

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Immunmoduláns faktorok vizsgálata
csirke eredetű hepatikus sejtmodelleken**

Dr. Mackei Máté

Témavezetők: Dr. Neogrády Zsuzsanna
Dr. Mátis Gábor



ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
Állatorvostudományi Doktori Iskola

Budapest, 2021.

Témavezetők:

.....
Dr. Neogrády Zsuzsanna CSc,
Élettani és Biokémiai Tanszék, Biokémiai Osztály
Állatorvostudományi Egyetem, Budapest
Témavezető

.....
Dr. Mátis Gábor PhD,
Élettani és Biokémiai Tanszék, Biokémiai Osztály
Állatorvostudományi Egyetem, Budapest
Témavezető

.....
Dr. Mackei Máté

Bevezetés

A nagyüzemi baromfitartás során számos problémát okozhatnak egyes, az állatok immunrendszerére ható környezeti és takarmányozási faktorok, melyek a csirkék egészségi állapotát, és ezáltal a termelékenységet is negatív irányba befolyásolhatják, valamint káros hatást fejthetnek ki a gyulladáso- és stresszválasz lefolyására. Napjaink tudományos eredményeinek ismeretében kijelenthetjük, hogy a globális felmelegedés az emberiséget és az ökoszisztémát olyan kihívások elé állítja, melyekre hosszú idő óta nem volt példa a Földön. A jövőben várhatóan egyre gyakrabban fordulhatnak elő erőteljes és ismétlődő hőhullámok, egyenlőtlené válhat a csapadékeloszlás, valamint hirtelen bekövetkező, özvívyszerű esőzések mellett jelentős aszályokra is számíthatunk. A fent említett változások erőteljes hatással lehetnek a mezőgazdaságra is, így a haszonállatainkat egyre gyakrabban érő hőstressz, valamint a különböző termények és takarmányok mikotoxinokat termelő penészgombákkal való szennyezettsége is számos káros következménnyel járhat az állategészségügy és az élelmiszeripar területén egyaránt. A fent említett faktoroknak való kitettség komoly veszélyt jelent számos haszonállat, így a brojlercsirkék egészségi állapotára és jóllétére, amely nemcsak a termelési hatékonyság romlásához vezet, de növeli az állatok különféle komplex kóroktanú, multifaktoriális betegségekkel szembeni fogékonyságát is. Bár ismert tény, hogy a máj kifejezetten és fokozottan érzékeny szervnek tekinthető a fent említett stresszorokkal szemben, valamint központi szerepet játszik a metabolikus- és redox-homeosztázis fenntartásában, a hőstressz és a mikotoxinok károsító hatásainak pontos, sejtszintű mechanizmusai máig sem teljesen tisztázottak.

A hőstressz számos szerv, köztük a máj, a lép, és a vese működésének zavarához vezethet. Már a hőmérséklet néhány fokkal történő emelkedése is, különösen, ha a folyamat magas páratartalommal társul, súlyos károkat okozhat a sejtekben található fehérjék, zsírok és nukleinsavak szerkezetében, valamint a metabolikus folyamatokban betöltött szerepében egyaránt. A hőstressz sejtszintű hatásainak minél alaposabb megismerése elősegítheti különféle protektív hatású, takarmánykiegészítőként is alkalmazható hatóanyagok, vagy gyógyszerek fejlesztését a brojlerágazatban, melyek segítségével megelőzhetővé válnának az említett káros hatások.

A magas hőmérsékletnek való kitettség egy specifikus védelmi mechanizmust, a hősokkválaszt (heat shock response, HSR) aktiválja, melynek feladata a sejtszintű homeosztázis megőrzése különféle jelpályák és metabolikus útvonalak komplex szabályozásán keresztül. A HSR-rel gyakran együtt jár az oxidatív stressz, amely főleg reaktív oxigéngyökök (reactive oxygen species, ROS) fokozott termelődése révén alakul ki, és a hőstressz egyik legkomolyabb következménye lehet. A megemelkedett ROS termelés károsíthatja az antioxidáns védelmi rendszert, amely lipidperoxidációhoz, s ezáltal

malondialdehid (MDA) termelődéshez, illetve a fehérjék oxidatív károsodásához, és protein-karbonil származékok kialakulásához vezethet.

A fehérjék stabilitását a túlzottan magas hőmérséklet jelentős mértékben befolyásolja, ezért kiemelt jelentőséggel bír konformációjuk megtartásának biztosítása, illetve a nem natív fehérjék aggregációjának megakadályozása. A hősokkfehérjék (heat shock proteins, HSP), mint protektív molekulák fontos szerepet töltenek be a különféle fiziológias folyamatok stresszreakció alatti fenntartásában, valamint szükségesek a HSR-ben létrejövő sejtszintű válaszok szabályozásában. Az olyan, széleskörben vizsgált HSP-ken kívül, mint a HSP70 és HSP90, az úgynevezett kisméretű hősokkfehérjék (small heat shock proteins, sHSP) szintén nagy jelentőséggel bírnak a védelmi mechanizmusok biztosításában, valamint a sejtek különféle stresszorokhoz történő adaptációjában, a normál sejtműködés fenntartásában betöltött szerepük viszont pontosan, a mai napig sem ismert. Azonban az már számos kutatásban leírásra került, hogy a hőstressz, mint immunmoduláló faktor, képes befolyásolni egyes pro-inflammatorikus citokinek génexpresszióját és koncentrációját.

