

**Gazdasági haszonállatok gyulladáso- és stresszválaszának  
vizsgálata máj és bél eredetű sejtmodelleken**

**MTA doktori értekezés  
tézisei**

**Dr. Mátis Gábor**

Állatorvostudományi Egyetem  
Élettani és Biokémiai Tanszék  
Biokémiai Osztály

**Budapest**

**2025**

# 1. Bevezetés

A biológiai folyamatok molekuláris szintű *in vitro* vizsgálatához kiváló modellként szolgálnak a sejt- és szövettenyészetek. Az ezeken végzett kísérletek – az állatvédelmi szempontokat is figyelembe véve – lehetővé teszik a sejtekben és szövetekben megfigyelhető mechanizmusok alaposabb megismerését, így például a gyulladásos- és stresszválasz folyamatainak feltárását, valamint különféle modulátor hatóanyagjelöltek toxicitásának és hatékonyságának tesztelését. Különösen a frissen izolált, primer sejt- és szövetkultúrák értékes modellek, mivel jobban tükrözik az *in vivo* viszonyokat, mint a sejtvonalak.

Élelmiszertermelő haszonállatokban – így csirkében és sertésben – kiemelten fontos a fertőző ágensek, környezeti stresszorok és toxikus anyagok kiváltotta enterális és hepatikus gyulladásos- és stresszválasz vizsgálata. A bélnyálkahártyában és a májban lezajló kóros folyamatok az állat egészségét és termelési mutatóit egyaránt ronthatják. Az antimikrobiális rezisztencia terjedése sürgeti az antibiotikumfelhasználás csökkentését, egyúttal olyan új hatóanyagjelöltek fejlesztését, amelyek a kórokozók által kiváltott immunválasz modulálásával – a szervezet saját védekezőmechanizmusainak aktiválása és a gyulladásos-, illetve redox-homeosztázis szabályozása révén – segíthetik a fertőzések leküzdését. Az antimikrobiális peptidek (AMP-k) – közvetlen antibakteriális hatásukon túl – elsősorban immunmodulátor tulajdonságuk révén lehetnek alkalmasak a bakteriális eredetű gyulladásos kórképek károsító hatásainak mérséklésére. A különféle probiotikus baktériumtörzsek, ill. növényi eredetű bioaktív hatóanyagok ugyancsak ígéretes jelöltek lehetnek a hagyományos antibakteriális kezelés kiegészítésére vagy helyettesítésére.

Az értekezés szerzője az Állatorvostudományi Egyetem Biokémiai Osztályának munkatársaként eddigi pályája során elsősorban primer sejttenyészetek fejlesztésével foglalkozott, és az elmúlt években kutatómunkájának középpontjába a csirke és sertés eredetű, a gyulladásos- és stresszválasz vizsgálatára szolgáló sejtmodellek kialakítása került. A szerző bízik benne, hogy az értekezésben bemutatásra kerülő új tudományos eredmények – alapkutatói jelentőségükön túl – jó kiindulópontként szolgálhatnak további alkalmazott, hatóanyag-fejlesztésre fókuszáló kutatások számára is, hozzájárulva a gazdasági haszonállatok egészségvédelméhez.

## 2. Célkitűzések

Csirkeben és sertésben csak igen korlátozottan állnak rendelkezésre olyan primer sejtmodellek, amelyek alkalmasak a gyomor-bélsatorna és a máj által alkotott bél-máj tengely mentén lezajló gyulladásos folyamatok tanulmányozására. Ezért az értekezésben bemutatott kísérletek fő célja csirke és sertés eredetű hepatikus, ill. enterális sejt- és szövettényészetek kialakítása volt a gyulladásos- és stresszválasz tanulmányozására.

A kutatómunka célkitűzései az alábbiakban foglalhatók össze:

- **Primer sejtmodellek létrehozása:** Csirke és sertés eredetű *in vitro* primer májsejttenyészeteket (hepatocita monokultúrák és hepatocita-nem parenchymális sejt kokultúrák), valamint vékonybél-nyálkahártya eredetű explant szövettényészeteket kívántunk kialakítani és jellemezni.
- **Gyulladás vizsgálatára alkalmas sejtmodellek kialakítása:** A létrehozott sejt- és szövettényészeteket különféle potenciális gyulladáskeltő anyagokkal, patogén-asszociált mintázatokkal (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) kívántuk kezelni, hogy feltárjuk, mely vegyület, milyen koncentrációban alkalmas a gyulladásos citokinválasz kiváltására anélkül, hogy jelentős sejtkárosító hatással járna.
- **Immunmodulátorok vizsgálata:** Célunk annak vizsgálata volt, hogy az *in vitro* gyulladásos-, ill. oxidatív stresszválasz milyen módon modulálható egyes új hatóanyagjelöltek, így elsősorban AMP-k (katelicidin-2, IDR-1002, Pap12-6, cekropin A és PR-39), valamint egy probiotikus baktériumtörzs (*Limosilactobacillus reuteri*) segítségével. Célunk olyan molekulák keresése volt, amelyek gyulladáscsökkentő hatásuk révén alkalmasak a proinflammatorikus citokincsúcsok mérséklésére, ugyanakkor megfelelő immunstimuláns hatásukkal hozzájárulhatnak az adekvát immunválasz kialakításához, ezáltal a fertőzések hatékony leküzdéséhez.
- **További stresszhatások vizsgálata:** További célunk volt csirke hepatikus sejtmodelleken az akut hőstressz sejtszintű hatásainak feltárása, valamint a hőstresszválasz modulálása kétféle, kurkuma és gyömbér eredetű növényi kivonattal. A csirke májsejttenyészeteken továbbá a T-2 toxin sejtszintű hatásait és egyes toxikológiai jellemzőit is vizsgálni kívántuk.

### 3. Anyag és módszer

#### 3.1. A sejt- és szövettenyészetek létrehozása

A kísérletek során csirke eredetű primer hepatikus és enterális sejttenyészeteket alakítottunk ki, amelyhez a sejteket 21 napos, Ross-308 fajtájú, hímvárú brojlersirkéből nyertük. Az állat exterminálását követően a májat a *vena gastropancreaticoduodenalis*-on keresztül többféle pufferoldattal perfundáltuk, és a kötőszövetes állományt kollagenáz enzim segítségével emésztettük. Az így nyert sejtsuszpenzióból többlépcsős differenciáló centrifugálás segítségével különítettük el a hepatocitákat és a nem-parenchymális (NP) – elsősorban makrofágokat tartalmazó – sejtfrakciót. A két sejtsuszpenzió 6:1 arányú elegyítésével kétdimenziós (2D) hepatocita – NP sejt ko-kultúrát alakítottunk ki, melyet 24 órán keresztül 37°C-os hőmérsékleten inkubálva konfluens sejttenyészetet kaptunk. Mágnesezhető nanorészecskék, valamint speciális, mágneses sejttenyésztő edények alkalmazásával a kétféle sejtfrakcióból hosszabb ideig fenntartható háromdimenziós (3D) sejttenyészeteket is kialakítottunk; a sejtek ebben az esetben 48 órás inkubációt követően szferoidokba rendeződtek. Az izolált sejtpopulációkat áramlási citometria segítségével, majd a sejtmodelleket szövettani vizsgálattal, valamint a hepatociták és makrofágok immuncitokémiai kimutatásával jellemeztük. A vékonybél eredetű szövettenyészetek kialakításához 1,5 mm átmérőjű explantokat metszettünk ki a csirke ileumból, melyek 2 óra előinkubációt követően készen álltak a kezelésekre. Az explantok morfológiáját és sejtösszetételét is szövettani, valamint immunhisztokémiai vizsgálattal jellemeztük.

A sertés eredetű sejtmodellek kialakítását 15 kg testtömegű, magyar nagyfehér fajtájú, ártány sertésekből végeztük el. A máj *processus caudatus* lebenyének lemetszését követően a metszslapon keresztül többlépcsős perfúziót végeztünk, és a csirkéhez hasonlóan kollagenázzal emésztettük az intersticiális állományt. A nyers sejtsuszpenzióból differenciáló centrifugálás segítségével különítettük el a hepatocitákat és az NP sejteket, melyekből 6:1 sejtarányú 2D kokultúrákat alakítottunk ki. 24 óra tenyésztést követően a konfluens sejtréteget szövettani és immuncitokémiai vizsgálattal jellemeztük, igazolva a beállított sejtarányt. A vékonybél eredetű explantokat a csirke esetében kidolgozott módszer adaptálásával, azzal lényegében megegyező módon izoláltuk.

#### 3.2. A sejt- és szövettenyészeteken végzett *in vitro* kísérletek

A máj esetében a 2D sejttenyészeteket 24 óra, a 3D szferoidokat pedig 48 óra tenyésztést követően, míg a vékonybél eredetű explantokat 2 óra előinkubáció után kezeltük az egyes kísérletek során alkalmazott kezelőoldatokkal. A gyulladással való válasz vizsgálatához először különféle potenciálisan gyulladáskeltő vegyületekkel kezeltük a sejteket, hogy kiválasszuk az adott sejtmodellekre gyulladást kiváltásra leginkább alkalmas molekulákat, ill. kezelési koncentrációkat. Ezután a gyulladással való válasz befolyásolása céljából immunmodulátor hatóanyagjelölteket – elsősorban AMP-eket (katelicidin-2, IDR-1002, Pap12-6, cekropin A és

PR-39) – alkalmaztunk, és vizsgáltuk a gyulladásos citokinválasz változásait. A májsejtenyészeteken 24 órás, a vékonybél eredetű explantokon 12 órás kezelési időt alkalmaztunk.

