, pozitív szerostátuszuk pedig fokozott asztma súlyosságával és légúti neutrophiliával járhat együtt.

Az IL-10 döntő szerepet játszik a tüdő sejtjeinek immunválaszaiban, és részt vesz az asztma patogenezisében a Th2 válaszok szabályozásával és esetlegesen azok gátlásával. Az asztmás betegek csökkent IL-10 termelést mutatnak a bronchoalveoláris lavage-ban (BAL), azonban nincsenek egyértelmű adatok ezen betegek PBMC-jeinek IL-10 termeléséről.

A TNF- α termelés a légúti hyperraktivitásban (AHR) jelentős szerepet játszik az eosinophil és a neutrophil sejtek aktiválásán keresztül. A *C. pneumoniae* képes TNF- α termelést kiváltani, mely a PBMC-k csökkent szteroid reakciókészségéhez vezethet. Egy korábbi *C. pneumoniae* fertőzés hatást gyakorolhat a TNF- α válaszra, ezért megvizsgáltuk a PBMC-k TNF- α szekréciónak Chlamydia-specifikus IgG negatív és pozitív betegek esetében.

A mátrix metalloproteinázok (MMP) és inhibitorai részt vesznek az extracelluláris mátrix felépítésének szabályozásában és meghatározzák a légutak epithél vastagságát. Az MMP-9 kulcsszerepet játszik a légúti remodellingben, így ez volt az első típusú MMP, amelyet asztmában vizsgáltak. A *C. pneumoniae* befolyásolja PBMC-k MMP-9 és a metalloproteináz-1 szöveti inhibitor (TIMP-1) termelését, ezáltal csökkenti glükokortikoidok hatását az MMP-k szekréciónak.

2. Célkitűzések

- **1. Az inhalációs kortikoszteroidok hatásának vizsgálata *C. pneumoniae* fertőzésre *in vitro* és *in vivo***

Kísérleteink során megvizsgáltuk a FP és BUD kezelés hatásait fertőzött A549 sejteken és egér modellben. Célul tűztük ki, hogy kezelést követően meghatározzuk egyrészt a *C. pneumoniae* mennyiségét, másrészt pedig a potenciális anti-chlamydiás hatással bíró IFN- γ és az IFN- γ indukált kemokin termelését (MIG/CXCL-9), az IFN- γ kiváltotta a génextpressziókat (IDO1, IDO2, TDO) és az IL-4, IL-10, IL-17A citokinek termelését.

- **2. A szteroid-rezisztens és szteroid-érzékeny asztmás betegek citokin termelésének vizsgálata *in vitro***

Kísérleteink során a szteroid-rezisztens és -érzékeny asztmásokból nyert PBMC-jeinek IL-10 és TNF- α termelését vizsgáltuk specifikus (*C. pneumoniae* antigén) és egy poliklonális mitogén jelenlétében. Továbbá, mivel a szteroid-érzékeny és -rezisztens asztmások MMP-9 szintjéről nem állnak rendelkezésre adatok, a betegek szérumában mérhető MMP-9 szinteket *C. pneumoniae* szerostátusz és a szteroid válaszkészség függvényében vizsgáltuk meg.

3. Anyagok és módszerek

- **FP és BUD hatásának vizsgálata A549 légúti epithél sejtekben**

Az A549 humán légúti epithél sejteket FP-vel vagy BUD-dal előkezeltük, majd 24 órán át inkubáltuk (37°C, 5% CO₂). A kontroll sejteket nem kezeltük. A legmagasabb nem-toxikus gyógyszerkoncentrációkat (FP: 3,5 x 10⁻⁴ mM, BUD: 7 x 10⁻⁴ mM) MTT citotoxicitási teszttel határoztuk meg. A 24 órás kezelés után a lemezt kétszer mostuk PBS-sel, majd a sejteket *C. pneumoniae*val fertőztük meg 0.01 multiplicitással (MOI 0.01). A sejtekre 0,5% (w/v) glükózt tartalmazó tápfolyadékot mértünk, a lemezt centrifugáltuk (800 g, 60 perc), majd ismételtén FP-t vagy BUD-ot adtunk a lyukakhoz. A kontroll fertőzött sejteket nem kezeltük. A fertőzés után a lemezeket 37°C-on, 5% CO₂ alatt 48 órán át inkubáltuk. Ezt követően a lemezt ismételtén kétszer mostuk PBS-sel, és lemez lyukaiba 100 μ L SPG oldatot adtunk. A lemezeket két ciklus olvasztás-fagyasztásnak vetettük alá, melyet gyors fagyasztás követett (-80°C, 15 perc), így a kapott sejtlizátumokat közvetlenül templátként használtuk fel a direkt kvantitatív polimeráz láncreakcióhoz (qPCR), mellyel a *C. pneumoniae* mennyiségére következtethettünk.

- **A *C. pneumoniae* szaporítása és mennyiségi meghatározása**

A *C. pneumoniae* CWL-029 törzset Hep-2 sejteken szaporítottuk. Az EB-ket tisztítottuk, majd SPG-ben alikvotoltuk és további felhasználásig -80°C-on tároltuk. A fertőző *C. pneumoniae* EB-k titerének meghatározására indirekt

immunfluoreszcenciát végeztünk. A megtisztított EB-k tízes léptékű hígításait McCoy sejtekre oltottuk. 48 órás inkubálást követően a fertőzött sejteket acetonnal fixáltuk $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, majd monoklonális anti-*Chlamydia* LPS ellenanyaggal és másodlagos, FITC-konjugált anti-egér IgG-vel jelöltük. A *C. pneumoniae* inklúziók számát UV mikroszkóp alatt számoltuk meg, és a titeret inklúzióformáló egység (IFU)/ml-ben adtuk meg.

