

**Chlamydia szaporodás vizsgálatára alkalmas, új módszer kifejlesztése és  
használata anti- és pro-chlamydiális anyagok hatásának vizsgálatára**

A Ph.D. értekezés tézisei

**Varga-Bogdanov Anita M.Sc.**

Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet  
Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet  
Általános Orvostudományi Kar  
Szegedi Tudományegyetem



Témavezetők:

Professzor Dr. Deák Judit Ph.D.  
Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet  
Szegedi Tudományegyetem

Dr. Virók Dezső Ph.D.  
Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet  
Általános Orvostudományi Kar  
Szegedi Tudományegyetem

Szeged  
2017

## 1 Bevezetés

A szexuálisan terjedő fertőzések (STI) a leggyakoribb fertőző betegségek a világon. Az STI-k között a *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) eredetű fertőzések a legelterjedtebbek. A *C. trachomatis* D-K szerovariánsai okozhatnak, mint az urethritis, cervicitis, kismencei gyulladást (PID) és meddőséget, míg az LGV szerovariánsok a lymphogranuloma venereum, egy szisztémás manifesztációval rendelkező STI kórokozói. A *C. trachomatis*-t összefüggésbe hozzák az arthritis-szel és a spondyloarthritis-szel is. *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) gyakori oka a közösségben szereshető tüdőgyulladásnak, és feltételezhetően bizonyos krónikus megbetegedések okozója is lehet, mint például az asthma vagy az érlemezsedés.

A humán herpes simplex vírus 1 (HHSV-1) és a HHSV-2 gyakori virális okozója a genitális fertőzéseknek. A HHSV-2 szeropozitív emberek (15-49 év) száma 2012-ben megközelítőleg 417 millióra tehető, a populációban 11,3% gyakorisággal fordul elő. Az urogenitális és anális régió típusos léziói mellett, a HSV fertőzések kiváltó okai lehetnek az encephalitis-nek, meningitis-nek és a neonatális herpes fertőzéseknek. A *C. trachomatis* és a HHSV-2 patogének sokszor perzisztens vagy látens fertőzést is okozhatnak a kórokozó belépési helyén (*C. trachomatis*) és/vagy a primer fertőzéstől távolabb, például a keresztcsonti ganglionban a HHSV-2, míg *C. trachomatis* esetében az ízületekben.

A chlamydia zárványok számolására az immunfluoreszcens festést követő manuális számolás az általános metodika, mellyel a chlamydia ellenes antibiotikumok és egyéb szerek pozitív vagy negatív hatásának vizsgálatára.

A titán-dioxid ( $\text{TiO}_2$ ) a titán természetesen előforduló oxidált formája, három leggyakoribb formája a rutile, az anatase és a brookite. A  $\text{TiO}_2$  anatase formája UV fény hatására fotokatalitikus hatással bír, mely során a vizet erős oxidatív potenciállal rendelkező hidroxil gyökökre bontja. A  $\text{TiO}_2$  nanorészecskék erős antibakteriális hatással rendelkeznek. A  $\text{TiO}_2$  a fotokatalízis során reakcióba lép a vízzel, hogy a hidroxil gyököket a superoxid következő formájára bontsa. A DNS károsodását tudja előidézni ezzel pusztítva el a baktériumot. A  $\text{TiO}_2$  nanorészecskéket élelmiszer adalékanyagként illetve gyógyszerek hordozóanyagaként használják. Ezen ismeretek alapján szeretnénk a  $\text{TiO}_2$  hatását vizsgálni *C. trachomatis* és HHSV-2 kórokozókval szemben, nem aktivált formában.

## 2 Célkitűzések

- Automatizált rendszer kifejlesztése chlamydia zárványok detektálására és számolására.
- Új vegyületek és nanoanyagok hatásának vizsgálata *C. trachomatis* és HSV-2 fertőzésekkel szemben.