A takarmány mikotoxinokkal való szennyezettsége szintén nagy jelentőséggel bír a nagyüzemi baromfitartás során. A trichotecén vázas mikotoxinok csoportjának egyik legkárosabb tagja, a T-2 toxin a baromfi takarmányába vagy a gabonaalapú élelmiszerekbe kerülve nem csupán az állatok, de az ember egészségét is károsíthatja, ezáltal jelentős közegészségügyi kockázattal is bír. Bár a madarak az emlősökhöz képest viszonylag toleránsok a mikotoxinokkal szemben, azonban a T-2 toxin a baromfitartásra és -takarmányozásra is komoly veszélyt jelent. Habár számos kutatás vizsgálta a T-2 toxin hatásait baromfifélékben, még így is rengeteg megválaszolatlan kérdés maradt a molekuláris szintű hatásmechanizmusukkal, illetve az egyes fajok közti különbségekkel kapcsolatban. A kutatások jelentős része szerint a T-2 toxin nagymértékben fokozhatja a ROS termelődését, ezáltal befolyásolva a sejtek antioxidáns státuszát. Másrésztől azonban egyes kutatásokban a súlyos sejtkárosító hatás mellett a fokozott mértékű oxidatív stressz nem volt kimutatható. Emellett ismert, hogy néhány HSP, mint a HSP70 befolyásolhatja a különféle toxikus hatások mérséklésére aktiválódó sejtvédő mechanizmusokat, azonban olyan további kérdések, mint pl. a trichotecének hatása a HSP-k expressziójára máig sem teljesen tisztázott.

A fenti ismeretek alapján megállapítható, hogy a magas környezeti hőmérséklet és a mikotoxinok okozta májkárosodás kritikus következményekkel járhat az egész szervezet számára, hiszen a máj központi szerepet játszik a tápanyagok és xenobiotikumok metabolizmusában, valamint a legfontosabb anyagcsere-folyamatokban. A különféle sejtípusok, különösképp a stressz- és gyulladásszerű reakciók szabályozásában fontos szerepet betöltő hepatociták és nem-parenchymális (NP) sejtek (nagyraoszt makrofágok) molekuláris szintű szerepének vizsgálata számos hasznos információval szolgálhat a stresszel összefüggésbe hozható multifaktoriális megbetegedések patomechanizmusáról, továbbá hozzájárulhat az állatok egészségének javításához, és ezáltal a termelés hatékonyságának növeléséhez.

Anyag és módszer

Csirke eredetű primer hepatocita mono-kultúra és hepatocita – nem - parenchimális sejt ko-kultúra modellek létrehozása és jellemzése (I. kísérlet)

Az **I. kísérlet** során a sejtek izolálására 3 hetes, hímivarú Ross 308 brojlercsirkék májából került sor. Az állatok dekapitálása után a *vena gastropancreaticoduodenalis-on* keresztül valósult meg a máj többlépcsős perfúziója. Kollagenáztartalmú pufferrel való emésztés után, a Glisson-tokot felnyitva történt meg az elsődleges sejtszuszpenzió kinyerése, melyet a májsejtek és a nem-parenchimális sejtek elkülönítése érdekében több lépcsős differenciáló centrifugálás követett.

A sejtenyészeteket előzetesen I. típusú kollagénnel bevont tenyésztőedények felületén alakítottuk ki. Elsőként az NP sejtek lerakása történt meg, melyek hozzávetőlegesen 20 perc alatt letapadtak a sejtenyésző edény felszínére. Ezt követően, a hepatocita – NP sejt ko-kultúrák létrehozásához a letapadt NP sejtekhez 6:1 sejtarányt kialakítva (hepatocita:NP sejt) hozzáadtuk a májsejteket. A hepatocita mono-kultúrák kialakításakor a májsejtekben gazdag frakciót raktuk le sejtenyésző edényekre, NP sejtek jelenléte nélkül. A sejt kultúrák inkubációja 38,5°C-on, 5%-os CO₂ koncentráció mellett történt. A tápfolyadékot 4 órával a lerakás után cseréltük, majd 24 óra elteltével kialakultak az összefüggő tenyészetek.

A sejtenyészetek morfológiájának pontos meghatározása a lerakást követően 48 órával, Giemsa festéssel történt, illetve az egyes sejt típusok jelenlétének és arányának meghatározását csirkespecifikus ellenanyagok felhasználásával immuncitokémiai vizsgálatokkal végeztük. Az albumin kimutatása csirkespecifikus, fluoreszcéin-izotiocianáttal (FITC) konjugált antitestek segítségével történt meg, míg a NP sejtfrakcióban található makrofágokat csirke makrofág specifikus fikoeritrinnel (PE) kapcsolt ellenanyaggal jelöltük. Mindezek mellett a hepatocitákat és az NP sejteket tartalmazó frakciók behatóbb vizsgálatára az áramlási citometria módszere szolgált.