- **Az egerek kortikoszteroid kezelése**

FP és BUD oldására dimethyl sulfoxide(DMSO)-ot használtunk. Az egerek inhalációs kezelése BUD-dal (40 μg , 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) és FP-vel (25 μg , 625 $\mu\text{g}/\text{kg}$) naponta, 15 percen keresztül történt inhalációs kamrában. Az inhalált dózisek ekvivalens koncentrációja korábbi tanulmányok alapján kerültek meghatározásra, ezen cikkekben leírt, az FP prominensebb hatásai miatt, FP:BUD=1:1.6 arányt vettük alapul.

- **Az egerek kezelése és fertőzése**

Kísérleteink során 6-8 hetes nőstény BALB/c egereket vizsgáltunk. Az egereket véletlenszerűen három csoportra osztottuk: a kontroll, a BUD-dal és az FP-vel kezeltre (mindegyik csoportba 16 egér került). Az egerek BUD-ot, FP-t vagy PBS-t inhaláltak a fertőzés előtt három napig, majd a fertőzést követően további hét napig. A 3. napon az egereket intraperitoneális pentobarbitál injekcióval (200 μl , 7.5 mg/ml) altattuk el és 5×10^5 IFU *C. pneumoniae*val fertőztük meg. A 10. napon, azaz a fertőzés után hét nappal az egereket ismételtelen elaltattuk majd feláldoztuk. A tüdőket eltávolítottuk és steril homokkal eldörzsöltük majd homogenizáltuk. A homogenizált tüdők egyik felét a teljes RNS kivonásra készítettük elő, a másik felét 1 ml SPG-ben szuszpendáltuk a visszatenyészthető *C. pneumoniae* kimutatására és a citokin szintek meghatározására. Az állatkísérletek megfeleltek a 2010/63/EU irányelvnek.

- **A *C. pneumoniae* titerének meghatározása egér tüdőkből**

A tüdő szuszpenziókat olvasztottuk, fagyasztottuk, ultrahangoztuk majd belőlük tízes léptékű hígítási sort készítettünk. Az egyes hígításokból 250 μL -t McCoy sejtekre mértünk, majd a lemezt centrifugáltuk (60 perc, 800g). A visszatenyészthető *C. pneumoniae* mennyiségét a már korábban leírt indirekt immunfluoreszcens módszerrel határoztuk meg.

- **RNS kivonás és cDNS szintézis**

A kontroll (n=12) és fertőzött, BUD-dal vagy FP-vel kezelt homogenizált tüdők feléből (n=12 mindkét csoport esetében), teljes RNS kivonást végeztünk TRI reagens alkalmazásával a gyártó utasításai szerint. Az így kapott RNS koncentrációját és az RNS tisztaságát NanoDrop spektrofotométerrel határoztuk meg. Ezt követően cDNS szintetizálásra 2 μg teljes RNS-t, Maxima First Strand

cDNS Synthesis Kit-et és 20 pM random hexamer primert használtunk 20 μ L pufferben.

- **qPCR mérések**

A qPCR vizsgálatokat Bio-Rad CFX96 készülék segítségével, SsoFast™ EvaGreen® qPCR Supermix és egér specifikus primer párokkal végeztük. A küszöbértékek (Ct) meghatározása után, az IDO1, IDO2, TDO, IFN- γ , MIG/CXCL9, IP10/CXCL10, ITAC/CXCL11, VDR, és GR relatív géneexpressziójának meghatározása történt, egy háztartási génhez (β -actin) viszonyítva. A relatív expressziók kiszámítása a $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ módszerrel történt, mely során a relatív expressziós szintet, mint $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ adtuk meg, ahol a $\Delta\Delta Ct = a$ vizsgált minta ΔCt értékéből kivonva a kontroll minta ΔCt értéke.

- **A tüdők szövettani vizsgálata**

A fertőzött, kezelt és kontroll egerek tüdejének mikroszkópos vizsgálatát haematoxinilin-eozin (HE) festéssel végeztük el. Mindhárom csoportból 4 mintát dolgoztunk fel. A tüdők eltávolítása után az egyes egerek tüdejét azonnal műanyag csövekbe helyeztük, melyek 10% formalint tartalmaztak, így a minta: formalin arány 1:10 volt. A szövettani feldolgozás során a csőben lévő szervmintákat 1 mm vastagságú szeletekre vágtuk, és paraffin blokkokba ágyasztuk. Ezt követően négy mikrométeres metszeteket készítettünk és haematoxinilin-eozin festést végeztünk. A metszeteket fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

- ***C. pneumoniae* antigén előállítás**

A *C. pneumoniae* CWL29 EB-eket fertőzött Hep2-ből tisztítottuk sűrűség grádiens centrifugálással, majd formaldehiddel inaktiváltuk. Az antigén fehérjetartalmát spektrofotometriás módszerrel mértük meg és további felhasználásig -80°C -on tároltuk.

- **PBMC-k szeparálása és stimulációja**

A betegekből nyert 10 ml-es heparinizált vérből származó PBMC-eket Ficoll grádiens segítségével szeparáltuk. A 96-lyukas lemez három párhuzamos lyukaiba 5×10^5 sejtet mértünk, majd 48 órán át inkubáltuk 200 μ l RPMI tápfolyadékban 2 μ g/ml *C. pneumoniae* antigén vagy 10 μ g/ml poliklonális mitogén (fitohemagglutinin, PHA) jelenlétében. A kezelés után 48 órával a stimulált PBMC-k felülcsúzóit begyűjtöttük és -80°C -on tároltuk.