## 3 Anyagok és módszerek

### 3.1 Sejtvonalak

HeLa 229 (ATCC), McCoy (ATCC) és Vero (ATCC) sejtvonalakat használtunk kutatásaink során. Az említett sejteket 96 mélyedést tartalmazó lemezekben (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) és 16 mélyedést tartalmazó szövettenyésztő tárgylemezen (chamber slide rendszeren) (Thermo Scientific™ Nunc™ Lab-Tek™, Waltham, MA, USA) szaporítottuk.

### 3.2 *Chlamydia* törzsek

Kísérleteink során két *Chlamydia* fajt használtunk: *C. trachomatis* (D szerovariáns, UW3/CX referencia törzs és L2 szerovariáns, VR-577 törzs; ATCC) és *C. pneumoniae*

(CWL029). A *Chlamydia* baktériumtörzseket egy korábban leírt metodika szerint szaporítottuk és részlegesen tisztítottuk.

### 3.3 Humán herpesz szimplex vírus

Humán herpesz szimplex vírus 2 (HHSV) referencia törzset (Országos Közegészségügyi Intézet Budapest) használtuk a későbbi kísérleteinkben. A HHSV-2 törzset Vero sejten szaporítottuk.

### 3.4 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid (MTT) teszt

A nanoanyagok toxikológiai profilját az általánosan használt MTT teszt segítségével határoztuk meg. Az MTT teszt során a használt anyagok maximális nem toxikus szintjét HeLa és Vero sejteken vizsgáltuk.

### 3.5 Ezüst nanorészecskék preparálása

Redukáló és stabilizáló szerként nátrium-borohidridet és nátrium citrátot használtunk minden esetben. A preparált ezüst nanorészecskék vizes diszperziójának kiindulási koncentrációja 100 ppm volt (0,92mM), a részecskék átlag mérete a transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálat szerint  $20,2 \pm 8.34$  nm-nek bizonyult.

### 3.6 Ezüsttel módosított TiO<sub>2</sub> nanorészecskék preparálása

Öt gramm titán-dioxidot (P25, Degussa-Evonik) 100 ml bidesztillált vízben diszpergáltunk, majd erőteljes keverés közben 40 ml ezüst-nitrát ( $57,9 \cdot 10^{-3}$  mM; Reanal) oldatot adagoltunk a szuszpenzióhoz. A pH-t 7,2-re állítottuk be, majd a szuszpenzióhoz csepegtetve 60 ml Na-borohidridet adagoltunk, bidesztillált vízzel mostuk, centrifugáltuk és szárítottuk.

### 3.7 A TiO<sub>2</sub> és Ag-TiO<sub>2</sub> részecskék elektronmikroszkópos vizsgálata

A szintetizált Ag-, TiO<sub>2</sub>- és Ag-TiO<sub>2</sub> nanorészecskék morfológiáját és részecskeméretét TEM-el vizsgáltuk. A TEM vizsgálatokhoz a mintákat a rézzel bevont érdes szénfilm mintatartóra (200 Mesh) cseppentés előtt desztillált vízben ultrahangoztuk.

### 3.8 TiO<sub>2</sub>, Ag és TiO<sub>2</sub>-Ag nanorészecskék töltésmennyiség meghatározása

A töltéstitrálásos mérések során a vizsgált rendszer áramlási potenciálját mértük, miközben az ezüst-, TiO<sub>2</sub>- és Ag-TiO<sub>2</sub> szuszpenziókat ellentétes töltésű (hexadecilpiridinium-klorid; HDPCI) tenzid oldattal titráltuk. A méréseket háromszor ismételtük meg.

### 3.9 Nanoanyagok *Chlamydia trachomatis* szaporodásra gyakorolt hatásának vizsgálata HeLa sejten

A vizsgálat során a HeLa 229 (ATCC) sejteket 96 mélyedést tartalmazó lemezekben szaporítottuk  $6 \times 10^4$  sejttszámmal MEM tápfolyadékban.