A hőstressz és a T-2 toxin sejtszintű hatásainak vizsgálata csirke eredetű májsejttenyészeteken (II. és III. kísérlet)

A II. és a III. kísérlet során a sejtzölálást és a sejttenyésztést az I. kísérlet esetében leírtak alapján végeztük. A II. kísérletben 24 órás tenyésztést követően a hőstressz sejtszintű hatásainak nyomon követése érdekében az összefüggő mono- és ko-kultúrákat 43°C-on 1, illetve 2 órán keresztül inkubáltuk, míg a kontroll sejteket továbbra is 38,5°C-on tartottuk. A III. kísérlet során a sejtek kezelése különböző koncentrációjú T-2 toxinnal történt. A vizsgálat során a tápfolyadékokat 0 (kontroll), 10, 100 és 1000 nmol/l koncentrációjú T-2 toxinnal egészítettük ki, az alkalmazott kezelési idő pedig 8 és 24 óra volt.

A kezelések után mindkét kísérlet során mintát vettünk a tenyésztőedények tápfolyadékából, amit a sejtek, Mammalian Protein Extraction Reagent (M-PER) lízis pufferrel történő emésztése követett. A mintákat a későbbi vizsgálatok elvégzéséig -80°C-on tároltuk. A kezelések sejtszintű hatásainak nyomon követése érdekében CCK-8 teszttel mértük azok metabolikus aktivitását, illetve a tápfolyadék LDH aktivitásának mérésével határoztuk meg a sejtelhalás mértékét. Az extracelluláris H₂O₂ koncentrációt Amplex Red módszerrel vizsgáltuk, míg a HSP70, IL-6 és IL-8 szintjének meghatározása csirkespecifikus szendvics ELISA tesztek segítségével történt meg.

Az akut hőstressz következményeinek vizsgálata csirkék parenchimaszerveiben *in vivo* körülmények között (IV. kísérlet)

A kísérlethez falhasznált egynapos, hímvárú Ross 308 brojlercsirkéket szalma almon, csoportosan helyeztük el. A környezeti feltételek és a tartás körülményei a munka teljes idejében - a kezelési nap kivételével - a Ross technológia követelményeinek megfelelően kerültek beállításra.

Az állatok takarmányozása és itatása *ad libitum* módon, 3 fázisban, a tenyésztői utasításoknak megfelelően történt. A csirkék ellátása és kezelése megfelelt a nemzeti és nemzetközi szakmai előírásoknak, törvényeknek, illetve az intézményi irányelveknek. Az állatok 27 napos korban, véletlenszerűen kiválasztva, 3 különböző csoportra osztva, egyedi ketrecekbe kerültek (n=8/csoport). A 32. napon az állatokat 37°C-os hőmérsékletnek és 50%-os relatív páratartalomnak (hőmérséklet-páratartalom index = 88) tettük ki 4, illetve 8 órán keresztül. A kontroll csoportban a környezeti tényezők változatlanul megfeleltek a tenyésztői előírásoknak (22 ± 1°C). A kezeléseket követően megmértük a kloákahőmérsékletet, majd az állatokat szén-dioxidos narkózist követően dekapitáltuk, amit mintavétel követett a máj bal lebenyéből, a lépéből, illetve a vese bal caudalis divíziójából. A mintákat szárazjégben sokkfagyasztottuk, majd azokat felhasználásig -80°C-on tároltuk.

A laboratóriumi analízis előtt a szövetmintákat jégen felolvasztottuk, majd Tissue Protein Extraction Reagent (T-PER) lízis pufferben, Potter-Elvehjem szövethomogenizátor segítségével homogenizáltuk. Ezt követően a homogenizátumokat centrifugáltuk (5000xg 10 perc), és a további méréseket a felülúszóból végeztük. A minták összfehérje-

koncentrációját Pierce Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay módszer segítségével határoztuk meg. Az MDA, a protein-karbonilok és a redukált glutation koncentrációját, illetve a glutation-peroxidáz aktivitását specifikus kolorimetriás tesztekkel mértük. Csirkespecifikus ELISA kitek felhasználásával vizsgáltuk továbbá a HSP27, az α A-crystallin és az α B-crystallin koncentrációjában bekövetkezett változásokat.

Statisztika

A csoportok közötti különbségeket egytényezős varianciával (ANOVA) és Dunett-féle post hoc tesztekkel határoztuk meg a páronkénti összehasonlítás érdekében. A különféle változók közötti kapcsolatokat Pearson-féle korrelációs teszttel állapítottuk meg. A különbségeket $P < 0,05$ szintnél tekintettük szignifikánsnak.

Célkitűzés

Összefoglalva, a PhD munka legfőbb céljai:

Ad 1. Új típusú, eddig még nem létrehozott, csirke eredetű hepatocita – nem-parenchimális (NP) sejt (túlnyomórészt Kupffer-sejt) ko-kultúrák kialakítása.

Ad 2. Az akut hőstressz immunmoduláns, valamint metabolikus és oxidatív folyamatokra gyakorolt hatásainak vizsgálata a kialakított sejtenyészetek segítségével, *in vitro* körülmények között.

Ad 3. A T-2 toxin által okozott májkárosító hatások vizsgálata *in vitro*, beleértve a metabolikus aktivitást, egyes interleukinok koncentrációját, valamint a redox homeosztázist érintő változásokat.

Ad 4. Információk gyűjtése az akut hőstressz parenchimás szervekre (máj, lép, vese) gyakorolt hatásaival kapcsolatban csirkében, különös tekintettel az oxidatív stressz és az sHSP-k kiemelt szerepére.