- ***C. pneumoniae*-specifikus antitest meghatározása ELISA módszerrel**

A betegtől és kontroll, egészséges véradókból származó szérumokból *C. pneumoniae*-specifikus antitesteket NovaLisa™ *Chlamydia pneumoniae* ELISA kit segítségével detektáltuk. Az ötvenszeres hígítású szérumokat a gyártó utasításai szerint mértük le.

- **Citokin és kemokin szintek meghatározása egér tüdőkből, valamint stimulált PBMC-k felülúszóiból és betegek szérumából**

A homogenizált tüdőszövetek felülúszóit centrifugáltuk (12000g, 5 perc), és az IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17A, MIG/CXCL-9 ELISA-t a gyártó utasításainak megfelelően végeztük. A MIG/CXCL-9 koncentrációt egér MIG/CXCL-9 ELISA kit alkalmazásával határoztuk meg, az IL-17A-t Quantikine egér IL-17 ELISA kittel mértük. Az IFN- γ , IL-4 és IL-10 koncentrációkat Invitrogen egér ELISA kitekkel detektáltuk. Az IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17A és MIG/CXCL-9 mérések detektálási érzékenységi tartománya a következők voltak: 15-2000 pg/mL, 4-500 pg/mL, 32-4000 pg/mL, 10.9-700 pg /mL, illetve 2.741-2000 pg/ml.

A betegekből nyert stimulált vagy kezeletlen PBMC-k felülúszóit centrifugáltuk (5 perc, 1200 fordulat/perc), és meghatároztuk az IL-10 és a TNF- α koncentrációkat Human Mini ELISA Development kit alkalmazásával, míg az MMP-9 mennyiségét humán MMP-9 ELISA kit segítségével detektáltuk. Az IL-10, a TNF- α és az MMP-9 mérések érzékenységi tartománya: 23-3000, 16-2000, illetve 8.23-6000 pg/mL voltak.

- **Az asztmás betegek jellemzőinek meghatározása**

A vizsgálatba nyolcvan felnőtt, asztmás beteget választottunk be a Mellkasi Betegségek Szakkórháza, Deszk és az SZTE ÁOK Tüdőgyógyászati Tanszék járóbeteg és fekvőbeteg osztályairól. A beválasztási kritériumok között szerepelt a klinikailag stabil asztma, az asztma tüneteinek tartós fennállása, az inhalációs szteroidok használata, akut exacerbáció hiánya és megfelelő beteg gondozás. A kizárási kritériumok között szerepelt a HIV-fertőzés jelenléte, akut vírusos vagy bakteriális fertőzések, krónikus immunszuppresszió vagy autoimmun betegségek, malignitás fennállása, szisztémás intravénás kortikoszteroidok használata (a vizsgálatot megelőző 30 napban) és antibiotikum kezelés (a vizsgálatot megelőző 30 napban). Kontroll csoportként 40 nem asztmás, egészséges véradót választottunk ki obstruktív tüdőbetegség, orrpolipózis, allergiás rhinoconjunctivitis, malignitás, krónikus szívbetegség, autoimmun betegségek és immunszuppresszió nélkül. A betegek demográfiai és klinikai jellemzőit az ellátó intézmény elektronikus rendszeréből gyűjtöttük ki. A citokin termelés vizsgálatához 5 mL natív és 5 mL heparinizált vért vettünk minden betegtől. Az asztmás betegek vérmintáinak összegyűjtése előtt poszt-bronchodilatátor spirometriát végeztünk, mely során 400 μ g szalbutamol inhalálása után a dinamikus tüdőterfogatok határoztuk meg (FEV1, FVC, FEV1/FVC, FEF25/75).

4. Eredmények

- **FP csökkenti a *C. pneumoniae* replikációját A549 sejtekben**

A *C. pneumoniae* szaporodását fertőzött, kezelt és kontroll sejtekben direkt PCR-rel értékeltük, mely során meghatároztuk az egyes küszöbértékeket (Ct). Az FP kezelést követően szignifikánsan magasabb Ct értékeket mértünk, mely csökkent *C. pneumoniae* szaporodásra utalt összehasonlítva a BUD-dal kezelt (32.35 ± 0.51 vs. 30.81 ± 0.55 , $p < 0.01$) illetve a nem kezelt, kontroll sejtekkel (32.35 ± 0.51 vs. 31.41 ± 0.39 , $p < 0.01$).

- **FP csökkentette a visszatenyészthető *C. pneumoniae* mennyiségét fertőzött egerek tüdejében**

A visszatenyészthető *C. pneumoniae* mennyiségét indirekt immunfluoreszcenciával határoztuk meg, mely során az FP kezelt, fertőzött egerek tüdejéből szignifikánsan kevesebb *C.pneumoniae* detektáltunk, összehasonlítva a BUD-dal kezelt és a kontroll csoporttal ($p < 0.001$).

- **FP és BUD szövettani hatása a *C. pneumoniae* fertőzött tüdőkben**

A haematoxilín-eozinnal (HE) festett egér tüdőszövetekben a kontroll és a BUD-dal kezelt mintákban a háttér kékes festődésében különbség mutatkozott, amely kiterjedt limfoid infiltrációt jelzett. Hasonlóképpen, az FP-vel kezelt egér tüdőszövetekben limfocita és plazmacita infiltrációt figyeltünk meg; ezenkívül centriacinaris emphysema vékony alveoláris septumokkal is látható volt.