A TiO<sub>2</sub>, Ag és TiO<sub>2</sub>-Ag nanorészecskéket fiziológias sóoldatba oldottuk be, majd szukróz foszfát glutamin (SPG) pufferben hígítottuk tovább. A *C. trachomatis* elementáris testeket a nanorészecskékkel együtt 1 órán keresztül, 37 °C-on inkubáltuk. Az inkubálást fénytől elzárva végeztük, az esetleges fotokatalízis elkerülése érdekében. A TiO<sub>2</sub> és TiO<sub>2</sub>-Ag nanorészecskék esetében 100-0,024 µg/ml, míg az Ag nanorészecskék esetében 0,5-0,001 µg/ml koncentráció tartományt vizsgáltunk. Mind a két esetben 1:4 léptékű hígítást végeztünk. A lemezen felnőtt sejteket a kezelt és kezeletlen *C. trachomatis*-szal (MOI 8) egy órán keresztül, 37 °C-on inkubáltuk 5%-os CO<sub>2</sub> jelenlétében. A fertőzést követően a sejteket

két alkalommal mostuk foszfátpufferes sóoldattal (PBS), 200 µl/lyuk mennyiséggel. A mosást követően cikloheximiddel (1 µg/ml) kiegészített tápfolyadékot adtuk a sejtekhez és 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében 48 órán keresztül inkubáltuk.

### 3.10 Nanoanyagok HSV-2 szaporodására gyakorolt hatásának vizsgálata Vero sejten

A Vero sejteket (ATCC) 96 mélyedést tartalmazó lemezen szaporítottuk,  $6 \times 10^4$  sejttszámmal Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) tápfolyadékban (Sigma, USA), mely a következőket tartalmazta: 5% magzati borjú szérum (FBS) (Gibco, Németország), 0,14% nátrium bikarbonát, 100 egység/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin szulfát és 250 µg/ml amphotericin B. Az előinkubációt és a fertőzést a korábban leírtak szerint végeztük. A HHSV-2-vel (MOI 0,1) fertőzött sejteket kétszer mostuk PBS-sel a fertőzést követően, majd a lemezeket 12 órán át inkubáltuk 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében.

### 3.11 *C. trachomatis* és HHSV-2 szaporodásának vizsgálata direkt kvantitatív PCR segítségével (qPCR)

A sejtek felülúszóját eltávolítottuk, majd a sejteket PBS-sel mostuk. A második mosás után 100 µl Milli-Q (MQ) vizet (Millipore, Billerica, MA, USA) adtunk a sejtekhez, majd a sejtfeltárást két egymást követő fagyasztás (-80 °C, 15 min) olvasztás (szobahőmérsékleten) ciklussal oldottuk meg. A felolvasztott sejtízátumot alaposan összekevertük egy többszoros pipetta segítségével, majd ezt a lízátumot használtuk mintaként a kvantitatív PCR során.

A qPCR-t Bio-Rad CFX96 valós idejű készülékkel végeztük el. A reakcióhoz az SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) PCR mixet és *C. trachomatis* pykF génspecifikus primerpárt használtunk. A primer szekvenciája a következő:



A PCR negyven 20 másodperces, 95 °C-os és 1 perces 64 °C-os ciklusokból állt, míg a polimeráz aktivációs lépése 10 percen keresztül 95 °C-on történt.

Az olvadáspont analízist használtuk az amplifikáció specifitásának bizonyítására. Mindegyik PCR esetben, a ciklus küszöbértéket/ciklusszámot (Ct) használtuk eredményeink kiértékelésére, mely azonos azzal a ponttal ahol az amplifikációs görbe metszi az alapvonalat.

A HSV-2 fertőzött sejtek esetében a kiértékelésre ugyanazt a qPCR metodikát használtuk, mint a *C. trachomatis*-szal fertőzött sejtek esetében, a HSV-2 vírusra specifikus primerpárral, melynek a szekvenciája a következő:



A minták közötti statisztikai különbséget Student's t-test segítségével határoztuk meg (3 biológiai ismétlést készítettünk minden vizsgált esetben).