Annak érdekében, hogy választ keressünk a fent említett kérdésekre, az alábbi kutatási terv került kidolgozásra:

Kísérlet	Felhasznált sejtenyészet/állatfaj	Tudományos kérdés	Vizsgált paraméterek
I.	Csirke eredetű hepatocita mono-kultúrák és hepatocita – nem-parenchimális sejt ko-kultúrák (<i>in vitro</i>)	Új típusú, csirke eredetű hepatikus sejtmódellek kialakítása és jellemzése	Az izolált sejtek immuncitokémiai és áramlási citometriai vizsgálatokkal történő jellemzése
II.	Csirke eredetű hepatocita mono-kultúrák és hepatocita – nem-parenchimális sejt ko-kultúrák (<i>in vitro</i>)	A hőstressz hatásainak vizsgálata csirke eredetű májmodelleken	Metabolikus aktivitás, extracelluláris LDH aktivitás, extracelluláris H ₂ O ₂ , HSP70, IL-6 és IL-8 koncentrációja
III.	Csirke eredetű hepatocita mono-kultúrák és hepatocita – nem-parenchimális sejt ko-kultúrák (<i>in vitro</i>)	A T-2 toxin hatásainak vizsgálata csirke eredetű májmodelleken	Metabolikus aktivitás, extracelluláris H ₂ O ₂ , HSP70, IL-6 és IL-8 koncentrációja
IV.	Brojlercsirke (<i>in vivo</i>)	A kistömegű hősokkfehérjék szerepének vizsgálata akut hőstressz során brojlercsirkében	MDA, protein-karbonil, glutation, HSP27, α A-crystallin, α B-crystallin koncentráció, glutation-peroxidáz aktivitás (máj, lép, vese szövetminta)

Eredmények és diszkusszió

Csirke eredetű primer hepatocita mono-kultúra és hepatocita – NP sejt ko-kultúra modellek létrehozása és jellemzése (I. kísérlet)

A kutatás első fázisában sikeresen hoztunk létre különféle új, csirke eredetű primer hepatikus sejtmodelleket (**I. kísérlet**). Az elkülönített sejtfrakciókon végzett áramlási citometriai és immuncitokémiai vizsgálatok eredményei alapján csak hepatocitákat tartalmazó mono-kultúrák, valamint hepatocitákat és nem-parenchimális sejteket tartalmazó ko-kultúrák kerültek kialakításra. Ahogy azt immuncitokémiai vizsgálataink is megerősítették, az NP sejtfrakció túlnyomórészt makrofágokat tartalmaz, melyek főképpen, mint a máj rezidens makrofágjai, Kupffer-sejtek, illetve kisebb mennyiségben keringésből származó sejtek. Ennek ellenére azonban a sejtfrakcióban kis számban egyéb NP sejtípusok jelenléte (csillagsejtek, valamint biliáris epithél sejtek) is feltételezhető.

Jelenlegi tudásunk szerint a fentihez hasonló, csirke eredetű májtmodell eddig nem került kialakításra. Ebből kifolyólag az újonnan létrehozott sejtmodelleink egyedülálló és hiánypótló kutatások elvégzését tehetik lehetővé a parenchimális és NP sejtek különböző folyamatokban betöltött specifikus szerepének vizsgálatában. Továbbá, a hepatocita és NP sejtfrakciók arányának változtatásával és pontos beállításával különböző fokú gyulladásos folyamatok is modellezhetővé válhatnak. Az általunk alkalmazott 6:1 sejtarány (hepatocita:NP sejt) egy enyhébb fokú, mérsékelt hepatikus makrofág migrációval kísért gyulladásos májtmodellnek tekinthető. A ko-kultúrák jól alkalmazhatóak lehetnek egyes gyulladásos- vagy stresszválasszal kapcsolatos folyamatok molekuláris szintű elemzésére, valamint különféle sejtfunciókkal kapcsolatos vizsgálatok elvégzésére is. Ennek megfelelően megbízhatóan nyomon követhetőek például a pro- és anti-inflammatorikus citokinek szintjén, valamint a redox-homeosztázisban bekövetkező változások egyaránt.

A hőstressz sejtszintű hatásainak vizsgálata csirke eredetű májsejttenyészeteken *in vitro* (II. kísérlet)

Az újonnan kialakított csirke eredetű májsejttenyészetek megfelelő és megbízhatóan alkalmazható modellrendszernek bizonyultak a hőstressz sejtszintű hatásainak vizsgálata céljából. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a rövidebb távú hőstressznek való kitettség (1 óra) nagyban befolyásolta a vizsgált sejtenyészetek állapotát. A kezelés hatására intenzíven nőtt a sejtek metabolikus aktivitása és a H_2O_2 koncentrációja, miközben szignifikánsan alacsonyabb HSP70, IL-6 és IL-8 koncentráció volt mérhető. A fentiekkel szemben a hosszabb ideig tartó, 2 órás kezelési időt követően ezek a különbségek már nem voltak tapasztalhatóak, mely változás háttérében valószínűleg a májsejtek gyors és hatékony adaptációs potenciálja állhat. A rendelkezésre álló adataink alapján kijelenthetjük, hogy a hőstressznek való rövidtávú kitettség intenzíven befolyásolta sejtenyészeteink állapotát, mely hepatikus hatások kialakulásában központi szerepet játszhat a fokozott oxidatív stressz. Másrészt, eredményeink szintén kiemelik a külső stresszor hatására aktiválódó védekezési mechanizmusok jelentőségét, melyek következtében a hosszabbtávú hőstressznek való kitettséghez sejtenyészeteink hatékonyan és megfelelően alkalmazkodni tudtak.