- **A FP és BUD kezelés hatásai az IFN- γ és általa indukált gének illetve a kortikoszteroid válaszban szerepet játszó gének relatív expressziójára *C. pneumoniae* fertőzött egértüdőkben**

Kimutattuk, hogy az IFN- γ relatív expressziója szignifikánsan megnőtt az FP-vel kezelt egerekben ($p < 0.001$) a BUD-dal kezelt és a kontroll egerekhez képest. Eredményeink szignifikánsan fokozott IDO2 expressziót mutattak az FP-vel kezelt egerekben, a kontroll és a BUD-kezelt csoporthoz hasonlítva ($p < 0.05$). Továbbá azt tapasztaltuk, hogy a BUD szignifikánsan csökkentette a MIG/CXCL9 ($p < 0.05$) és az IP-10/CXCL10 ($p < 0.01$) expresszióját a kezeletlen, *C. pneumoniae* fertőzött kontroll egerekhez képest. Eredményeink alapján a FP kezelés szignifikánsan növelte a VDR expressziót, összehasonlítva a kontroll és a BUD kezelt egerekkel ($p < 0.01$), míg a BUD kezelés nem befolyásolta a VDR expressziót.

- **A FP fokozza az anti-chlamydiás IFN- γ és MIG/CXCL9 fehérje termelését**

Eredményeink alapján az IFN- γ termelése szignifikánsan emelkedett volt FP kezelést követően, összehasonlítva a nem kezelt, kontroll egerekkel ($p < 0.05$). Az FP kezelt egerek tüdejében szignifikánsan emelkedett MIG/CXCL-9 fehérje szinteket

mértünk, összevetve a nem kezelt, kontroll illetve a BUD-dal kezelt egerekkel ($p < 0.01$).

- **A FP és a BUD hatása a Th17 és a Th2 citokinek termelésére *C. pneumoniae* fertőzött egér tüdőkbén**

A FP-vel kezelt egerek tüdejében szignifikánsan magasabb IL-17A szinteket mértünk a kontroll egerekéhez képest ($p < 0.01$). A kezelések az IL-4 termelését nem változtatták meg jelentős mértékben, azonban, az IL-10 mennyisége szignifikánsan több volt a FP-vel kezelt egerek tüdejében, összehasonlítva a BUD-dal kezelt illetve a kontroll egerekkel ($p < 0.05$).

- **A vizsgált betegek klinikai és demográfiai jellemzői**

40 szteroid-érzékeny asztmás beteget (65% nő, 35% férfi, átlagéletkoruk 59 év) és 40 szteroid-rezisztens asztmás beteget (68% nő, 32% férfi, átlagéletkor 63 év) vizsgáltunk. A szteroid-rezisztens csoport átlagos FEV1 értéke $56\% \pm 0.2\%$ volt, mely szignifikánsan különbözött a szteroid-érzékeny csoporthoz képest, ahol az átlagos FEV1 érték $72\% \pm 0.22\%$ ($p = 0.01$). Kontroll csoportként 40 egészséges véradót vizsgáltunk.

- **Az asztmás betegek *C. pneumoniae* szerostátusz vizsgálata**

A kontroll csoport 67%-os *C. pneumoniae* IgG szeropozitivitási arányt mutatott. Ezzel ellentétben, alacsonyabb *C. pneumoniae* szeropozitivitási arányt figyeltünk meg az asztmás betegeknél, mint a kontroll véradóknál. Asztmás betegek körében a szteroid-érzékenyek 42%-a és a szteroid-rezisztens résztvevők 47%-a volt *C. pneumoniae* IgG-pozitív.

- **Az asztmás betegek IL-10 termelésének vizsgálata specifikus (*C. pneumoniae*) és nem specifikus fitohemagglutinin (PHA) stimulációra**

Szteroid-rezisztens és -érzékeny asztmás betegekből nyert PBMC-eket *C. pneumoniae* antigénnel vagy egy poliklonális mitogénnel, a PHA-val stimuláltuk; vagy nem kezeltük őket. A *C. pneumoniae* szeropozitív, szteroid-érzékeny betegek kezeletlen PBMC-je szignifikánsan nagyobb mennyiségű IL-10-et termeltek, mint a *C. pneumoniae* pozitív, nem asztmás véradók ($p = 0.04$). Ugyanezt a tendenciát figyeltük meg a szeropozitív szteroid-rezisztens csoportban is, vagyis a PBMC-jük spontán nagyobb mennyiségű IL-10-et termeltek, mint a szeropozitív, nem asztmás véradók ($p = 0.0002$). A szteroid rezisztencia tekintetében összehasonlítottuk az IL-10 termelést *C. pneumoniae* szeropozitív és szeronegatív asztmásokban, mely során szeropozitivitás esetén a szteroid-rezisztens betegeknél szignifikánsan magasabb az IL-10 citokin termelése, mint a szeronegatív egyének esetében ($p = 0.02$).

- **Asztmás betegek TNF- α termelésének vizsgálata**

Az asztmás betegekből izolált PBMC-k nagyobb mennyiségű TNF- α -t termeltek stimuláció nélkül, mint a nem asztmások véradók esetében, azonban ezek a

különbségek nem értek el a szignifikancia határát. A *C.pneumoniae* szeropozitív szteroid-rezisztens betegek PBMC-i spontán szignifikánsan nagyobb mennyiségű TNF- α -termeltek, mint a szeropozitív szteroid-érzékeny betegek (0.23 ± 0.16 ng/mL vs. 0.08 ± 0.06 ng/mL, $p=0.05$).