Emellett külön kísérletben tanulmányoztuk az akut (egy és két óra időtartamú) hőstressz sejtszintű hatásait a csirke eredetű hepatocita – NP sejt ko-kultúrákra, valamint a kurkuma- és gyömbérvonolat hőstresszválaszra kifejtett moduláló aktivitását. A 2D és 3D hepatikus sejtenyészeteken összehasonlító vizsgálatokat végeztünk a szubletális dózisban 8, ill. 24 óráig alkalmazott T-2 toxin sejtkárosító tulajdonságainak feltárására.

Továbbá, a csirke vékonybél eredetű szövettenyészetekből explant – baktérium kokultúrát alakítottunk ki, melyen két óra időtartamú *Salmonella* Enteritidis-expozícióval segítségével váltottunk ki gyulladást, és azt *Limosilactobacillus reuteri* probiotikus törzsszel történt két órás előinkubáció segítségével moduláltuk.

Az egyes kísérletek főbb jellemzőit az **1. táblázat** foglalja össze. A kezeléseket követően a tenyésztett sejtek életképességét a metabolikus aktivitás CCK-8 teszttel történő mérésével, valamint a laktát-dehidrogenáz (LDH) – a sejtmembrán integritását tükröző – extracelluláris aktivitásának kolorimetriás meghatározásával követtük nyomon. A tenyészetek tápfolyadékából vett mintákból az **1. táblázatban** feltüntetett citokinek koncentrációját fajspecifikus Luminex xMAP és ELISA módszerek segítségével határoztuk meg. Az explant – baktérium kokultúrák esetén az egyes citokinek génexpresszióját kvantitatív real-time PCR felhasználásával mértük. A tápfolyadék, ill. a sejtlizátum redox paramétereit fajspecifikus ELISA, valamint fluorimetriás és kolorimetriás módszerek segítségével határoztuk meg. A 3D szferoidok esetében a tápfolyadék metabolomikai analízisére az AbsoluteIDQ p180 kit felhasználásával került sor.

**1. táblázat.** Az értekezésben bemutatott kísérletek főbb jellemzőinek áttekintése. 2D = kétdimenziós, 3D = háromdimenziós, LPS = lipopoliszacharid, LTA = lipoteichosav, EtxB = *Escherichia coli* eredetű hőlabilis enterotoxin B alegysége, PMA = forbol-mirisztát-acetát, poly I:C = poliinozil-policitidilsav, IDR = innate defense regulator, Pap12-6 = papiliocin mesterséges származéka, metab. akt. = metabolikus aktivitás, LDH-akt. = laktát-dehidrogenáz-aktivitás, IL = interleukin, CXCLi2 = chicken chemotactic and angiogenic factor, IFN = interferon, M-CSF = makrofág-kolóniastimuláló faktor, MDA = malondialdehid, RANTES = Regulated And Normal T-cell Expressed and Secreted, Nrf2 = Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, PC = protein-karbonil, TNF = tumornekrózis faktor, TGF = transzformáló növekedési faktor, GM-CSF = granulocita-makrofág-kolóniastimuláló faktor.

Kísérlet célja	Állatfaj	Sejtmodell	Gyulladásokeltő anyag / stresszor	Immun- és redox-modulátor anyag	Mért paraméterek
Gyulladásos válasz kiváltása	Csirke	2D és 3D hepatocita – NP sejt kokultúra	LPS, LTA, flagellin, EtxB, PMA, poly I:C	-	Metab. akt., LDH-akt., IL-6, CXCLi2
Gyulladásos válasz modulálása	Csirke	2D hepatocita – NP sejt kokultúra	LTA, PMA	Katelicidin-2	Metab. akt., LDH-akt., IFN- $\gamma$ , CXCLi2, IL-10, M-CSF, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MDA
Gyulladásos válasz modulálása	Csirke	2D hepatocita – NP sejt kokultúra	LTA	IDR-1002	Metab. akt., LDH-akt., IFN- $\gamma$ , IL-6, CXCLi2, IL-10, M-CSF, RANTES, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Nrf2, PC
Gyulladásos válasz modulálása	Csirke	2D hepatocita – NP sejt kokultúra	LTA, poly I:C	Pap12-6	LDH-akt., IFN- $\gamma$ , IL-6, CXCLi2, IL-10, RANTES, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Nrf2
Gyulladásos válasz modulálása	Csirke	2D hepatocita – NP sejt kokultúra	Poly I:C	Cekropin A	LDH-akt., IFN- $\gamma$ , IL-6, CXCLi2, IL-10, TGF- $\beta$ 1, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MDA
Hőstresszválasz kiváltása	Csirke	2D hepatocita monokultúra és hepatocita – NP sejt kokultúra	1 és 2 h 43°C hőkezelés	-	Metab. akt., LDH-akt., IL-6, CXCLi2, HSP70, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Hőstresszválasz modulálása	Csirke	2D hepatocita – NP sejt kokultúra	1 h 43°C hőkezelés	Kurkuma- és gyömbérkivonat	HSP27, HSP70, HSP90, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , RANTES, M-CSF
T-2 toxinra adott stresszválasz vizsgálata	Csirke	2D hepatocita monokultúra és hepatocita – NP sejt kokultúra	T-2 toxin	-	Metab. akt., LDH-akt., IL-6, CXCLi2, HSP70, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

T-2 toxinra adott stresszválasz vizsgálata	Csirke	3D hepatocita – NP sejt kokultúra	T-2 toxin	-	Metab. akt., LDH-akt., IL-6, CXCLi2, MDA, PC, metabolom
Gyulladásos válasz kiváltása	Csirke	Vékonybél eredetű explant szövettényészet	Poly I:C, LTA, flagellin	-	Metab. akt., LDH-akt., IL-2, IL-6, CXCLi2, IL-10, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , RANTES
Gyulladásos válasz modulálása	Csirke	Vékonybél eredetű explant szövettényészet	LTA	Katelicidin-2	Metab. akt., LDH-akt., IL-2, IL-6, CXCLi2, IL-10, IFN- $\gamma$
Gyulladásos válasz modulálása	Csirke	Vékonybél eredetű explant szövettényészet	LTA	IDR-1002	Metab. akt., LDH-akt., IL-2, CXCLi2, IL-10, IFN- $\gamma$ , RANTES
Gyulladásos válasz modulálása	Csirke	Vékonybél eredetű explant szövettényészet	Poly I:C	Pap12-6	Metab. akt., LDH-akt., IL-2, IL-6, CXCLi2, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ 1, RANTES
Gyulladásos válasz modulálása	Csirke	Vékonybél eredetű explant szövettényészet	Poly I:C	Cekropin A	Metab. akt., LDH-akt., IL-2, IL-6, CXCLi2, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ 1, RANTES
Gyulladásos válasz modulálása	Csirke	Vékonybél eredetű explant – baktérium kokultúra	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	IL-1 $\beta$ , CXCLi2, IL-10, IL-15, IL-18, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 4 (génexpresszió)
Gyulladásos válasz kiváltása	Sertés	2D hepatocita – NP sejt kokultúra	LPS, LTA, flagellin, poly I:C	-	Metab. akt., LDH-akt., IL-4, IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MDA
Gyulladásos válasz modulálása	Sertés	2D hepatocita – NP sejt kokultúra	LPS	IDR-1002	Metab. akt., LDH-akt., IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, GM-CSF, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MDA
Gyulladásos válasz kiváltása	Sertés	Vékonybél eredetű explant szövettényészet	LPS, LTA, flagellin, poly I:C	-	Metab. akt., LDH-akt., IL-4, IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF
Gyulladásos válasz modulálása	Sertés	Vékonybél eredetű explant szövettényészet	LPS	PR-39	Metab. akt., IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, GM-CSF

### ***3.4. Statisztika***

Az adatok eloszlását Shapiro-Wilk-teszt segítségével vizsgáltuk, a szórások homogenitását Levene-teszttel ellenőriztük. Normális eloszlás esetén egytényezős varianciaanalízist (ANOVA) végeztünk, majd a csoportok páronkénti összehasonlítására Dunett-féle post-hoc teszttel került sor. Nem normális eloszlású alapsokaság esetében Wilcoxon-féle rangösszeg-próbát végeztünk. A különbségeket  $P < 0,05$  esetén tekintettük szignifikánsnak. A statisztikai elemzésekhez az R 4.0.3. és a GraphPad Prism 9 szoftvereket használtuk. A kezelt sejtenyészetek értékeit a kezeletlen kontrollcsoporthoz, valamint a kombinációs kezelésben részesült sejtek értékeit a kizárólag gyulladáskeltő expozíciónak kitett csoportokhoz viszonyítottuk.