### 3.12 Chlamydia szaporítása 16 mélyedést tartalmazó tárgylemezen

Ebben a kísérletben a HeLa sejtek szaporítására 16 mélyedéssel rendelkező, speciálisan felületkezelt tárgylemezeket (chamber slide) használtunk. Irodalom A *C. trachomatis* D szerovariánssal végzett fertőzés esetén a lemezt 200 µl/lyuk mennyiségű HBSS-sel mostuk, majd szobahőmérsékleten 15 percig inkubáltuk 1% DEAE-dextránnal (80 µl/mélyedés). A DEAE-dextrán eltávolítását követően a sejteket megfertőztük 1 IFU/sejt multiplicitással a teljes lemezen vagy kettes léptékben hígított *C. trachomatissal* 1 IFU/sejt kiindulási koncentrációval. *C. trachomatis* L2 szerovariáns esetében 1 - 1:64 IFU/sejt míg a *C. pneumoniae*-val történt fertőzés esetén 1:8 - 1:512 IFU/sejt közötti multiplicitással fertőztük a

sejteket. A lemezeket a fertőzést követően 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében 24 vagy 48 órán keresztül inkubáltuk, majd a sejteket fixáltuk és immunfluoreszcens módszerrel festettük.

### 3.13 Chlamydia fertőzés gátlása antibiotikumokkal és IFN- $\gamma$ -val

A kísérletek során a tetraciklint és a moxifloxacin teszteltük az antibiotikumok közül. A tetraciklin esetén 0,25-0,004  $\mu\text{g/ml}$ , míg a moxifloxacin esetében 0,04-0,0006  $\mu\text{g/ml}$  koncentráció tartományban teszteltük az antibiotikumok hatását. Az ismert antibiotikumok mellett egy ismeretlen anyagot is teszteltünk. A PCC00213 (10 mg/ml) számú antibakteriális hatással rendelkező anyagot dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk fel és 10-0,156 mg/ml koncentráció tartományban teszteltük. A fertőzést követően (McCoy sejtek, *C. trachomatis* D (MOI 1)) cikloheximiddel kiegészített tápfolyadékban az említett antibakteriális anyagokat hígítottuk (1:2 léptékben) és a sejtekhez adtuk, két párhuzamos mélyedést kezeltünk minden kísérlet során. Kontroll mintaként kezeletlen sejtet tartalmazó mélyedéseket, és a PCC00213 anyag esetében 1% DMSO kontrollt alkalmaztunk.

Egy nappal a fertőzés előtt a sejteket előkezeltük egér INF- $\gamma$ -val 100-0,046 IU/ml közötti koncentráció tartományban, kettes léptékű hígítást végezve. Humán IFN- $\gamma$ -val is kezeltünk sejteket kontrollként, 100-1,5 IU/ml koncentráció tartományban. A fertőzést követően az INF- $\gamma$ -t cikloheximid mentes tápfolyadékban hígítottuk azonos koncentráció tartományban, mint az előkezelésnél és a már korábban kezelt sejteket az előkezeléssel azonos koncentrációjú hígított IFN- $\gamma$ -val kezeltük.

### 3.14 *C. trachomatis* szaporodásának vizsgálata TiO<sub>2</sub> nanorészecskékkel történt előkezelés után, HeLa sejten 16 mélyedést tartalmazó tárgylemezen kivitelezve

*C. trachomatis*-t (MOI 8) előkezeltük a TiO<sub>2</sub>-dal 100-3,12  $\mu\text{g/ml}$  koncentráció tartományban, kettes léptékű hígítást alkalmazva 1 órán keresztül 37 °C-on. Az előinkubációt fénytől védett helyen végeztük az esetleges fotoktalízis elkerülése érdekében. Kontrollként 2 mélyedést kezeletlen és fertőzött sejtet hagytunk, és 2 mélyedést nem fertőztünk viszont a legmagasabb koncentrációjú TiO<sub>2</sub> (100  $\mu\text{g/m}$ ) hígítással kezelt sejtet hagytunk. A sejteket 1 órán keresztül, 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében kezeltük/fertőztük *C. trachomatis*-szal és TiO<sub>2</sub>-dal. A fertőzést követően a sejteket PBS pufferrel mostuk, majd cikloheximiddel kiegészített tápfolyadékot adtunk a sejtekhez. A lemezeket 48 órán keresztül 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében inkubáltuk.