A T-2 toxin sejtkárosító hatásainak vizsgálata csirke eredetű májsejttenyészeteken *in vitro* (III. kísérlet)

A kutatás 3. fázisában az általunk kialakított primer hepatocita mono-kultúrák és hepatocita – NP sejt ko-kultúra modellek, a hőstressznek való kitettség vizsgálatán túlmenően a T-2 toxin molekuláris szintű hatásaival kapcsolatos munka elvégzésére is alkalmasnak bizonyultak. A toxin egyértelműen káros hatással volt a sejtenyészetekre, mely hatások a metabolikus aktivitás intenzív csökkenésében, valamint gyulladós válaszreakció kiváltásának formájában, így a vizsgált pro-inflammatorikus citokinek, valamint a HSP70 koncentrációjának emelkedésében voltak nyomon követhetők. Az extracelluláris H_2O_2 koncentrációjában ezzel szemben nem tapasztaltunk a kezeléstől függő változásokat. Ez utóbbi eredmény, több korábbi kutatással is összhangban arra utalhat, hogy más állatfajokkal ellentétben, csirkék májában a T-2 toxin negatív hatásainak létrejöttében kevesebb szerepe lehet a reaktív oxigén gyökök fokozott termelődéséből fakadó káros hatásoknak. E hipotézis megerősítésére azonban elengedhetetlen a jövőben további vizsgálatok elvégzése a háttérben húzódó sejtszintű mechanizmusok pontos felderítése céljából. Összefoglalva, fenti eredményeink új és értékes ismeretanyaggal szolgálhatnak a T-2 toxin májra kifejtett sejtszintű hatásaival kapcsolatban, kiemelve a toxin intenzív és nagymértékben káros hatásainak jelentőségét brojlercsirkékben.

Az akut hőstressz következményeinek vizsgálata csirkék parenchimás szerveiben *in vivo* körülmények között (IV. kísérlet)

A kutatómunka utolsó fázisában a hőstressz okozta molekuláris szintű változások új szempontból történő vizsgálatát kívántuk elvégezni brojlercsirkék különböző szerveiben. A vizsgált parenchimás szervek közül a hőstressz következtében fellépő fokozott oxidatív terhelésnek leginkább kitett szervnek a máj bizonyult. Ez a fokozott érzékenység azonban a hepatikus védelmi mechanizmusok gyors aktiválódásával is együtt járt, mely a glutation-peroxidáz enzim emelkedett aktivitása, valamint az α A- és α B-crystallinok fokozott felhasználása révén valósult meg. A fent említett két kistömegű hősokkfehérje feltehetőleg központi szerepet játszhat az akut hőstressz hatására megjelenő hepatikus válaszreakciók kialakításában, míg a folyamatban a HSP27 fehérjének kevésbé lehet szerepe. Továbbá, a hőhatásra bekövetkező intenzív protein-karbonil szint csökkenés is az α A- és α B-crystallinok fokozott felhasználódása révén következhetett be, mely valószínűleg egy túlkompensációs mechanizmus eredményeképp jött létre. Hasonló korreláció volt megfigyelhető a redukált glutation (GSH) és a crystallin szintek között is, mely a glutation rendszer és a kistömegű hősokkfehérjék hatása közti további összefüggésekre enged következtetni. A májsejtek jó adaptációs képessége abból a szempontból is megfigyelhető volt, hogy az oxidatív stresszel szembeni fokozott érzékenység ellenére a lipidperoxidációs folyamatok csak enyhébb formában és csak a hosszabb, 8 órás kezelést követően voltak kimutathatók. Összességében elmondható tehát, hogy a kutatás újszerű eredményekkel szolgált a hősokk-válasz kialakulásával kapcsolatban, kiemelve a máj oxidatív stresszel szembeni fokozott kitettségét és egyes adaptációs mechanizmusok aktiválódásának jelentőségét. Eredményeink alapján a kistömegű hősokkfehérjék központi szerepet tölthetnek be a májsejtek normál, élettani állapotának fenntartásában oxidatív stresszhatás fellépése esetén.

Konklúzió

A vizsgált faktorok immunmoduláns képességével, valamint redox homeosztázisra gyakorolt hatásaival kapcsolatos eredményeink a jövőben nagy jelentőséggel bírhatnak az agrárgazat szempontjából. Kiemeltük továbbá a HSP70 és a kistömögű hősokkfehérjék szerepét a sejtek homeosztázisának, valamint a redox rendszer fiziológias állapotának fenntartásában, hőstressznek és mikotoxinnak való kitettség esetében egyaránt. Az említett folyamatok kapcsán szintén kiemelt szerepe volt az oxidatív stressz indukálta fokozott ROS-termelésnek. Különböző citokinek, így az IL-6 és -8 koncentrációjának nyomon követésével további fontos információkhoz juthattunk a vizsgált stresszorok immunmoduláns hatásairól. Végül, az általunk újonnan kialakított sejtmodellek a nem-parenchimális sejtek hepatikus stresszválaszban betöltött szerepével kapcsolatban is értékes eredményekkel szolgáltak.