## 4. Eredmények és megbeszélésük

### 4.1. Primer sejtmodellek létrehozása

Kísérleteink során sikeresen hoztunk létre és jellemeztünk olyan máj és bél eredetű primer sejt- és szövetkultúrákat csirkéből és sertésből, melyek alkalmasak a gyulladásos- és stresszválasz vizsgálatára. Tapasztalataink alapján a hepatikus 2D sejttenyészetek (csirke és sertés esetében egyaránt) 24 óra tenyésztést követően további 24 óra időtartamú kezelésre, míg a 3D szferoidok (csirke) 48 óra inkubáció után további 48 órás fenntartásra alkalmasak. Az ileumból izolált explant szövettenyészetek mindkét állatfaj esetében 2 órás előinkubációt követő 12 óra expozíciós idő erejéig megőrizték morfológiájukat és életképességüket.

A máj eredetű sejttenyészetek közül a makrofágot is tartalmazó hepatocita – NP sejt kokultúrák bizonyultak – életképességük és citokinprofiljuk alapján – a legjobb modellnek a gyulladásos- és stresszválasz vizsgálatára. A beállított 6:1 sejtarány eredményeink szerint a legtöbb alkalmazott PAMP hatására mindkét fajban megfelelő gyulladásos citokintermelést mutatott. Az immunfluoreszcens festésekkel pedig sikeresen igazoltuk, hogy a kokultúrák mind a hepatocitákat, mind a makrofágot megfelelő számban tartalmazták. Fontos kiemelni, hogy mindegyik modell primer tenyészetként frissen, az adott szervből nyert sejtekből vagy szövetdarabból került kialakításra, így sokkal jobban megközelítik az *in vivo* viszonyokat, mint a sejtvonalak.

### 4.2. Gyulladásos válasz kiváltása

A proinflammatorikus hatóanyagjelöltek vizsgálata során a különböző sejtmodellek citokinprofiljában tapasztalt változásokat a **2. táblázat**ban foglaltam össze. A gyulladásos válasz kiváltására irányuló kísérleteink alapján az egyes PAMP-ok közül összességében a Gram-pozitív bakteriális endotoxin, a *Staphylococcus aureus* eredetű lipoteichosav (LTA) és a virális RNS-analóg poliinozil-policitidilsav (poly I:C) bizonyult a leghatékonyabbnak a proinflammatorikus citokintermelés fokozására. Az LTA a sertés vékonybél eredetű explantok és a csirkéből izolált hepatikus szferoidok kivételével mindegyik sejtmodellen, míg a poly I:C az összes sejt- és szövettenyészetben hatékonyan váltott ki gyulladást (**2. táblázat**). A csirke eredetű 3D szferoidokon a gyulladásos citokinek változása nem volt következetes, így a hepatikus immunválaszra vonatkozó további kísérleteket a 2D kokultúra modellen végeztük el.

Az életképességi vizsgálatok eredményei alapján a tápfolyadékhoz adott LTA nem mutatott releváns sejtkárosító hatást: a csirke 2D és a sertés hepatikus modellen mérsékelten emelte a tápfolyadék LDH-aktivitását, míg a vékonybél-explantok életképességi paramétereit egyik fajban sem befolyásolta. Az alkalmazott poly I:C-dózisok (50 és 100 µg/ml) részben membránkárosítónak bizonyultak, ami a sertés májsejttenyészetek esetében volt – a kontrollhoz képest háromszorosára emelkedett LDH-aktivitás alapján – a legjelentősebb, már citotoxikusnak tekinthető mértékű, és a tápfolyadék csökkent IFN- $\gamma$ - és GM-CSF-koncentrációjához vezetett. Ezzel szemben a poly I:C-expozíciónak kitett 2D csirke

májsejtmodellel kisfokú metabolikus depressziót és LDH-aktivitás-emelkedést tapasztaltunk, a 3D szferoidokon csak az extracelluláris LDH-aktivitás nőtt, a csirke ileumból izolált explantok metabolikus aktivitása csökkent kimutatható membránkárosodás nélkül, míg a sertés bélmodell esetében semmilyen eltérést nem észleltünk az életképességi paraméterekben. Érdekes, hogy a sertés májsejtek különösen érzékenynek bizonyultak a poly I:C-vel szemben, míg a sertés bél eredetű szövettenyészeteken egyáltalán nem tapasztaltunk sejtkárosító hatást. A csirke esetében a poly I:C sejttanyagcserére és membránintegritásra gyakorolt hatása nem érte el a citotoxikusnak tekinthető szintet, így – a kiváltott markáns citokincsúcsokat figyelembe véve – kiválóan alkalmazható gyulladáskeltő ágensnek bizonyult a további kísérleteink számára. A flagellin és az LPS – az LTA-hoz hasonlóan – kedvező citotoxicitási tulajdonságokat mutatott: a flagellin egyik modellen sem volt sejtkárosító hatású, az LPS pedig csak a sertés hepatikus kokultúra LDH-aktivitását emelte meg kis mértékben.

Az elsősorban toll-like receptor (TLR)-2-agonista LTA hatására bekövetkező citokinprofil-változás (**2. táblázat**) alapján a Gram-pozitív endotoxin a csirke máj és bél, valamint a sertés máj esetében egyaránt markáns és következetes gyulladással citokinválaszt váltott ki. Az LTA-expozíció következtében fokozódott a proinflammatorikus mediátorok széles spektrumának felszabadulása, így megnőtt az interleukin (IL)-2, IL-4, IL-6, chicken chemotactic and angiogenic factor (CXCLi2, az IL-8 ortológja csirkében), interferon (IFN)- $\gamma$  és a Regulated And Normal T-cell Expressed and Secreted (RANTES), valamint csökkent egyes antiinflammatorikus citokinek, így az IL-10 és a makrofág-kolóniasztimuláló faktor (M-CSF) tápfolyadékban mért koncentrációja. Mindez összhangban van az irodalmi adatokkal, melyek az LTA-expozíció következtében elsősorban az IL-2, IL-6, IL-8 és a tumornekrozis faktor (TNF)- $\alpha$  fokozott termeléséről számolnak be. Az egyes sejtmodellek citokinválasztát összevetve figyelemreméltó, hogy a sertés máj esetében nem tapasztaltunk LTA kiváltotta interferonválaszt, míg a többi esetben szignifikánsan emelkedett a sejtek IFN- $\gamma$ -leadása LTA hatására.

A gyulladáskeltő hatását elsődlegesen a TLR-3 receptorokon keresztül kifejtő, virális nukleinsav-analóg poly I:C proinflammatorikus aktivitása széles körben ismert, csirke és sertés eredetű *in vitro* rendszerekben azonban eddig kevésbé vizsgálták a hatásait. A poly I:C a csirke májsejtmodellel váltotta ki a legszélesebb körű citokinválaszt; ehhez képest releváns eltérés, hogy a legfőbb citokinek közül a CXCLi2/IL-8 koncentrációja nem emelkedett a poly I:C-vel kezelt explantok esetében egyik fajban sem (**2. táblázat**). A sertés májsejtek esetében a sejtkárosító hatás miatt a poly I:C kiváltotta gyulladással válasz nem volt érdemben összehasonlítható a többi sejtmodell citokinprofiljával, de az IL-6-leadás fokozódása a sejtkárosodás ellenére megfigyelhető volt.

**2. táblázat.** A gyulladáshoz kiváltás céljából alkalmazott vegyületek által a különböző sejtmódellen kiváltott gyulladáshoz citokinkoncentráció-változások áttekintése. A felfelé mutató nyíl a koncentráció szignifikáns növekedését, a lefelé mutató nyíl a koncentráció szignifikáns csökkenését jelzi a kontrollcsoporthoz képest ( $P < 0,05$ ). A szürkével jelzett mérésekre nem került sor, a kihúzott cellák esetében nem volt szignifikáns eltérés. A rövidítések magyarázata a szövegben található.

PAMP		IL-1 $\beta$	IL-2	IL-4	IL-6	CXCLi2/ IL-8	IL-10	IFN- $\gamma$	RANTES	M-CSF	TNF- $\alpha$
LPS	Csirke máj 2D				-	-					
	Csirke máj 3D				-	↓					
	Sertés máj	↑		↑	↑	↑		-		↓	↑
	Sertés bél	↑			↑	↑				↑	
LTA	Csirke máj 2D				↑	↑	-	↑	↑	↓	
	Csirke máj 3D				↓	↓					
	Csirke bél		↑		↑	↑	↓	↑	↑		
	Sertés máj			↑	↑	↑		-		-	↑
	Sertés bél				-	-					
Flagellin	Csirke máj 2D				↑	-					
	Csirke máj 3D				↑	-					
	Csirke bél		-		↑	-	↑	-	↑		
	Sertés máj			-	-	-		↓		-	-
	Sertés bél				↑	-					
Poly I:C	Csirke máj 2D				↑	↑	↑	↑	↑		
	Csirke máj 3D				↑	-					
	Csirke bél		-		↑	-	-	↑	↑		
	Sertés máj			-	↑	-		↓			-
	Sertés bél				↑	-					

Az elsődlegesen a TLR-5 receptorokon ható, *Salmonella* Typhimurium flagellin ugyancsak jól használható a gyulladás *in vitro* modellezésére, így esetünkben – a sertés eredetű májsejttenyészetek kivételével – szintén alkalmasnak bizonyult a gyulladásos válasz kiváltására, de az LTA-hoz és a poly I:C-hez képest szűkebb citokinspektrumra volt hatással. Az egyes citokinek közül a flagellinkezelés kiváltotta IL-6-csúcs a csirke máj és bél, valamint a sertés bél eredetű kultúrákban egyaránt jellemző volt (**2. táblázat**). Fontos kiemelni, hogy a gyulladás kiváltására elterjedten alkalmazott, *Escherichia coli* eredetű lipopoliszacharid (LPS) nem indukált gyulladásos citokinválaszt a csirke eredetű hepatikus kokultúrán (**2. táblázat**), így az enterális explantokat már nem is kezeltük LPS-sel. Ezzel szemben az LPS-stimulus mindkét sertés eredetű modellen kifejezett proinflammatorikus hatást mutatott, a kulcsfontosságú citokinek koncentrációját következetesen megemelve. A csirke esetében elmaradt sejtválaszt a TLR-4 jelpálya eltérései magyarázhatják. Madarakban ugyanis a TLR-4-agonisták jellemzően csak a MyD88-függő útvonalon keresztül serkentik a nuclear factor- $\kappa$ B (Nf- $\kappa$ B)-t, a MyD88-független út és egyes TLR-4 jelátviteli gének ortológjai hiányoznak.