### 3.15 Immunfluoreszcens jelölés és szkennelés

A *C. trachomatis* illetve *C. pneumoniae* 16 mélyedést tartalmazó tárgylemezen fertőzött sejteket immunfluoreszcens jelölést követően értékeltük ki. Chlamydia LPS antitest Alexa-647 immunfluoreszcens festékekkel jelöltük és 1:200 hígításban használtuk a chlamydia inklúziók detektálására. A fluoreszcens jeleket Axon GenePix Personal 4100 DNS chip szkennel és GenePix Pro (6.1 verzió) szoftver (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) segítségével analizáltuk. Az analízis során Cy5 csatornát és 5  $\mu\text{m}$  felbontást használtunk.

### 3.16 A felvételek kiértékelése

A szkennelt felvételeket az általunk kifejlesztett ChlamyCount programmal értékeltük ki. Az analízist 2 részre oszthatjuk: képtimalizálás és analízis. A kép optimalizálás során, a kép betöltését követően, az ImageJ hisztogram normalizációs lépésével a kontrasztot megemeltük.

Az analízis fázisában, a lemez mélyedéseit külön-külön feldolgozza a program. Végezetül az analízis eredményét összefoglaló riportot tölthetünk le txt, xls és pdf fájl formájában. A pdf fájl tartalmazza a számszerűsített eredményeket és a feldolgozott képeket mind a 16 sejtet tartalmazó területről.

### 3.17 Konfokális mikroszkópos vizsgálat

Konfokális lézer mikroszkópot használtunk bizonyos felvételek elkészítéséhez, melyet Olympus FV1000 mikroszkóppal végeztünk. Az Alexa Fluor 647-es festéket 645 és 745 nm között detektáltuk.

### 3.18 Transzmissziós elektronmikroszkópia használata a korai kapcsolat vizsgálatára a TiO<sub>2</sub> és a HeLa, Vero sejtek között

A HeLa 229 és Vero sejteket 6 mélyedést tartalmazó lemezen szaporítottuk,  $2 \times 10^6$  sejt/mélyedés kezdeti sejtszámmal. A sejteket 100 µg/ml koncentrációjú TiO<sub>2</sub>-dal inkubáltuk (1 h, 37 °C, 5%, CO<sub>2</sub>), majd 300 µl/mélyedés Tripszin-Versen oldattal oldottuk fel a lemezről. A feloldott sejteket centrifugáltuk, majd a pelletet 600 µl glutáraldehiddel fixáltuk. A fixált sejteket Embed 812-be ágyaztuk. A 70 nm vastag metszeteket az Ultracut S ultra-mikrotómmal metsztük. A festést követően a metszetet JEM-1400 Plus elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

## 4 Eredmények

### 4.1 ChlamyCount szoftver

16 mélyedést tartalmazó szövettenyésztő tárgylemezen növesztett McCoy epitél sejteket használtunk a chlamydiával történő fertőzésekhez. A fertőzést követően (24 vagy 48 óra) a szövettenyésztő tárgylemez műanyag részét eltávolítottuk, majd acetonnal fixáltuk. Az inklúziókat Cy5 analóg Alexa 647-jelölt anti-chlamydiális LPS antitesttel festettük. A megfestett inklúziókat egy Axon GenePix 4100 DNS chip szkennel segítségével szkenneltük.

A szkennelt képek feldolgozására a ChlamyCount szoftvert használtuk. A minimum intenzitás küszöbértéke és az inklúziók feltételezett mérete változtatható a vizsgálat során, egyébként minden esetben fix küszöbértékek alapján megy végbe a vizsgálat; a további lépések automatizáltak. Következő lépésként a szoftver a sejtet tartalmazó területeket kivágja a teljes képből. A ChlamyCount szoftver minden területet ugyanazzal a folyamattal analizálja.