- **Szteroid-érzékeny és szteroid-rezisztens asztmás betegek MMP-9 termelésének vizsgálata**

Az MMP-9 szérumban mérhető szintjét *C. pneumoniae* szeropozitív és szeronegatív szteroid-érzékeny és szteroid-rezisztens asztmásokban vizsgáltuk. Jelentős különbséget figyeltünk meg a szérumban MMP-9 szintekben a szteroid-rezisztens betegek között. A *C. pneumoniae* szeronegatív betegeknél az MMP-9 szérumban szintje szignifikánsan magasabb volt, összehasonlítva a *C. pneumoniae* szeropozitív asztmásokban észlelhetővel ($p=0.01$). A *C. pneumoniae* szeronegativitással összefüggésben, szignifikánsan magasabb MMP-9 szintet találtunk a szteroid-rezisztens betegek szérumban, mint a szteroid-érzékeny betegek esetében ($p=0.04$).

5. Megbeszélés

- **1. Az inhalációs kortikoszteroidok hatásai *C. pneumoniae* fertőzésben *in vitro* és *in vivo* egér modellben**

Kísérleti eredményeink számos új eredményt tártak fel, amelyek gyakorlati jelentőséggel bírhatnak a gyakorló orvosok számára is. Az *in vitro* eredményeink alapján a FP csökkentette a *C. pneumoniae* szaporodását légúti epithél sejtekben, ezért hipotézisünket, hogy az FP gátolhatja-e a *C. pneumoniae* növekedését, teszteltük *in vivo*, egér modellben. Kísérleteink során az FP kezelés csökkentette a visszatenyészhető *C. pneumoniae* mennyiségét, ellentétben a BUD-dal. Mivel az IFN- γ anti-chlamydiás hatással bír, kísérleteink során az IFN- γ és az IFN- γ indukált mechanizmusokat vizsgáltuk. Az IFN- γ fokozza azIDO aktivitást, mely következményeképpen csökken a triptofán mennyisége. Mivel a Chlamydiák triptofán-auxotrófok, a fokozott IDO-aktivitás gátolja a Chlamydiák szaporodását mind *in vitro* és *in vivo*. Ezenkívül az IFN- γ fokozza a veleszületett immunitásban szerepet játszó gének expresszióját, így tovább hozzájárulva a Chlamydia fertőzéseket gátló mechanizmusokhoz. Eredményeinkből kiderült, hogy az FP nemcsak a transzkripció szintjén, hanem a fehérje szinten is jelentősen indukálja az IFN- γ -t, ellentétben a BUD-dal. Eredményeink azt mutatták, hogy a MIG/CXCL9 fehérje termelődése az IFN- γ -val párhuzamosan emelkedett FP kezelést követően, összehasonlítva a kezeletlen kontroll és a BUD-dal kezelt egér tüdővel. Az FP nem változtatta meg az IFN- γ -indukálható kemokinek expresszióját, ami arra utal, hogy más mechanizmusok is szerepet játszhatnak a kemokinek expressziójában. A BUD kezelés szignifikánsan csökkentette a CXCL-10 és a CXCL-11 génextpresszióját,

mely nem volt megfigyelhető FP esetén. Következésképpen, az ICS kezelések eltérő hatással vannak az IFN- γ válaszra és a kemokin termelésre, valamint a génextpresszióra is.

A már említett IDO aktivitást, mely a triptofán depléciójával jár, az FP génextpresszió szintjén fokozta, ez a jelenség a kontroll és a BUD-dal kezelt egerekben nem volt megfigyelhető. Továbbá, a FP fokozta az IL-10 termelését is, mely a másik két csoportban nem volt detektálható. Korábbi vizsgálatok szerint, a FP *in vivo* növelheti az IL-10 lokális szekrécióját ezáltal IDO aktivitást növelheti. Kísérleteink felvetik, hogy a megfigyelt IDO aktivitás származhatott az IFN- γ és az IL-10 additív hatásaiból.

Kísérleteink eredménye szerint az FP-vel kezelt egerek szignifikánsan több IL-17A-t termeltek *C. pneumoniae* fertőzést követően, mely arra utalhat, hogy az IL-17A fokozott termelődése a *C. pneumoniae* gátlásához hozzájárulhat, hiszen, amint azt egy korábbi tanulmány is közölte, az IL-17A szinergizálhat az IFN- γ -val és így szerepet játszhat a Chlamydia fertőzés eliminálásában.

Végül elemeztük a GR és VDR relatív expresszióját, és azt találtuk, hogy az FP kezelés szignifikánsan növelte a VDR génextpresszióját a kontroll és a BUD kezelt egerekhez képest. Egy korábbi kísérlet során a VDR a Chlamydia-fertőzött egér epithél sejtekben az egyik legnagyobb mértékben downregulált gének köze tartozik, ami arra utal, hogy jelen kísérletünkben a megnövekedett VDR génextpresszió vélhetően a FP hatásának volt tulajdonítható.

• 2. A *C. pneumoniae* hatásainak vizsgálata szteroid-érzékeny és szteroid-rezisztens asztmás betegekben

Feltételeztük, hogy egy korábbi *C. pneumoniae* fertőzés hatással van az asztmás betegek IL-10 termelésére. Szteroid-rezisztens és szteroid-érzékeny betegek PBMC-jeinek citokin termelését vizsgáltuk specifikus és nem specifikus stimulációt követően. A *C. pneumoniae* szeropozitív betegek kezeletlen PBMC-je magasabb IL-10 termelést mutatott, mint a kontrolloké. Eredményeink azt mutatták, hogy a megnövekedett IL-10 termelődés a PBMC-kből származnak, mely felveti, hogy a PBMC-k citokin termelésének szerepe lehet az asztma patogenezisében. A *C. pneumoniae* szeropozitív csoportokban nagyobb spontán IL-10 szekréciót észleltünk szteroid-rezisztens asztmásoknál, mint szteroid-érzékeny betegek esetében. Ezenkívül a szteroid-rezisztens *C. pneumoniae* szeropozitív asztmások PBMC-k kezeletlenül és *C. pneumoniae* stimuláció során szignifikánsan magasabb IL-10 választ produkáltak, mely azt az elgondolást bizonyítja, hogy a *C. pneumoniae* fertőzés hozzájárulhat a megváltozott IL-10 termeléshez szteroid-rezisztens asztmásokban. Ezen eredményeink támogatják azt a tudományos irodalomban leírt elméletet, hogy pozitív

összefüggés van a betegség súlyossága és az IL-10 szintek között asztmás betegek körében.