### **4.3. Gyulladásos válasz modulálása antimikrobiális peptidek segítségével**

A gyulladásos válasz kiváltására vonatkozó kísérleteket követően, a gyulladás modulálására irányuló vizsgálataink során a csirke hepatikus modelleken az LTA-t, a PMA-t és a poly I:C-t használtuk gyulladáskeltésre, a csirke eredetű vékonybél explantokon LTA-t és poly I:C-t alkalmaztunk. Sertés esetében pedig ezután mindkét sejtmodellen LPS segítségével váltottunk ki gyulladást. Moduláló hatóanyagjelöltként összesen ötféle AMP-t (katelicidin-2, IDR-1002, Pap12-6, cekropin A, PR-39) teszteltünk a különféle sejt- és szövettényeszeten. A szakirodalomban leírt immunmoduláns hatásokat a saját kísérleti eredmények jelentősen bővítették a célállatfajként szereplő csirkére és sertésre, mint legfőbb ételmiszertermelő haszonállatfajokra vonatkozóan.

#### ***Antimikrobiális peptidek citotoxicitása***

Először az AMP-expozíciók esetleges sejtkárosító hatásait vizsgáltuk, hogy kiválasszuk azokat a koncentrációkat, amelyek nem citotoxikusak, így alkalmasak a tenyészetek kezelésére és az immunmoduláció tanulmányozására. A katelicidin-2 a csirke hepatocita – NP sejt kokultúrán a magasabb, 10 nmol/ml dózisban jelentősen csökkentette a sejtek metabolikus aktivitását és megnövelte az extracelluláris LDH-aktivitást, ami vélhetően a peptid eukarióta sejtekre kifejtett „off-target” membránkötődésével van összefüggésben. A citotoxikusnak bizonyult koncentrációt kizártuk a további vizsgálatokból, és az LTA-val, ill. PMA-val kombinálva már csak az 5 nmol/ml AMP-koncentrációt alkalmaztuk. Ez a dózis önmagában adva mérsékelten befolyásolta mindkét életképességi paramétert, de az eltérés nem minősült citotoxikusnak, míg a PAMP-okkal kombinálva a metabolikus aktivitás már nem változott szignifikáns mértékben, az LDH-aktivitás pedig jóval kisebb mértékű emelkedést mutatott, különösen az LTA-val egyidejűleg alkalmazva. Mindez a katelicidin-2 endotoxinkötő és -semlegesítő hatásával hozható összefüggésbe, így az LTA-hoz kapcsolódva már csak kisebb

mértékben rontotta a membránok integritását. A csirke vékonybélből izolált explantok esetében – bízva a bélnyálkahártya kisebb érzékenységében – az 5 és 10 nmol/ml mellett egy magasabb, 25 nmol/ml-es peptidkoncentrációt is teszteltünk, és egyik vizsgált katelicidindózis sem bizonyult sejtkárosító hatásúnak. A csirke eredetű hepatikus és enterális modellünk között tehát jelentős különbség mutatkozott a katelicidin-2 citotoxicitásával kapcsolatban, és a bélnyálkahártya sejtszövet jóval kevésbé volt érzékeny a peptid membránkárosító hatásával szemben, így az csirkében vélhetően biztonságosan alkalmazható a bakteriális endotoxinok következtében kialakuló bélgyulladás modulálására.

Az IDR-1002 kifejezetten kedvező toxicitási profillal rendelkező mindhárom vizsgált sejtmodellel, így a csirke eredetű májsejtmodell, a csirke ileumból izolált explantok és a sertés eredetű hepatikus kokultúra esetén sem bizonyult citotoxikusnak a 10-90  $\mu\text{mol/ml}$  koncentrációtartományban, akár önállóan, akár LPS-sel vagy LTA-val kombinációban alkalmazva. Ez összhangban van az irodalmi adatokkal, melyek szerint az IDR peptidcsalád tagjai nem kötődnek az eukarióta membránokhoz, és csak kivételesen magas koncentrációban lehetnek sejtkárosító hatásúak. Eredményeink alapján az IDR-1002 nagy biztonsággal alkalmazhatónak tűnik enterális és szisztémás fertőzések során a gyulladás befolyásolására csirke és sertés esetében egyaránt. A csirke máj és bélnyálkahártya eredetű sejtmodelleken alkalmazott Pap12-6 ugyancsak nem bizonyult citotoxikusnak, összhangban a számos emlős sejtvonalon tapasztalt kedvező toxicitási tulajdonságaival. A cekropin A 6,25  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációig nem mutatott sejtkárosító hatást sem a csirke máj, sem a csirke bél eredetű tenyészeteken, hasonlóan a szakirodalomban emlős makrofágokra és bélhámsejtekre vonatkozóan rendelkezésre álló adatokhoz. Viszont 12,5 és 25  $\mu\text{g/ml}$  dózisban már szignifikánsan megnövelte a májsejtek tápközegének LDH-aktivitását, így az explantokon e magasabb koncentrációkat már nem alkalmaztuk. A csak sertés bél explantokon tesztelt PR-39 peptid 5-10  $\mu\text{mol/ml}$  dózisban deprimálta a szövettényeszetek anyagcseréjét, de a csökkenés mértéke alapján még felhasználhatónak bizonyult az immunmoduláns aktivitás vizsgálatára.

Az életképességi eredményeket összegezve az IDR-1002, a Pap12-6 és a cekropin A peptidek egyike sem volt citotoxikus a vizsgált sejtmodelleken, így az alkalmazott koncentrációkban biztonságosan felhasználhatók a további, a gyulladás modulálására irányuló vizsgálatokhoz. A katelicidin-2 5 nmol/ml dózisban kisfokú metabolikus depressziót idézett elő a csirke májsejteken, magasabb koncentrációban pedig sejtkárosító hatást mutatott, szemben a csirke explantokkal, melyeken 25 nmol/ml dózissal biztonságosan alkalmazhatónak bizonyult. Az 5 és 10  $\mu\text{mol/ml}$  koncentrációban a tápfolyadékhoz adott PR-39 pedig jelentősen csökkentette a sertés ileális explantok metabolikus aktivitását, így a peptid nagyobb dózisban történő alkalmazása kapcsán a sejtek életképességének körültekintő monitorozása szükséges.

### ***Antimikrobiális peptidek immun- és redox-modulátor hatásai***

Az önállóan alkalmazott peptidek gyulladásos mediátorokra gyakorolt moduláló aktivitását a **3. táblázat**ban foglaltam össze.

**3. táblázat.** A gyulladásos válasz modulálása céljából **önállóan alkalmazott antimikrobiális peptidek (AMP-k)** által a különböző sejtmodelleken kiváltott gyulladásos citokinkoncentráció-változások áttekintése. A felfelé mutató nyíl a koncentráció szignifikáns növekedését, a lefelé mutató nyíl a koncentráció szignifikáns csökkenését jelzi a kontrollcsoporthoz képest ( $P < 0,05$ ). A szürkével jelzett mérésekre nem került sor, a kihúzott cellák esetében nem volt szignifikáns eltérés. A rövidítések magyarázata a szövegben található.

AMP		IL-1 $\beta$	IL-2	IL-6	CXCLi2/ IL-8	IL-10	IFN- $\gamma$	RANTES	M-CSF	TGF- $\beta$ 1
<b>Katelicidin-2</b>	Csirke máj				↑	↑	↑		↓	
	Csirke bél		↑	↑	↑	-	-			
<b>IDR-1002</b>	Csirke máj			↓	-	↓	-	↑	↑	
	Csirke bél		↑		↑	-	-	-		
	Sertés máj	↓		↓	↓					
<b>Pap12-6</b>	Csirke máj			-	↓	-	-	-		
	Csirke bél		↑	-	-		-	-		-
<b>Cekropin A</b>	Csirke máj			↓	↓	↓	↓			↓
	Csirke bél		↑	-	-		-	-		-

A katelicidin-2 a tápfolyadékhoz adva önmagában döntően proinflammatorikus, immunaktivációval járó hatást gyakorolt mind a csirke hepatikus kokultúrákra, mind a csirke vékonybélből származó szövettenyészetekre. Az IDR-1002, a Pap12-6 és a cekropin A peptidekkel kezelt csirke májsejtek (továbbá az IDR-1002 esetén a sertés májsejtek) citokinprofilja nagyrészt anti-, a csirke explantok tápfolyadékának citokinösszetétele pedig proinflammatorikus irányba változott, míg a PR-39 nem befolyásolta érdemben a sejtek gyulladásos homeosztázisát (**3. táblázat**). A csirke bélnyálkahártya-kultúrák esetében tehát mind a négy tesztelt peptid gyulladáskeltő hatást fejtett ki, míg a májon csak a katelicidin-2 rendelkezett ilyen tulajdonsággal. Az explantokon tapasztalt immunstimuláns aktivitás mindegyik peptid esetén megmutatkozott az IL-2 emelkedett koncentrációjában, a katelicidin-2 és az IDR-1002 pedig további citokinek leadásának fokozásával még kifejezettebb proinflammatorikus hatással bírt. Az IL-2 fontos szerepű a bél immunhomeosztázisának fenntartásában a  $T_{reg}$ -sejtekre gyakorolt hatásokon keresztül, így az AMP-k IL-2-leadásra gyakorolt serkentő hatása nem tekinthető egyértelműen proinflammatorikus irányúnak, hanem sokkal inkább az adekvát immunválasz kialakítását elősegítő immunstimulációt jelent. A máj és bél eredetű modellek önálló AMP-kezelésre adott válasza közötti markáns különbség pedig a sejt- és szövetspecifikus eltérések fontosságára hívja fel a figyelmet.