A kép analízisét követően, a ChlamyCount szoftver részletes txt és xls fájlt készít a 16 területről kapott inklúziók számáról. A harmadik fájl egy automatikusan generált pdf fájl lesz, mely tartalmazni fogja a számszerűsített adatokat és a feldolgozott képeket a 16 sejttel borított területről. Az átlagos szkennelési idő 10 perc, a képek feldolgozása 1-5 percet vesz igénybe.

### 4.2 A *C. trachomatis* D, L2 és *C. pneumoniae* detektálás dinamikus tartományának meghatározása a ChlamyCount szoftver használata esetén

A ChlamyCount rendszert *C. trachomatis* D, L2 és *C. pneumoniae* által fertőzött McCoy sejteken végeztük. Minden esetben felező hígítási sort készítettünk a chlamydia hígítás során. A fertőzés legmagasabb multiplicitása (MOI) 8 volt, de MOI 8 és 1 között a fertőzött terület, festés után összefüggő felületet alkotott, így a szoftver nem tudta megfelelően beolvasni az inklúziók mennyiségét. A későbbi kísérletek során a kezdő multiplicitás 1 (*C. trachomatis* D és L2) vagy 1:8 (*C. pneumoniae*) volt, további 6 felező hígítás került a lemezre, kettő párhuzamos ismétlésben.

Mind a három chlamydia fajnál magas korrelációt ( $R^2=0,95$  és  $0,98$ ) mértünk a szoftver által megszámlált és a feltételezett (a felező hígítás görbéjéből számolva) inklúziók száma között. Az inklúziók száma szorosán követte a feltételezett inklúziók számát MOI 1 és MOI 1:8, 1:16 között, amikor nem használtunk a fertőzés során centrifugálást (*C. trachomatis* D, L2), ami 1-log nagyságrendű dinamikus tartományt eredményezett. A centrifugálás használata (*C. pneumoniae*) lehetővé tette, hogy alacsonyabb multiplicitást használjunk, viszont szivárgást tapasztaltunk a kísérlet során, így továbbá nem alkalmaztuk ezt az eljárást.

#### 4.3 Moxifloxacin, tetraciklin és egy új chlamydia elleni vegyület a PCC00213 minimális gátló hatásának (MIC) vizsgálata *C. trachomatis* D szaporodására

A ChlamyCount szoftver, teszteléseink alapján, ugyancsak alkalmazható MIC érték meghatározására is. A moxifloxacin MIC értéke *C. trachomatis* fertőzés esetében korábbi kutatások szerint 0,03 és 0,05 µg/ml között van. *C. trachomatis* D (MOI 1) fertőzés esetében kísérleteink során 0,25-0,04 µg/ml közötti moxifloxacin koncentrációt alkalmaztunk. Eredményeink megmutatták, hogy a *C. trachomatis* D 0,015 µg/ml-es moxifloxacin koncentrációig szaporodni képes, viszont 0,031 µg/ml koncentrációnál már gátlást figyelhetünk meg. Ezek alapján a moxifloxacin MIC értékét 0,031 µg/ml-nél határoztuk meg. Korábbi adatok alapján *C. trachomatis* D fertőzés esetében a tetraciklin és a doxyciklin MIC értéke 0,03 és 0,15 µg/ml között van. Kísérleteink során 0,04-0,0006 µg/ml közötti koncentrációt teszteltünk *C. trachomatis* (MOI 1) fertőzés során. Eredményeink alapján a tetraciklin jelenléte mellett a *C. trachomatis* D 0,01 µg/ml koncentrációig szaporodni képes, míg 0,02 µg/ml tetraciklin jelenléte mellett gátlást figyelhetünk meg, így a MIC értéket ennél a koncentrációnál határoztuk meg. Az újszerű, PCC00213 jelölésű chlamydia elleni vegyület MIC értékének meghatározásához szintén a ChlamyCount rendszert használtuk. A PCC00213 3,1 µg/ml koncentrációjáig a *C. trachomatis* szaporodni képes, míg 6,2 µg/ml-nál már gátlást figyelhetünk meg, MIC értékét ennél a koncentrációnál határozzuk meg. Fontos megjegyezni, hogy a párhuzamosan elvégzett MTT teszt kimutatta, hogy a PCC00213 antichlamydiás hatását a sejtek metabolizmusának gátlása is okozhatja. A ChlamyCount alapú vizsgálat mellett készítettünk ugyanilyen lemezeket, melyeket fluoreszcens mikroszkópiával értékeltünk ki. Az abszolút inklúzió szám magasabb volt ennél a kiértékelésnél, mint a ChlamyCount által végzett számolásnál, de még így is magas korreláció volt megfigyelhető meg a két a inklúziószám között ( $R^2=0,94-0,98$ ). Megjegyzendő, hogy a ChlamyCount által és a manuálisan meghatározott MIC értékek azonosak voltak, mindhárom ismétlésben.