A szteroid-rezisztens betegek PBMC-jei spontán szignifikánsan magasabb TNF- α -t termeltek, mint a szteroid-érzékeny betegeké, azonban *C. pneumoniae* stimuláció alatt nem észleltünk szignifikáns különbségeket egészséges véradók, szteroid-érzékeny és szteroid-rezisztens asztmások között.

Jelen tanulmányunkban az asztmás betegek szérumában mérhető MMP-9 szinteket is meghatároztuk a *C. pneumoniae*-specifikus IgG szerostátusszal és a szteroid válaszkészséggel összefüggésben. Kiemelendő, hogy a szteroid-rezisztens *C. pneumoniae* szeropozitív betegek MMP-9 szintje alacsonyabb volt, mint a szeronegatív betegeké. Összefoglalva, kísérleteink során az asztmás betegek új, eddig nem közölt immunológiai jellemzőit vizsgáltuk, mely felveti annak a lehetőségét, hogy egy korábbi fertőzés befolyásolhatja az asztma mechanizmusait.

6. Összefoglalás

A *C. pneumoniae* egy széles körben elterjedt intracelluláris baktérium, mely szerepet játszik az obstruktív tüdőbetegségek patogenezisében, főként az asztma kialakulásával és exacerbációjával hozták összefüggésbe. Az elmúlt években az asztma kezelése jelentős mértékben megváltozott, a citokin és eosinophil sejtek elleni biológiai terápiák alkalmazásával. A hatályos asztmára vonatkozó nemzetközi és hazai irányelvek alapján az asztma kezelése első lépésben az inhalált kortikoszteroidokra (ICS) és azok kombinációira korlátozódik. Bár a betegek az előírt ICS terápiájukat otthonukban önállóan használják, mégis ezen inhalációs gyógyszerek alkalmazására kiemelt figyelmet érdemes fordítani, hiszen előnyös vagy akár káros hatásuk a különböző légúti fertőzésekre mai napig nem nyert egyértelmű bizonyítást. Az ICS-k használata és a tüdőgyulladás közötti összefüggéseket intenzíven vizsgálták, de az adatok továbbra is ellentmondásosak, mivel az ICS-ek különböző immunmoduláló hatásokkal bírnak, a celluláris immunitás, a citokin és kemokin termelés, valamint az antimikrobiális védekezésben szerepet játszó gének expressziója tekintetében.

Kísérleteink során megvizsgáltuk, vajon a FP és a BUD befolyásolja-e a *C. pneumoniae* növekedését *in vitro*, és azt találtuk, hogy a FP gátolta a *C. pneumoniae* szaporodását, ellentétben a BUD-dal. Ezt az eredményt alapul véve, a továbbiakban kísérletünket egérmódelben folytattuk, annak kiderítésére, vajon a FP és BUD hatása között tapasztalt különbség a *C. pneumoniae* szaporodását illetően *in vivo* is kimutatható-e. A fertőzött, FP-vel kezelt egerek tüdejéből a visszatenyészthető *C. pneumoniae* mennyisége szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a BUD-dal kezelt vagy kontroll egerek esetében. További célunk volt, hogy feltárjuk ennek a hatásnak

háttérben lévő lehetséges anti-chlamydiás immun mechanizmusokat génextpresszió és fehérje szinten is. Kísérleteink során szignifikánsan magasabb IFN- γ IDO2 és VDR génextpressziót észleltünk, ami potenciálisan hozzájárulhat az antimikrobiális védekezéshez. Emellett a *C. pneumoniae*val fertőzött és FP-vel kezelt egerekben az IFN- γ és az IFN- γ által indukálható kemokin, a MIG/CXCL-9, illetve az IL-10 és az IL-17 fokozott termelődést mutatott.

Ezt követően, a szteroid-rezisztens és -érzékeny asztmás betegek immunológiai jellemzőit tanulmányoztuk a *C. pneumoniae* szerostátusszal összefüggésben. A szteroid-rezisztens és -érzékeny betegekből nyert perifériás mononuklális sejtek (PBMC) eltérő IL-10 és TNF- α termelést mutattak, a különbség attól függött, hogy az asztmás betegek *C. pneumoniae* szeropozitívak vagy szeronegatívak voltak-e. A betegek számában mért MMP-9 szintekben is szignifikáns eltérések mutatkoztak. Eredményeink alapján a szteroid-rezisztens és szteroid-érzékeny betegekből nyert PBMC-k eltérő citokin termelést mutattak, mely arra enged következtetni, hogy az asztmás betegek között különböző immunfenotípusok különíthetők el.

Összességében, mindkét vizsgálat során nyert adataink számos új eredményt hordoztak a *C. pneumoniae* fertőzés és az asztma kezelése, illetve a szteroid terápiára rezisztens és érzékeny betegek citokin termelésére vonatkozóan, így eredményeink hozzájárulhatnak a további transzlációs asztma kutatáshoz és klinikai terápiás döntésekhez is.