Az immunmodulátor aktivitások tanulmányozására a legfontosabb rendszert az AMP által a PAMP-expozícióval kiváltott gyulladásos állapotra gyakorolt moduláló hatás vizsgálata jelenti, melynek eredményeit a **4. táblázat**ban mutatom be. A katelicidin-2 a csirke bél eredetű sejtmodellel túlnyomórészt gyulladáscsökkentő hatást fejtett ki LTA kiváltotta gyulladás esetén. Így mérsékelte az LTA-kezelés következtében emelkedett IL-2- és IL-6-koncentrációt, valamint az IFN- $\gamma$ /IL-10 arányt, az utóbbit az IL-10-termelés fokozásán keresztül. Árnyalja a képet, hogy a felsorolt hatásokkal ellentétben a peptid tovább emelte az LTA kiváltotta CXCLi2-csúcsot. A csirke máj eredetű kokultúrán jóval komplexebb kép rajzolódik ki a katelicidin-2 immunmoduláló hatásával kapcsolatban: gyulladáscsökkentő irányba mutat, hogy a peptid mérsékelte a májsejtek LTA hatására emelkedett IFN- $\gamma$ -leadását, viszont a PMA-expozíció nyomán megnövekedett, antiinflammatorikus jellegű M-CSF-termelés csökkentése, valamint PMA jelenlétében a tápfolyadék CXCLi2-koncentrációjának növelése, ill. LTA-val egyidejűleg adva az IL-10-termelés csökkentése a gyulladásos reakció fokozására utal. Eredményeinket összefoglalva, a katelicidin-2 önmagában adva a csirke eredetű máj- és bélmodelleken is nagyrészt immunstimuláló, míg gyulladás esetén a májsejteken vegyes, inkább proinflammatorikus irányú immunmodulátor hatású, a vékonybél-nyálkahártyán pedig hatékony gyulladáscsökkentő aktivitású peptidnek bizonyult (**4. táblázat**).

**4. táblázat.** A gyulladásos válasz modulálása céljából **gyulladáskeltő vegyületekkel kombinációban alkalmazott antimikrobiális peptidek** (AMP-k) által a különböző sejtmódellen kiváltott gyulladásos citokinkoncentráció-változások áttekintése. A felfelé mutató nyíl a koncentráció szignifikáns növekedését, a lefelé mutató nyíl a koncentráció szignifikáns csökkenését jelzi a kontrollcsoporthoz képest ( $P < 0,05$ ). A szürkével jelzett mérésekre nem került sor, a kihúzott cellák esetében nem volt szignifikáns eltérés. A kék háttér a gyulladáskeltő vegyület hatásának ellensúlyozását, a rózsaszín háttér annak erősítését jelzi. A rövidítések magyarázata a szövegben található.

AMP	Sejtmodell	IL-1 $\beta$	IL-2	IL-6	CXCLi2/ IL-8	IL-10	IFN- $\gamma$	RANTES	M-CSF	TGF- $\beta$ 1
<b>Katelicidin-2</b>	Csirke máj				↑	↓	↓		↓	
	Csirke bél		↓	↓	↑	↑	-			
<b>IDR-1002</b>	Csirke máj			↓	↓	↓	↓	↑	↑	
	Csirke bél		↓		↓	↑	↑	↓		
	Sertés máj	↑		↑	↑					
<b>Pap12-6</b>	Csirke máj			↓	↓	-	-	↓		
	Csirke bél		↑	-	↑		↓	↑		-
<b>Cekropin A</b>	Csirke máj			↓	-	↓	↓			-
	Csirke bél		↑	↓	-		-	-		-

Az IDR-1002 a csirke eredetű hepatikus és enterális modellen is túlnyomórészt gyulladáscsökkentő hatásokat mutatott az LTA-val modellezett gyulladás során. A májsejteken csökkentette az LTA kiváltotta IL-6-, CXCLi2- és IFN- $\gamma$ -csúcsokat, az explantokon pedig mérsékelte az IL-2, a CXCLi2 és a RANTES endotoxinhatásra emelkedett koncentrációját. Mindkét modellen tapasztaltunk ezzel ellentétes, proinflammatorikus irányba mutató hatást (LTA hatására emelkedett RANTES-koncentráció tovább növelése a májsejteken, ill. LTA kiváltotta IFN- $\gamma$ -csúcs tovább emelése a bélben), de további, LTA jelenlétében megfigyelhető gyulladáscsökkentő jellegű hatásokat is, így összességében egyértelműen a bakteriális endotoxin kiváltotta immunválasz mérséklése határozza meg az összképet. Mindezzel szemben sertés májon az IDR-1002 következetesen és markánsan fokozta az LPS kiváltotta gyulladásos citokinválaszt, tovább növelve az IL-1 $\beta$ , az IL-6 és az IL-8 endotoxinhatásra emelkedett extracelluláris koncentrációját. Különösen az IL-8 esetében tapasztaltunk robosztus proinflammatorikus aktivitást, a 90  $\mu$ g/ml IDR-kezelés ugyanis több, mint húszszorosára növelte meg a felülúszó IL-8-koncentrációját a csak LPS-sel kezelt sejtenyészetekhez képest.

Összegezve tehát, a kifejezetten kedvező citotoxicitási és potens immunmodulátor tulajdonságokkal rendelkező IDR-1002 a csirke hepatocita – NP sejt kokultúrákon önállóan és endotoxin kiváltotta gyulladásos válasz esetén is antiinflammatorikus, a csirke vékonybélből izolált explantokon önmagában gyulladáskeltő, LTA indukálta gyulladás esetén viszont gyulladáscsökkentő, a sertés hepatikus modellen pedig önállóan anti-, míg endotoxinexpozíció esetén proinflammatorikus hatással bírt (**4. táblázat**).

A Pap12-6 poly I:C kiváltotta gyulladás esetén a csirke májsejteken egyértelműen gyulladáscsökkentő tulajdonsággal rendelkezett, hiszen csökkentette a poly I:C indukálta IL-6- és RANTES-csúcsokat, és az CXCLi2-re is csökkentő hatással volt. A csirke bél eredetű explantokon komplexebb kép bontakozott ki a poly I:C hatására emelkedett IFN- $\gamma$ -koncentráció csökkentése, ugyanakkor az IL-2, CXCLi2 és RANTES leadásának fokozása révén. Tehát a Pap12-6 a csirke hepatikus modellen mind önállóan, mind poly I:C-vel kombinálva gyulladáscsökkentő, az enterális szövetenyszeteken pedig poly I:C-nek kitett és ki nem tett explantokon is inkább gyulladáskeltő aktivitásúnak bizonyult (**4. táblázat**).

A cekropin A a csirke eredetű hepatocita – NP sejt kokultúráján önállóan és poly I:C jelenlétében is nagyrészt antiinflammatorikus hatásokat mutatott, az utóbbi esetben a poly I:C kiváltotta fokozott IFN- $\gamma$ -leadás mérséklése különösen fontosnak tekinthető. A peptid a csirke bélmodellen kevésbé kifejezett immunmoduláns aktivitással rendelkezett: önmagában alkalmazva az IL-2-koncentráció emelésére szorítókozó enyhe immunstimuláns, míg poly I:C-vel kombinálva az IL-2-leadás növelése és az IL-6-koncentráció csökkentése révén egyértelműen be nem sorolható irányú változásokat okozott, viszont nem befolyásolta a poly I:C kiváltotta IFN- $\gamma$ - és RANTES-csúcsokat (**4. táblázat**). A PR-39 peptid pedig – a szakirodalomban leírt potens immunmodulátor szerepe ellenére – sem önállóan, sem LPS-sel

kombinálva nem befolyásolta a sertés vékonybél eredetű explantok citokintermelését (4. táblázat).