#### 4.4 Az IFN- $\gamma$ *C. trachomatis* D szaporodására, a DEAE-dextrán és a cikloheximid *C. trachomatis* D és *C. pneumoniae* szaporodására gyakorolt hatásának vizsgálata

Az IFN- $\gamma$  triptofán készlet degradáció általi, chlamydia szaporodásra gyakorolt gátlásának jelensége humán sejten jól ismert. Kísérleteinkben a humán és egér IFN- $\gamma$  hatásának vizsgálatát *C. trachomatis* fertőzés esetében, McCoy egér fibroblaszt sejteken végeztük. Eredményeink hasonló mértékű gátlást mutatattak a korábbi adatokkal, habár egy alacsonyabb egér IFN- $\gamma$  koncentrációt használtunk: a chlamydia szaporodásának gátlása koncentrációfüggő volt, és a maximum gátlás megközelítőleg 3,8-szeres volt 1,5 IU/ml (kb. 0,07 ng/ml) vagy magasabb egér IFN- $\gamma$  jelenlétében. Esetünkben a humán IFN- $\gamma$  nem mutatott gátlást a legmagasabb, 100 IU/ml koncentrációnál sem. Korábbi megfigyelésünk szerint a gazdasejtek előkezelése DEAE-dextránnal, illetve a cikloheximides kezelés megemelheti a chlamydia zárványokat és a visszatenyészthető IFU-t. Ezen hatásoknak a vizsgálatára a 16 mélyedést tartalmazó tárgylemezt használtuk. A HeLa sejteket előkezeltük DEAE-dextránnal (1% DEAE-dextrán, 15 perc, szobahő), és/vagy 1 µg/ml cikloheximidet alkalmaztunk a fertőzés során, majd a direkt zárványszámot a kezeletlen, fertőzött sejtek eredményeihez hasonlítottuk. Az eredményeink részben különböztek a két chlamydia faj esetében a felsorolt drogokra nézve. A *C. trachomatis* D esetében a DEAE-dextrán használata csekély hatást mutatott, viszont a cikloheximides kezelés az inklúziók számát 1,9-2,2 szeresére emelte függetlenül a DEAE-dextrán jelenlététől. *C. pneumoniae* esetében a dextrán és a cikloheximid külön-külön adva emelte a zárványok számát, 2,4 szeresre a dextrán, míg

3,3 szerezre a cikloheximid esetében. Az anyagok egyszerre történő adása esetében nem figyeltünk meg szaporodást elősegítő hatást.