Munkánk során új szemszögből vizsgáltuk a hőstressz és a T-2 toxin káros hatásait. A fenti kutatások nagy jelentőségű adatokkal szolgálhatnak a vizsgált immunmoduláns faktorok elleni védekezés szempontjából is, különös tekintettel bizonyos specifikus takarmánykiegészítők, valamint protektív hatású egyéb anyagok alkalmazásának lehetőségeire.

Új tudományos eredmények

Ad 1,

Új típusú, csirke eredetű hepatocitákat és nem-parenchimális sejteket tartalmazó primer ko-kultúra sejttenyészeteket hoztunk létre, valamint áramlási citometriai és immuncitokémiai vizsgálatok segítségével jellemeztük a modelleket, amelyek megfelelőnek bizonyultak egyes májbeli gyulladáshoz vezető folyamatok, valamint különféle immunmoduláns faktorok által kiváltott stresszválasz vizsgálatára.

Ad 2,

A rövidebb ideig tartó hőkezelés a katabolikus anyagcsere-folyamatok intenzitásának, valamint az extracelluláris H_2O_2 koncentrációjának emelkedését és a HSP70, IL-6, IL-8 csökkent koncentrációját eredményezve befolyásolta a sejtmodellek állapotát. Ezzel szemben a tapasztalt változások nem voltak kimutathatóak 2 órás hőkezelést követően, mely megfigyelés a májsejtek nagyfokú adaptációs potenciáljára enged következtetni.

Ad 3,

Az általunk kialakított sejtmodellek a T-2 toxin rövidtávú toxikológiai vizsgálatára is alkalmasnak bizonyultak. A T-2 toxin nagymértékben befolyásolta a májsejtek élettani funkcióit, így csökkentette a metabolikus aktivitást, megnövelte a HSP70 extracelluláris koncentrációját, valamint gyulladáshoz vezető válaszreakciót váltott ki. Másrészt azonban nem tapasztaltunk változást az extracelluláris H_2O_2 koncentrációjában, mely megfigyelés azt sugallhatja, hogy a reaktív oxigénradikálok termelődése feltehetőleg nem a legfontosabb faktor, mely a csirkék májában tapasztalható, T-2 toxin indukálta citotoxikus folyamatok hátterében húzódnak.

Ad 4,

Az *in vivo* vizsgálatokból nyert eredményeink alapján a vizsgált szervek közül a hőstressznek leginkább kitettnek a máj bizonyult. A fokozott oxidatív terhelés következtében emelkedett a lipidperoxidáció mértéke, valamint aktiválódtak olyan sejtszintű védelmi reakciók, mint a glutation-peroxidáz enzim aktivitásának nagyfokú emelkedése, valamint az αA - and αB -crystallinok fokozott felhasználása. A hőhatásra bekövetkező májbeli GSH, valamint protein-karbonil szint csökkenés feltehetőleg az αA - and αB -crystallinok által mediált védekező mechanizmusok hatására létrejövő túlkompensációs válaszreakció következménye.

Saját tudományos közlemények

Az értekezés témájában megjelent tudományos közlemények

Mackei, M., Mátis, G., Molnár, A., Sebők, C., Vörösházi, J., Pál, L., Dublec, K., Husvéth, F. & Neogrady, Z.: **The relationship between small heat shock proteins and redox homeostasis during acute heat stress in chickens.** *Journal of Thermal Biology*, 103040, 2021. **Impact factor: 2.902**

Mackei, M., Molnár, A., Nagy, S., Pál, L., Kővágó, C., Gálfi, P., Dublec, K., Husvéth, F., Neogrady, Z. & Mátis, G.: **Effects of Acute Heat Stress on a Newly Established Chicken Hepatocyte—Nonparenchymal Cell Co-Culture Model.** *Animals*, 10(3), 409, 2020. **Impact factor: 2.752**

Mackei, M., Orbán, K., Molnár, A., Pál, L., Dublec, K., Husvéth, F., Neogrady, Z. & Mátis, G.: **Cellular effects of T-2 toxin on primary hepatic cell culture models of chickens.** *Toxins*, 12(1), 46, 2020. **Impact factor: 4.546**

Mackei, M., Matis, G., & Neogrady, Z.: **The effects of T-2 toxin on animal health, focusing especially on poultry: literature review.** *Magyar Állatorvosok Lapja*, 140, 475-483, 2018. **Impact factor: 0.143**

Nemzetközi konferencián történő részvétel (előadás vagy poszter prezentáció formájában)

Máté Mackei, Szabolcs Nagy, Andor Molnár, Ferenc Husvéth, Károly Dublec, Zsuzsanna Neogrady, Gábor Mátis

Effects of heat stress on recently established primary hepatocyte – non-parenchymal cell mono- and co-culture models of chicken origin. World's Poultry Congress, 2020, Paris, France, 2022 August (delayed).

Máté Mackei, Andor Molnár, Husvéth Ferenc, Károly Dublec, Zsuzsanna Neogrady, Gábor Mátis, Hedvig Fébel

Investigation of the effects of T-2 toxin on primary chicken hepatocyte mono- and hepatocyte – non-parenchymal cell co-culture models, World's Poultry Congress, 2020, Paris, France, 2022 August (delayed).