Az egyes AMP-k (a PR-39 kivételével) a tapasztaltak alapján potens, komplex immunmodulátor hatást mutatnak, amelynek módja és mértéke függ az állatfajtól, a modellezett szervtől, a gyulladásos állapottól és az alkalmazott koncentrációtól is. Kísérleteink igazolták, hogy a létrehozott sejtmodellek alkalmasak a csirke és sertés májában, ill. béllyákhártyájában zajló gyulladásos folyamatok befolyásolásának nyomon követésére, így immunmodulátor, gyulladáscsökkentő hatóanyagjelöltek tesztelésére. Az AMP-k alkalmazása a gyulladásos sejtválasz befolyásolása révén hozzájárulhat a hatékony immunfolyamatok, és a proinflammatorikus citokincscúcsok mérséklése révén a megfelelő gyulladásos reakció kialakításához. Eredményeink alapján az IDR-1002 különösen ígéretes jelöltnek tűnik a csirke enterális és hepatikus immunválaszának modulálására. Továbbá a Pap12-6 és a cekropin A csirke májsejtekre gyakorolt hatásai, valamint a katelicidin-2 által az enterális gyulladásos válaszra csirkében kifejtett hatások szintén biztató eredményeknek számítanak.

A jövőben érdemes lenne az *in vitro* kísérleteink során hatékonynak bizonyult peptideket *in vivo* kísérletekben is vizsgálni, azonban ehhez – különösen a hepatikus és a szisztémás gyulladásos válasz tekintetében – fontos figyelembe venni a molekulák kinetikai paramétereit is. A kisméretű, lipofilebb, valamint emésztőenzimeknek jobban ellenálló mesterséges AMP-k (pl. IDR-1002, Pap12-6) vélhetően előnyösebb kinetikai paraméterekkel rendelkeznek, így ezek élő állatban történő alkalmazása (különösen az enterális immunitás befolyásolása céljából) könnyebben megvalósíthatónak tűnik. Ugyanakkor a későbbi esetleges készítmény-fejlesztésekhez új, a kedvező toxicitási és hatástani eredményeket megtartó, de még jobb felszívódású és megoszlású AMP-származékok tervezése és tesztelése is további új perspektívát jelenthet.

#### **4.4. Gyulladásos válasz modulálása probiotikumok segítségével**

A PAMP-ok keltette gyulladás vizsgálatát követően a csirke béllyákhártya eredetű modell továbbfejlesztésével explant – baktérium kokultúrát hoztunk létre, melyen nem csupán sejtfaalkotókkal, hanem élő baktériumok segítségével váltottunk ki gyulladásos választ. A baktériumokkal történő kokultiváció az összesen 8 óra hosszúságú inkubációs idő alatt nem befolyásolta a szövettanyészet fenntarthatóságát és a sejtek morfológiáját, így a modell megfelelőnek bizonyult vizsgálatainkhoz. A *Salmonella* Enteritidis-expozícióval sikeresen váltottunk ki gyulladásos választ az explantokon, melyet az IL-1 $\beta$ , CXCLi2, IL-18 és TNF- $\alpha$  megnövekedett génexpressziója, valamint az IL-10 gén csökkent kifejeződése mutat. A protektív céllal alkalmazott *Limosilactobacillus reuteri* probiotikus törzsszel történt előkezelés hatékonyan mérsékelte az IL-1 $\beta$  és az IL-18 megnövekedett, valamint az IL-10 csökkent génexpresszióját, viszont tovább növelte a CXCLi2 kifejeződését, illetve fokozta az IL-15 és a transzformáló növekedési faktor (TGF)- $\beta$ 4 expresszióját.

Eredményeink rámutatnak arra, hogy az explant – baktérium kokultúra megfelelő modellrendszerként szolgál az enteropatogén baktériumok bélnyálkahártyára kifejtett gyulladáskeltő hatásának, valamint a probiotikus mikroorganizmusok moduláló aktivitásának vizsgálatára. A *L. reuteri* kísérletünkben megfigyelt pro- és antiinflammatorikus hatásai hasonló mintázatot mutatnak az egyes AMP-k komplex immunmoduláló tulajdonságaihoz. A probiotikus baktériumtörzs döntő többségében mérsékli a *Salmonella* kiváltotta gyulladáshoz szükséges citokinsúcsokat (IL-1 $\beta$  és IL-18) és normalizálja a csökkent IL-10 expressziót, azaz elősegíti az adekvát gyulladáshoz szükséges válasz kialakítását, és megakadályozza a citokinexpresszió jelentős kilengéseit. Emellett a *L. reuteri* önmagában való alkalmazása (IL-1 $\beta$ , IL-18), ill. *Salmonella*-expozícióval történő kombinálása (CXCLi2, IL-15 és TGF- $\beta$ 4) a jelzett citokinek up-regulációja révén a törzs immunstimuláns, proinflammatorikus irányú tulajdonságára utalnak, szintén hasonlóan számos AMP jellegzetes moduláló hatásaihoz. Fontos azonban megjegyezni, hogy az enterális kokultúrán végzett kísérlet során a citokinek génexpressziós szinten vizsgáltuk, és a tanulmányozott citokinprofil részben eltért az explantokon mértektől, így az eredmények összevetése az AMP-k esetén nyert adatokkal csak korlátozottan lehetséges.

Eredményeinket összegezve tehát a csirke ileumból izolált explant szövettenyésztet baktériumokkal kokultúrát alkotva megfelelő *in vitro* rendszert képez a salmonellosis esetén jellemző bélgyulladás modellezésére, valamint a probiotikumok immunmodulátor hatásainak tanulmányozására. A rövid idejű *S. Enteritidis*-expozíció a sejtmorfológia károsítása nélkül váltott ki proinflammatorikus citokinválaszt (IL-1 $\beta$ , IL-18, CXCLi2, TNF- $\alpha$ ), melyet a *L. reuteri* előkezelés hatékonyan mérsékelt az IL-1 $\beta$  és IL-18 kifejeződését csökkentve, ugyanakkor egyes gyulladáskeltő (CXCLi2, IL-15) és gyulladásgátló (TGF- $\beta$ 4) mediátorok fokozódó génexpressziója révén immunstimuláns hatással is bírt.

#### **4.5. Hőstressz és mikotoxinok hatásának vizsgálata**

A fertőzésekhez csatlakozó gyulladáshoz vezető folyamatok mellett a csirke eredetű hepatikus modellen a hőstressz – mint nagy relevanciával bíró környezeti eredetű stresszor – sejtkárosító hatásait is vizsgáltuk, ezzel igazolva, hogy a sejtmódel alkalmas a hőstressz kiváltotta stresszválasz kutatására is. A kifejezetten rövid idejű, egy óra időtartamú hőkezelés – a sejtek életképességének csökkentése nélkül – markánsan deprimálta a tápfolyadékba leadott IL-6 és CXCLi2 mennyiségét, utalva a hőstressz hatására megfigyelhető erőteljes immunszuppresszióra. Kétórás hőstresszt követően azonban a májsejtek – vélhetően a fokozott hő sokfehérje (HSP)70-felhasználás által is tükrözött intenzív hő sokfehérjeválasz, valamint a metabolikus adaptáció és az antioxidáns rendszerek aktiválódása révén – eredményesen alkalmazkodtak a körülményekhez, ami az egyes paraméterek normalizálódásához vezetett. A hőstressz kiváltotta hepatikus immunszuppresszió eredményesen mérsékelhető volt a májsejtek kurkumakivonattal történő kezelésével, amely – feltételezhetően a HSP-rendszer egyes tagjainak eredményeink által is igazolt modulálása révén (HSP27 és HSP90 fokozódott, HSP70 csökkent kifejeződése) –

megnövelte a proinflammatorikus IL-6 és IFN- $\gamma$ , valamint az antiinflammatorikus IL-10 és M-CSF koncentrációját is.

A hepatocita – NP sejt kokultúra alkalmasnak bizonyult a baromfitartásban nagy gyakorlati jelentőséggel bíró T-2 toxin sejtkárosító hatásainak vizsgálatára is, azaz toxikológiai kísérletek számára is megfelelő *in vitro* modellként szolgálhat. A tartósabb mikotoxinexpozíció tanulmányozására hosszabb fenntarthatóságuk miatt a 3D szferoidok megfelelőbbnek tűnnek, de az értekezésben a jobb összehasonlíthatóság érdekében a legfeljebb 24 órás inkubáció eredményeit vetettük össze a 2D és 3D kokultúrákon. A szubletális T-2-toxinkoncentrációk széles spektrumának kitett 2D kokultúrák 8 órás inkubáció után fokozott IL-6- és CXCLi2-termelést mutattak, ami – a hőstresszhez hasonlóan toxinhatás esetén is tapasztalt hatékony adaptáció következtében – 24 órát követően már nem volt megfigyelhető.

A 3D szferoidok ehhez képest lassabb alkalmazkodási potenciált és diverzebb képet mutattak: ezek IL-6-leadása csökkent, IL-8-termelése nőtt 24 órás toxinkezelés után. Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy az oxidatív stressz nem tölt be központi mediáló szerepet a T-2 toxin májsejtekre gyakorolt hatásaiban, mert a 2D sejttenyészetben nem változott a tápfolyadék H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-koncentrációja, a 3D modellen pedig – vélhetően az adaptációs mechanizmusokból fakadó túlkompensáció miatt – csökkent a malondialdehid (MDA) és a protein-karbonil (PC) koncentrációja. A szferoidok metabolomikai analízise azt mutatja, hogy a toxinexpozíció hatására megváltozott a membránalkotó foszfolipidek zsírsavösszetétele, valamint emelkedett a gyulladáshoz- és oxidatív stresszmarker alfa-aminoadipinsav koncentrációja, tehát a T-2 toxin kompenzált, oxidatív distresszt nem okozó, de egyes molekuláris markerekkel kimutatható „szubklinikai” jellegű prooxidáns hatással bírt.