Új megállapítások

A következő eredményeink jelentősek a *C. pneumoniae* és az asztma kutatásban:

- az FP *in vitro* és *in vivo* is csökkentette a *C. pneumoniae* szaporodását;
- az FP fokozta az IFN- γ expresszióját és termelését is, valamint az IDO gén expresszióját és az IFN- γ által indukált MIG/CXCL-9 szekréciót fehérje szinten a *C. pneumoniae*val fertőzött egér tüdőben;
- az FP fokozta az IL-17A termelését, hozzájárulva ezzel a *C. pneumoniae* replikációjának indirekt gátlásához egér tüdőben;
- az FP *in vivo* indukálta a VDR expresszióját, amely további immunmoduláló hatásokat fejthet ki;
- az FP a BUD-hoz képest eltérő módon befolyásolja a *C. pneumoniae* kialakult immunválaszt.
- A szteroid-rezisztens vagy szenzitív asztmában szenvedő betegek PBMC-jei a *C. pneumoniae*val, a poliklonális mitogén történő stimulációra illetve kezelés nélkül eltérő IL-10 és TNF- α termelést észleltünk, melyek a *C. pneumoniae* szerológiai státusz alapján változott.

7. Köszönetnyilvánítás

Mély tisztelettel szeretném kifejezni őszinte hálámat **Dr. Burián Katalinnak**, aki amióta először találkoztunk a mikrobiológiai gyakorlatokon töretlenül biztatott, és energiáját nem kímélve tudását megosztotta velem, így inspirálva a kutatásomat, és a klinikai munkámat is. Jelen doktori értekezésem nem lett volna lehetséges a támogatása és a belém vetett hite nélkül.

Külön köszönetet szeretnék mondani **Müllerné Deák Györgyi és Vigyikánné Váradi Anikó** asszisztenseinknek a kiváló labortechnikai segítségükért.

Rendkívül hálás vagyok a **Mellkasi Betegségek Szakkórházában dolgozó kollégáimnak** a türelmükért és helyettesítéseimért.

Köszönetemet fejezem ki barátomnak és kollégámnak, **Dr. Sejben Anitának** aki nem csak a kutatómunkámhoz de mindennapi problémáimban is segítséget nyújtott.

Köszönetet szeretnék mondani legjobb barátnőmnek, **Marinkov Fabiolának** töretlen támogatásáért, és hogy elviselt amikor a legrosszabb napjaimban elviselhetetlen voltam.

Ezúton szeretném kifejezni őszinte köszönetemet **Dr. Csoma Zsuzsannának**, aki bízva tudásomban, jelölt az ERS SHARP Rising Star programjába, így ösztönözve az asztma kutatásomat és az asztmás betegekkel kapcsolatos munkámat. A Magyar Pulmonológiai Alapítvány vezetőjeként bizalmat szavazott nekem, hogy munkám sikeres lesz, és PhD ösztöndíj formájában munkámhoz anyagi támogatást nyújtott.

Doktori disszertációm a betegeimnek ajánlom, azoknak, akik még köztünk vannak és azoknak, akik már nincsenek velünk. Ráébresztettek arra, hogy mi az életem valódi értéke és megtanították, hogy mi az őszinte emberség. Soha nem fogom elfelejteni őket.

Tézisben szereplő publikációk:

1. **Dóra Paróczai**, Anita Sejben, Dávid Kókai, Dezső P. Virok, Valéria Endrész, Katalin Burián:
Beneficial Immunomodulatory Effects of Fluticasone Propionate in *Chlamydia pneumoniae*-infected Mice
Pathogens 2021, 10(3), 338, Impact factor: 3.018, Q1
2. **Dóra Paróczai**, Tímea Mosolygó, Dávid Kókai, Valéria Endrész, Dezső P. Virok, Attila Somfay, Katalin Burián:
Chlamydia pneumoniae Influence on Cytokine Production in Steroid-Resistant and Steroid-Sensitive Asthmatics
Pathogens 2020 Feb 11;9(2):112, Impact factor: 3.018, Q1

Tézistől független publikációk:

1. József Furák, **Dóra Paróczai**, Katalin Burián, Zsolt Szabó, Tamás Zombori (shared first author):
Oncological advantage of nonintubated thoracic surgery: Better compliance of adjuvant treatment after lung lobectomy
Thorac Cancer 2020 Nov;11(11):3309-3316, Impact factor: 2.610, Q2
2. Dezso P. Virok , Tímea Raffai, Dávid Kókai, **Dóra Paróczai**, Anita Bogdanov, Gábor Veres, László Vécsei, Szilárd Poliska, László Tiszlavicz, Ferenc Somogyvári, Valéria Endrész and Katalin Burián:
Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity in *Chlamydia muridarum* and *Chlamydia pneumoniae*-Infected Mouse Lung Tissues
Front Cell Infect Microbiol 2019 Jun 12;9:192, Impact factor: 4.123, Q1

Tézissel kapcsolatos absztraktok:

1. **Dóra Paróczai**, Dávid Kókai, Katalin Burián:
The effects of inhaled corticosteroids and a beta-2 agonist on *C. pneumoniae*-infected airway epithelial cells
European Respiratory Society (ERS) International Virtual Congress September 7-9, 2020
2. **Paróczai Dóra**, Kókai Dávid, Burián Katalin:
Inhalációs kortikoszteroidok és formoterol lokális hatásai *C. pneumoniae* fertőzött légúti epithel sejtekben
A Magyar Tüdőgyógyász Társaság 61. Nagygyűlése, Pulmonológus Kutatók Fóruma, 2020. 08.29-09.01., Budapest
3. **Dóra Paróczai**, Tímea Mosolygó, Dávid Kókai et al.:
C. pneumoniae serostatus influences cytokine production patterns in steroid resistant and sensitive asthmatics
European Respiratory Society International Congress, Madrid, 28 September- 2 October 2019
4. **Dóra Paróczai**, Tímea Mosolygó, Dávid Kókai et al.:
C. pneumoniae serostatus influences cytokine production patterns in steroid resistant and sensitive asthmatics
European Respiratory Journal 54: Suppl. 63 Paper: PA4395 (2019)

5. **Dóra Paróczai**, Tímea Mosolygó, Dávid Kókai et al.:
C. pneumoniae serostatus influences cytokine production patterns in steroid-resistant and -sensitive asthmatic
EU Respiratory Forum, Paris, 12-13/02/2020
6. **Paróczai Dóra**, Mosolygó Tímea, Kókai Dávid et al.:
Szteroid kezelésre rezisztens és szenzitív asthma bronchiale-ban szenvedő betegek perifériás mononucleáris sejtjeinek vizsgálata (2018)
Magyar Tüdőgyógyász Társaság 60. Nagygyűlése, Pécs 2018.05.23-26.
7. **Paróczai Dóra**, Mosolygó Tímea, Kókai Dávid et al.:
Szteroid-kezelésre rezisztens és szenzitív asthma bronchiale-ban szenvedő betegek perifériás mononucleáris sejtjeinek vizsgálata
Medicina Thoracalis (Budapest) 71: 3 pp. 187-188. (2018)

Tézistől független absztraktok:

1. **Dóra Paróczai**, Dávid Kókai, Áron Ulbert, Gabriella Terhes, Katalin Burián:
Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* antibodies in Southern Hungary
European Respiratory Society (ERS) International Virtual Congress September 7-9, 2020
2. Dávid Kókai; **Dóra Paróczai**; Dezső Virok; Valéria Endrész; Katalin, Burián
Ambroxol possesses an antichlamydial effect *in vitro* and *in vivo*
18th German Chlamydia Workshop 2020 2020-02-05
3. **Paróczai Dóra**, Kókai Dávid, Ulbert Áron, Terhes Gabriella, Burián Katalin:
C. pneumoniae szeroprevalencia vizsgálata a dél-magyarországi régióban (2020)
A Magyar Tüdőgyógyász Társaság 61. Nagygyűlése 2020. 08.29-09.01., Budapest
4. Kókai Dávid, **Paróczai Dóra**, Burián Katalin:
Egy mukolitikum *in vitro* és *in vivo* anti-chlamydiális hatással
A Magyar Tüdőgyógyász Társaság 61. Nagygyűlése Pulmonológus Kutatók Fóruma
2020. 08.29-09.01., Budapest
5. **Paróczai Dóra**, Burián Katalin, Szabó Zsolt, Zombori Tamás, Furák József
Nem intubált thoracoscopos (NITS) lobectomia onkológiai előnye
Bronko, 2020.10.08-10. Székesfehérvár

6. Kókai Dávid, **Paróczai Dóra**, Virok Dezső et al.:
Viscum album tumorelles hatásának vizsgálata
A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2020. évi Nagygyűlése és a XIV. Fermentációs Kollokvium 2020-10-14, Kecskemét
7. **Dóra Paróczai**, Tímea Raffai, Dávid Kókai et al.:
Expression of IDO1-2, iNOS and interferon-inducible GTPases in Chlamydia-infected murine lung
Hungarian Medical Association of America (HMAA) Summer Conference, August 30-31, 2019
8. Dávid Kókai, **Dóra Paróczai**, Dezső Virok et al.:
Growth modulating effect of Hedera helix extract on bacteria
Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 66 Suppl. 1 pp. 156-157., 2 p. (2019)
9. Dávid Kókai, **Dóra Paróczai**, Dezső Virok et al.:
Antimicrobial effect of the commonly used mucolytic agent, ambroxol
Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 66 : Suppl. 1 pp. 52-52. , 1 p. (2019)
10. **Dóra Paróczai**, Edit Csada
Pushing the boundaries: a convincing case in treating CNS metastasis with alectinib
18th CELCC and best of WCLC November 21-23, 2019, Budapest
11. **Paróczai Dóra**
Hepaticus hydrothorax
II. Kraszkó Pál Emlékülés, Harkány, 2019.04. 26-27.
12. **Paróczai Dóra**
Hepaticus hydrothorax
Magyar Tüdőgyógyász Társaság Allergológiai és Légzőszathatólógiai szekciójának tudományos ülése és a fiatal pulmonológusok kazuisztikai fóruma, Hajdúszoboszló, 2019. 03.21-24.
13. Dávid Kókai, **Dóra Paróczai**, Dezső Virok et al.:
Antimicrobial effect of the commonly used mucolytic agent, ambroxol
A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2018. évi Nagygyűlése és a XIII. Fermentációs Kollokvium: Absztraktfüzet, (2018) p. 33

14. **Paróczai Dóra**, Mosolygó Tímea, Kókai Dávid et al.:
Szteroid kezelésre rezisztens és érzékeny betegek citokin profil vizsgálata *C. pneumoniae* szerostatus függvényében
PulmoAkadémia 2018. 11.16-17. Visegrád
15. **Paróczai Dóra**, Burián Katalin:
A D-vitamin hatása *Chlamydia pneumoniae*-val fertőzött egerek tüdejében
Medicina Thoracalis (Budapest) 71:3 pp. 186-187. (2018)