Máté Mackei, Kata Orbán, Andor Molnár, Károly Dublec, Zsuzsanna Neogrady, Gábor Mátis **Investigation of the cellular effects of T-2 toxin on hepatic cell culture model of chicken origin** 23rd Congress of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition, Turin, Italy, 2019

Gábor Mátis, Anna Kulcsár, Patrícia Hatala, Máté Mackei, Zsuzsanna Neogrady **Investigations on the effects of heat stress on hepatic cell culture models of chicken origin** XVth European Poultry Conference, Dubrovnik, Croatia, 2018.

Magyarországi konferencián történő részvétel

Mackei Máté, Molnár Andor, Pál László, Dubleczy Károly, Husvéth Ferenc, Mátis Gábor, Neogrády Zsuzsanna

Effects of heat stress on chicken-derived primary hepatic cell culture models, 62. Georgikon Napok, Szent István Egyetem, Georgikon Kar, Keszthely, 2020.

Mackei Máté, Mátis Gábor, Sebők Csilla, Vörösházi Júlia, Molnár Andor, Pál László, Dubleczy Károly, Husvéth Ferenc, Neogrády Zsuzsanna

A hőstressz redox homeosztázisra gyakorolt hatásainak vizsgálata csirkében

MTA Akadémiai Beszámoló, Budapest, Hungary, 2021.

Mackei Máté, Mátis Gábor, Molnár Andor, Pál László, Dubleczy Károly, Husvéth Ferenc, Neogrády Zsuzsanna

A hőstressz akut hatásainak vizsgálata csirke eredetű hepatocita mono- és hepatocita – nem - parenchimális sejt ko-kultúrán

MTA Akadémiai Beszámoló, Budapest, Hungary, 2020.

Mackei Máté, Mátis Gábor, Vörösházi Júlia, Molnár Andor, Pál László, Dubleczy Károly, Husvéth Ferenc, Neogrády Zsuzsanna

A T-2 toxin sejtszintű hatásainak vizsgálata különböző csirke eredetű primer májmodelleken

MTA Akadémiai Beszámoló, Budapest, Hungary, 2020.

Mackei Máté, Mátis Gábor, Molnár Andor, Kulcsár Anna, Hatala Patrícia, Nagy Szabolcs, Dubleczy Károly, Husvéth Ferenc, Neogrády Zsuzsanna

Immunmoduláló faktorok vizsgálatára alkalmas hepatikus sejtmodellek kialakítása csirkében

MTA Akadémiai Beszámoló, Budapest, Hungary, 2019.

Mátis Gábor, Kulcsár Anna, Hatala Patrícia, Tóth Adrienn, Mackei Máté, Neogrády Zsuzsanna

A T-2 toxin sejtkárosító hatásainak összehasonlító vizsgálata csirke primer bélhámsejt- és májsejttenyészetben

MTA Akadémiai Beszámoló, Budapest, Hungary, 2018.

Mátis Gábor, Kulcsár Anna, Kulcsárné Petrilla Janka, Talapka Petra, Hatala Patrícia, Mackei Máté, Neogrády Zsuzsanna

A hőstressz sejtszintű hatásainak vizsgálata csirke májsejt – Kupffer-sejt ko-kultúrán

MTA Akadémiai Beszámoló, Budapest, Hungary, 2017.

Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó tudományos közlemények

Sebők, C., Tráj, P., Vörösházi, J., Mackei, M., Papp, M., Gálfi, P., Neogrády Z. & Mátis, G. **Two Sides to Every Question: Attempts to Activate Chicken Innate Immunity in 2D and 3D Hepatic Cell Cultures.** *Cells*, 10(8), 1910, 2021. **Impact factor: 6.600**

Barna, R. F., Mackei, M., Pászti-Gere, E., Neogrády, Z., Jerzsele, Á., & Mátis, G.: **The Effects of Matriptase Inhibition on the Inflammatory and Redox Homeostasis of Chicken Hepatic Cell Culture Models.** *Biomedicines*, 9(5), 450, 2021. **Impact factor: 6.081**

Borda-Molina, D., Mátis, G., Mackei, M., Neogrády, Z., Huber, K., Seifert, J., & Camarinha-Silva, A.: **Caeca microbial variation in broiler chickens as a result of dietary combinations using two cereal types, supplementation of crude protein and sodium butyrate.** *Frontiers in Microbiology*, 11, 3453, 2020. **Impact factor: 5.640**

Mackei, M., Vörösházi, J., Sebők, C., Neogrády, Z., Mátis, G., & Jerzsele, Á.: **Fermented Wheat Germ Extract as a Redox Modulator: Alleviating Endotoxin-Triggered Oxidative Stress in Primary Cultured Rat Hepatocytes.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020. **Impact factor: 6.543**

Kurucz, Á., Orbán, K., Mackei, M., Fébel, H., Neogrády, Z., & Mátis, G.: **Investigations on hepatic and intestinal drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes in wild boar compared to domestic swine.** *European Journal of Wildlife Research*, 66(1), 1-10, 2020. **Impact factor: 1.983**

Mátis, G., Kulcsár, A., Mackei, M., Petrilla, J., & Neogrády, Z.: **Comparative study on the modulation of incretin and insulin homeostasis by butyrate in chicken and rabbit.** *PloS one*, 13(10), e0205512, 2018. **Impact factor: 2.776**