#### **4.6. A gyulladáshoz- és oxidatív stresszválasz összefüggései**

A gyulladáshoz- és oxidatív stresszválasz összefüggéseinek feltárására a gyulladáshoz mediátorok mellett számos kísérlet során nyomon követtük egyes redox paraméterek alakulását is. A gyulladáshoz és redox paraméterek által követett hasonló mintázatot tapasztaltuk több kísérletben is, így a katelicidin-2 a csirke májsejtmodellen – az IFN- $\gamma$ -hoz hasonlóan – önállóan alkalmazva megnövelte a tápfolyadék H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-koncentrációját, LTA-val kombinálva azonban már mérsékelte az endotoxin kiváltotta oxidatív stresszt. Az IDR-1002 ugyanebben az *in vitro* rendszerben mind önmagában, mind LTA-expozíció mellett az Nrf2-jelpálya – eredményeink által is alátámasztott – aktiválása révén antioxidáns hatást mutatott, ami a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-koncentráció csökkenésében nyilvánult meg, hasonlóan a felülúszóba leadott IL-6 és IL-10 mennyiségének alakulásához, ill. a CXCLi2 és IFN- $\gamma$  a kontrolltól szignifikánsan nem különböző, de jellegzetes mintázatához. A Pap12-6 reaktív oxigénfajta (ROS) leadását mérséklő hatása pedig poly I:C-vel kombinációban volt megfigyelhető, az IL-6- és RANTES-koncentráció, valamint az IL-6/IL-10 arány alakulását követve. A cekropin A esetében viszont nem tapasztaltuk a gyulladáshoz és redox paraméterek szinkronban történő változását, így a peptid kiváltotta enyhe, de szignifikáns H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-szintemelkedést nem kísérte a mért citokinek és az MDA koncentrációjának

növekedése. Eredményeink alapján tehát a vizsgált AMP-k nem csak immun-, hanem redox modulátor tulajdonságokkal is rendelkeznek, és elősegítik a fertőzések hatékony legyőzéséhez szükséges oxidatív eustressz fenntartását. Mindezekkel szemben hőstressz esetén az egy órás hőkezelés hatására az erősen szupresszált IL-6- és CXCLi2-koncentrációkkal negatívan korrelálva emelkedett a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mennyisége, amely két óra után normalizálódott, így mindez utalhat az oxidatív stressz immunszupresszióban betöltött mediáló szerepére. Fontos azonban megjegyezni, hogy az oxidatív homeosztázist csak egyes kísérletek során vizsgáltuk, és jóval kevesebb paraméter mérésére nyílt lehetőség, mint a citokinek esetében, így a következtetések levonása során is mértéktartóbbnak kell lennünk.

A doktori műben bemutatott eredményeket összegezve, sikeresen hoztunk létre máj és bél eredetű primer, jellemzett és jól reprodukálható sejtmodelleket csirkéből és sertésből, melyek alkalmasnak bizonyultak a PAMP-ok kiváltotta gyulladás, valamint a hőstressz és a T-2 toxin sejtszintű hatásainak követésére, továbbá az AMP-k immunmodulátor hatásának tesztelésére. Az értekezés szerzője bízik benne, hogy a bél-máj tengely vizsgálatára kialakított modellek a jövőben számos további *in vitro* kísérlet számára megfelelő alapot nyújtanak. A kísérletek eredményei jelentősen bővítették a patogén mikroorganizmusok által csirkében és sertésben kiváltott enterális és hepatikus immunválaszra, valamint a hőstressz és a trichotecének sejtkárosító hatásaira vonatkozó ismereteinket. Feltártuk továbbá egyes AMP-k, probiotikumok és növényi kivonatok potens immun-, ill. redox modulátor hatásait, mely eredmények – alaptudományi jelentőségük mellett – hozzájárulhatnak új, alternatív, a fertőzések legyőzését a szervezet védekező rendszereinek modulálásával elősegítő hatóanyagok fejlesztéséhez. Ezzel reményeim szerint elősegíthetjük az antibiotikumfelhasználás csökkentését és lassíthatjuk az antimikrobiális rezisztencia terjedését, egyben hozzájárulva a gazdasági haszonállatok egészségének, jóllétének és termelékenységének javításához is.

## 5. Új tudományos eredmények

Az értekezésben bemutatott kísérletek legfontosabb új tudományos eredményeit az alábbiakban foglalom össze:

1. A létrehozott csirke és sertés eredetű primer hepatocita – nem-parenchymális sejt kokultúra és vékonybél-nyálkahártyából nyert explant szövettenyészet olyan primer sejtmodellek, melyek alkalmasak a gyulladásos- és az oxidatív stresszválasz sejt szintű folyamatainak, valamint immun- és redox modulátor vegyületek hatásainak *in vitro* vizsgálatára.
2. A csirke és sertés eredetű sejtmodellek eltérő érzékenységet mutattak a bakteriális endotoxinokkal szemben. Az *Escherichia coli* eredetű lipopoliszacharid (LPS) gyulladásos választ váltott ki a sertés eredetű hepatocita – nem-parenchymális sejt kokultúrán és vékonybél explant szövettenyészetén, míg a csirke eredetű sejtmodelleken nem bizonyult gyulladáskeltőnek. A *Staphylococcus aureus* eredetű lipoteichosav (LTA) proinflammatorikus tulajdonsággal rendelkezett a csirke máj és bél, valamint a sertés máj eredetű sejtmodelleken, míg a sertés ileumból izolált explantokon nem váltott ki gyulladásos választ.
3. Az egyes antimikrobiális peptidek önmagukban alkalmazva a sejt- és szövettenyészeteken egyes esetekben gyulladáskeltő, immunstimuláns hatást (katelicidin-2 csirke máj és bél modellen, IDR-1002, Pap12-6 és cekropin A csirke bél modellen), míg más esetekben gyulladáscsökkentő aktivitást (IDR-1002, Pap12-6 és cekropin A csirke máj modellen és az IDR-1002 sertés máj modellen) mutattak.
4. Az IDR-1002 LTA kiváltotta gyulladás esetén a csirke máj és bél eredetű modellen egyaránt elsősorban gyulladáscsökkentő hatással bírt, a sertés máj modellen azonban proinflammatorikus hatást fejtett ki LPS által keltett gyulladás során. A Pap12-6 a csirke máj modellen gyulladáscsökkentő tulajdonsággal bírt poly I:C kiváltotta gyulladás esetén, azonban a csirke eredetű enterális modellen inkább gyulladáskeltő aktivitásúnak bizonyult.
5. A rövid távú, egy óra időtartamú hőstressznek kitett, csirke eredetű hepatikus sejttenyészetek – nagy mértékben csökkent citokinleadással járó – stresszválasza hatékonyan modulálható volt kurkumakivonat hozzáadásával, amely a gyulladásos mediátorok és a hősokkfehérjék mennyiségét is befolyásolta.
6. A szubletális dózisban alkalmazott T-2 toxin 8 órás expozíciója fokozott gyulladásos citokin-leadást váltott ki a csirke eredetű kétdimenziós májsejttenyészeteken, amely 24 órás inkubációt követően már nem volt észlelhető. A T-2 toxin alkalmazása egyik sejtmodellen sem járt oxidatív stressz kialakulásával, viszont a háromdimenziós szferoidok foszfolipidjeinek zsírsavösszetételében történt változások, és az alfa-adipinsav emelkedett koncentrációja mérsékelt prooxidáns hatásra utalnak.

7. Kokultúrát hoztunk létre csirke vékonybél eredetű explantokból és baktériumokból, melyen gyulladáshoz vezetett ki *Salmonella* Enteritidis segítségével. Ennek során megnőtt egyes gyulladáshoz vezető citokinek génexpressziója, amit a probiotikus *Limosilactobacillus reuteri* törzssel történt előkezelés hatékonyan mérsékelte. A kokultúra megfelelő modellként szolgálhat az enteropatogén és probiotikus baktériumok bélnyálkahártyára gyakorolt hatásainak vizsgálatára, a *L. reuteri* pedig hatékony immunmodulátor lehet brojlércsirkék *Salmonella*-fertőzése esetén.

## 6. Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények

Karaffová, V., Kiššová, Z., Tóthová, C., Tráj, P., Mackei, M., & Mátis, G. (2025). *Limosilactobacillus reuteri* B1/1 modulated the intestinal immune response in preventing *Salmonella* Enteritidis PT4 infection in a chicken ileal explant model. *Veterinary Research Communications*, 49(1), 32. Q1; IF: 2,0

Kiššová, Z., Mátis, G., Mackei, M., Tráj, P., Márton, R. A., Horváth, D. G., ... & Karaffová, V. (2025). Research note: utilizing a novel chicken ileal explant model to assess the efficacy of probiotic *Limosilactobacillus reuteri* CCM 9425 against *Salmonella* Enteritidis infection. *Poultry Science*, 104(4), 104909. D1; IF: 4,2

Mackei, M., Márton, R. A., Kámán-Tóth, E., Kemény, Á., Jerzsele, Á., Hohmann, J., Veres, K., Vigh, L., Török, Zs., Hunya, Á., & Mátis, G. (2025). Phytogetic modulation of cellular heat stress markers: effects of turmeric and ginger extracts in chicken hepatocytes. *Frontiers in Veterinary Science*, submitted for publication.

Mackei, M., Molnár, A., Nagy, S., Pál, L., Kővágó, C., Gálfí, P., ... & Mátis, G. (2020). Effects of acute heat stress on a newly established chicken hepatocyte—nonparenchymal cell co-culture model. *Animals*, 10(3), 409. Q1; IF: 2,752

Mackei, M., Orban, K., Molnar, A., Pal, L., Dublicz, K., Husveth, F., ... & Mátis, G. (2020). Cellular effects of T-2 toxin on primary hepatic cell culture models of chickens. *Toxins*, 12(1), 46. Q1; IF: 4,546

Márton, R. A., Sebők, C., Mackei, M., Tráj, P., Vörösházi, J., Kemény, Á., ... & Mátis, G. (2024). Cecropin A: investigation of a host defense peptide with multifaceted immunomodulatory activity in a chicken hepatic cell culture. *Frontiers in Veterinary Science*, 11, 1337677. D1; IF: 2,9

Márton, R. A., Sebők, C., Mackei, M., Tráj, P., Vörösházi, J., Kemény, Á., ... & Mátis, G. (2024). Pap12-6: A host defense peptide with potent immunomodulatory activity in a chicken hepatic cell culture. *Plos One*, 19(5), e0302913. Q1; IF: 2,6

Márton, R. A., Tráj, P., Mackei, M., Sebők, C., Vörösházi, J., Kemény, Á., ... & Mátis, G. (2025). Exploring the impact of the host defense peptide Pap12-6 on immune response and epithelial integrity in chicken-derived ileal explant cultures. *Poultry Science*, 105376. D1; IF: 4,2

Mátis, G., Kulcsár, A., Petrilla, J., Talapka, P., & Neogrády, Z. (2017). Porcine hepatocyte—Kupffer cell co-culture as an *in vitro* model for testing the efficacy of anti-inflammatory substances. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101(2), 201-207. Q2; IF: 1,607

Mátis, G., Lajos, A., Mackei, M., Kemény, Á. & Neogrády, Zs. (2025). The pro-inflammatory action of different pathogen-associated molecular patterns on porcine hepatic and intestinal cell cultures. *Animal*, submitted for publication.

Mátis, G., Sebők, C., Horváth, D. G., Márton, R. A., Mackei, M., Vörösházi, J., ... & Tráj, P. (2025). Miniature chicken ileal explant culture to investigate the inflammatory response induced by pathogen-associated molecular patterns. *Frontiers in Veterinary Science*, *12*, 1484333. D1; IF: 2,9

Mátis, G., Tráj, P., Hanyecz, V., Mackei, M., Márton, R. A., Vörösházi, J., ... & Sebők, C. (2024). Immunomodulatory properties of chicken cathelicidin-2 investigated on an ileal explant culture. *Veterinary Research Communications*, *48*(4), 2527-2535. Q1; IF: 2,0

Sebők, C., Tráj, P., Mackei, M., Márton, R. A., Vörösházi, J., Kemény, Á., ... & Mátis, G. (2023). Modulation of the immune response by the host defense peptide IDR-1002 in chicken hepatic cell culture. *Scientific Reports*, *13*(1), 14530. D1; IF: 3,8

Sebők, C., Tráj, P., Vörösházi, J., Mackei, M., Papp, M., Gálfi, P., ... & Mátis, G. (2021). Two sides to every question: attempts to activate chicken innate immunity in 2D and 3D hepatic cell cultures. *Cells*, *10*(8), 1910. Q1; IF: 7,666

Sebők, C., Walmsley, S., Tráj, P., Mackei, M., Vörösházi, J., Petrilla, J., ... & Mátis, G. (2022). Immunomodulatory effects of chicken cathelicidin-2 on a primary hepatic cell co-culture model. *Plos One*, *17*(10), e0275847. Q1; IF: 3,7

Vörösházi, J., Mackei, M., Sebők, C., Tráj, P., Márton, R. A., Horváth, D. G., ... & Mátis, G. (2024). Investigation of the effects of T-2 toxin in chicken-derived three-dimensional hepatic cell cultures. *Scientific Reports*, *14*(1), 1195. Q1; IF: 3,9

## 7. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretném kifejezni hálámat Dr. Neogrády Zsuzsanna docens asszonynak, aki a kezdetektől fogva maximálisan támogatott, PhD-témavezetőmként és a Biokémiai Osztály vezetőjeként segítette oktató-kutatói pályámat. Zsuzsa mindig fáradhatatlanul, végtelen munkabírással és lelkesedéssel, igazi harcostársként állt mellettem az évek során, és áll mellettünk ma is, emberi és szakmai szempontból is példát mutatva. Hálás köszönettel tartozom Dr. Sótonyi Péter rektor úrnak, akitől az oktatás szeretetét, a kitartás és a hit fontosságát tanultam, aki mindig támogatott, szükség esetén védőernyőt nyújtott számunkra, és – egyetemi közéleti feladataim alól mentesítve – lehetővé tette, hogy a számomra igazán kedves oktató- és kutatómunkára összpontosíthassak, és megírjam az akadémiai doktori értekezésemet. Hálásan gondolok vissza Dr. Kutas Ferenc professzor úr bölcs gondolataira, aki kiváló előadóként az oktatás szenvedélyét hagyta örökül számomra. Köszönöm Dr. Vereseyházy Tamás docens úrnak, hogy megszerettette velem a Biokémiát, és nagyszerű előadásain ülve érett meg bennem a gondolat, hogy egyszer majd én is itt szeretnék dolgozni. Köszönettel tartozom Dr. Gálfy Péter professzor úrnak, hogy PhD-tanulmányaim során támogatott, és segített elindulni kutatói pályámon.

A „Biokémiát” mindig a családi légkör és a valódi munka megbecsülése jellemezte, büszke vagyok arra, hogy az Osztály vezetőjeként, egy rendkívül motivált és sikeres csapatot irányítva én is ezt az értékrendet képviselhetem. Munkatársaim közül különös hálával tartozom Dr. Mackei Máté adjunktus kollégámnak, aki nem csak kreatív ötleteivel, ill. a kutatásban és az oktatásban egyaránt kiváló munkájával, hanem igaz barátként is mellettem áll, és akivel mindig számíthatunk egymásra. Hálával tartozom volt és jelenlegi munkatársaimnak – Dr. Kulcsár Annának, Dr. Papp-Sebők Csillának, Dr. Tráj Patriknak, Dr. Márton Regének, Vörösházi Júliának, Dr. Kemény Ágnesnek, Dr. Kámán-Tóth Evelinnek, Dr. Lajos Andreának, Kulcsárné Dr. Petrilla Jankának, Dr. Barna Rékának és Dr. Hatala Patrícianak – a jó hangulatú, eredményes közös munkáért és az inspiráló közös gondolkodásért.

Köszönettel tartozom a velünk együttműködő kutatótársaknak a pályázatok és kutatási projektek megvalósításában nyújtott rengeteg segítségért. Külön köszönöm Dr. Husvéth Ferenc, Dr. Dublicz Károly, Dr. Pál László és Dr. Nagy Szabolcs professzor uraknak, valamint Dr. Molnár Andor barátomnak (MATE Georgikon Campus), Dr. Fébel Hedvig (MATE, majd ÁTE) és Dr. Korinna Huber (Hohenheimer Egyetem, Stuttgart) professzor asszonyoknak, valamint Dr. Viera Karaffová és Dr. Zsuzsanna Kiššová (Kassai Állatorvosi és Gyógyszerészeti Egyetem) kollégáimnak az évek során végzett eredményes közös munkát.

Nem kevésbé fontos, hogy a magánéletben is mindig szerető, támogató családi közeg vett körül, ami biztos alapot és nyugodt háttérrel biztosított a munkámhoz. Hálás szívvel köszönöm azt a rengeteg szeretetet és türelmet, amelyet menyasszonyomtól, Béres Emesétől kaptam. Emese mindig feltétel nélkül támogatott a munkámban és biztatott az értekezés megírására, megértően fogadva, hogy még a Kilimandzsárón túrázva, vagy otthon éjszaka is

előkerült a laptop, és a „nagydoktori” írása kötötte le a figyelmemet. Köszönöm szépen édesanyám, Mátné Szultos Erzsébet szerető támogatását, és hálás vagyok azért, hogy tőle és édesapámtól a tanári pálya szeretetét is örökölhettem. Hálás szívvel emlékezem édesapámra, Mátis Ferencre, aki mindig a legnagyobb érdeklődéssel követte a munkámat, segített az ábrák szerkesztésében, és lelkesen szurkolt a PhD-védésemen és a habilitációmon is. Sajnos pályám elmúlt éveit és az MTA doktori értekezésem megírását nem érthette meg, de biztos vagyok benne, hogy odafentről most is ugyanúgy szorít és örül a sikereinknek.

Kutatásainkhoz elengedhetetlen szükség volt azokra a pályázatokra, melyeket az elmúlt évek során elnyertünk. A számos pályázat közül kiemelve köszönöm az NKFIH OTKA 114033., 124586. és 134940. pályázatok, az ÁTE által meghirdetett belső kutatási pályázatok, valamint az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj támogatását.