Petrilla, J., Mátis, G., Kulcsár, A., Talapka, P., Bíró, E., Mackei, M., Fébel, H. & Neogrády, Z.: **Effect of dietary cereal type, crude protein and butyrate supplementation on metabolic parameters of broilers.** *Acta Veterinaria Hungarica*, 66(3), 408-452, 2018. **Impact factor: 1.050**

Mátis, G., Mackei, M., & Neogrády, Z.: **Role of incretin hormones in the regulation of insulin homeostasis and carbohydrate metabolism. Literature review.** *Magyar Állatorvosok Lapja*, 139(2), 119-125, 2017. **Impact factor: 0.196**

Mackei, M., Barcza, Z., Péntek, G., Gábor, G., Reibling, T., & Solymosi, N.: **Heat stress forecast system on Carpathian Basin.** *Magyar Állatorvosok Lapja*, 139(6), 337-343, 2017. **Impact factor: 0.196**

Mátis, G., Mackei, M., Bajcsy, Á. C., & Neogrády, Z.: **Reproductive aspects of subacute ruminal acidosis (SARA): literature review.** *Magyar Állatorvosok Lapja*, 138(5), 279-287, 2016. **Impact factor: 0.189**

Köszönetnyilvánítás

Elsőként hálával és nagyrabecsüléssel fordulok témavezetőim, **Dr. Neogrády Zsuzsanna** és **Dr. Mátis Gábor** felé, akik utat mutattak számomra a tudományos kutatás lenyűgöző világában és hallgató korom óta egyengették pályámat. Különösen köszönöm a rengeteg bátorítást, a sok-sok türelmet és a mindig pozitív, optimista világlátásukat. Náluk jobb mentort senki sem kívánhatna magának.

Óriási köszönet illeti továbbá minden jelenlegi, illetve egykori kutató- és munkatársamat, akik az elmúlt évek során a Biokémiai Osztályon segítettek munkámat: **Dr. Kulcsár Annának**, aki sokat tanított nekem a statisztika varázslatos területéről, **Oláhné Dr. Orbán Katának**, aki mindig csodálatos munkatárs és KF csoporttag volt, **Dr. Papp-Sebők Csillának**, akire tényleg mindig számíthatok, **Vörösházi Júliának** az állandó támogatásáért és megbízható segítségéért, **Dr. Tráj Patriknak**, aki mindig kapható partner egy alapos „brainstormingra”, **Kulcsárné Dr. Petrilla Jankának**, aki a mindig lelkiismeretes és precíz munkára tanított, **Dr. Kissné Dr. Hatala Patrícianak** a töretlen optimizmusáért és pozitív hozzáállásáért, valamint **Petrovics Gabriellának** és **Seprődi Júliának** a kedves asszisztenciájukért és állandó támogatásukért.

A munka jelentős része a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Georgikon Karával együttműködésben valósult meg. Hálás vagyok a közös, gyümölcsöző munkáért és a rengeteg segítségért **Dublecz Károly Professzor Úrnak**, **Dr. Pál Lászlónak**, **Dr. Nagy Szabolcsnak** és **Dr. Molnár Andornak**. Külön köszönet és nagyrabecsülés illeti **Husvéth Ferenc Professzor Urat** a hosszú évtizedek tudományos tapasztalatain nyugvó kiváló szakmai segítségéért, valamint a kritikus és előremutató gondolataiért, melyek nagyban hozzájárultak a tudományos munka és a született folyóiratcikkek színvonalának emeléséhez. Nagyon szépen köszönöm **Fébel Hedvig Professzor Asszonynak** az állandó segítségét és támogatását minden területen.

Köszönöm **Bartha Tibor Professzor Úrnak**, hogy biztosította és lehetővé tette munkám létrejöttét az Élettani és Biokémiai Tanszék kötelékében. Külön köszönet illeti továbbá **Kinálné Szikora Zsuzsannát** a mindig villámgyors és professzionális segítségéért.

Köszönet illeti továbbá Egyetemünk Gyógyszertani és Méregtani Tanszékét, hogy biztosították a műszeres háttérrel fluorimetriás mérések elvégzéséhez. Nagyon köszönöm az összes munkatárs segítségét, aki a kutatás bármely fázisában közreműködött a munkámban. Név szerint: **Gálfi Péter Professzornak**, **Dr. Jerzsele Ákos Rektorhelyettes és Tanszékvezető Úrnak**, **Dr. Farkas Orsolyának**, **Dr. Pásztiné Dr. Gere Erzsébetnek** és **Dr. Kővágó Csabának**.

Hálás vagyok diákkörös és szakdolgozó hallgatóimnak, **Lars Folkmannak**, **Oláh Barnabásnak**, **Pozsár Zsófiának**, **Vaktor Nellinek** és **Varga Bencének** a kemény és elhivatott segítségükért, mely engem is motivált a kutatás során.

Végezetül pedig nagyon-nagyon köszönöm **családom** és **barátaim** segítségét és bátorítását, akikre még a legnehezebb időszakokban is mindig számíthatok. Köszönöm szépen párom, **Cséfalvy Judit** rengeteg szeretetét és támogatását. Minden sokkal nehezebb lenne egy ilyen csodálatos háttér nélkül, mint amilyen az enyém.