#### 4.5 A nanorészecskék töltésmennyisége és morfológiai tulajdonságai

A transzmissziós elektronmikroszkópos felvételek alapján a kiindulási  $\text{TiO}_2$  nanorészecskék átlagos átmérője  $18.4 \pm 5,65$  nm-nek adódott. A citráttal stabilizált Ag nanorészecskék közel gömb alakúak voltak, az átlagos részecskeátmérőjük  $8.2 \pm 3,34$  nm-nek bizonyult. Az Ag- $\text{TiO}_2$  esetében a szférikus ezüst nanorészecskék a  $\text{TiO}_2$  nanorészecskék felületén jól láthatóan akkumulálódtak, az átlagos részecskeméretük  $21,4 \pm 6,78$  nm. A  $\text{TiO}_2$  pH-függő felületi töltéssel rendelkezik, melynek izoelektromos pontja (i.e.p) pH=6,2. Ezen pH érték felett a  $\text{TiO}_2$  felületi töltése negatív, ennek megfelelően a kiindulási -250mV-os felületi töltés Ag- $\text{TiO}_2$  esetében a titrálás során folyamatosan nőtt a felületi töltés elvesztésének következtében. Az Ag- $\text{TiO}_2$  egyedi felületi töltése pH=7,4 esetében -3,54 meq/100 g-nak bizonyult. Az Ag- $\text{TiO}_2$  nanorészecskékhez hasonlóan az ezüst és  $\text{TiO}_2$  nanorészecskék felületi töltését is megmértük, amelyek rendre -19,3 és -184,35 meq/100 g-nak bizonyultak. Az eredmények azt mutatták, hogy a legnagyobb felületi töltése az ezüst nanorészecskéknek volt, míg a  $\text{TiO}_2$  és Ag- $\text{TiO}_2$  nanorészecskék esetében kisebb felületi töltés alakult ki.

#### 4.6 A $\text{TiO}_2$ , Ag és $\text{TiO}_2$ -Ag nanorészecskék sejtre gyakorolt toxicitásának vizsgálata

MTT tesztet alkalmaztunk a nanorészecskék toxicitásának vizsgálatára. Eredményeink azt mutatták, hogy egyik nanoanyag sem mutat szignifikáns toxicitást. Maximális toxicitás az Ag nanorészecskék esetében volt megfigyelhető 8-2  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációtartományban. Az életképesség maximumát a sejtek az ezüst nanorészecskék jelenlétében 0,5  $\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációnál érték el, így ezt a koncentrációt határoztuk meg a maximum nem-toxikus koncentrációnak. A  $\text{TiO}_2$  és  $\text{TiO}_2$ -Ag NP esetében ezt a koncentrációt 100  $\mu\text{g/ml}$  értéknél határoztuk meg. A Vero sejt esetében ugyanez a toxicitási profil volt megfigyelhető. A  $\text{TiO}_2$  és  $\text{TiO}_2$ -Ag nem volt toxikus az alkalmazott koncentrációkban. A 0,5  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációjú Ag nanorészecskével végzett kezelés ~70%-os életképességet eredményezett a sejteken, így a legmagasabb nem-toxikus koncentrációt 0,125  $\mu\text{g/ml}$ -nél határoztuk meg. Annak érdekében, hogy a két sejtvonalon történő fertőzésekkel összehasonlítható eredményeket kaphassunk mind a két sejtvonal esetében 100  $\mu\text{g/ml}$  volt a kezdő koncentráció a  $\text{TiO}_2$  és  $\text{TiO}_2$ -Ag esetében, míg 0,5  $\mu\text{g/ml}$  az Ag NP esetében.

#### 4.7 A $\text{TiO}_2$ , $\text{TiO}_2$ -Ag és Ag NP-k hatásának vizsgálata direk qPCR segítségével *C. trachomatis* és HSV-2 fertőzött sejteken

Direkt qPCR módszer alkalmaztunk a nanorészecskék antimikrobás hatásának bizonyítására *C. trachomatis* és HSV-2 fertőzés esetében. A qPCR során pozitív kontrollként kezeletlen, *C. trachomatis*-szal fertőzött sejteket használtunk, melyeknek Ct értéke  $26,81 \pm 0,64$  volt. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a  $\text{TiO}_2$  fokozta a *C. trachomatis* szaporodását a kontrollhoz képest. A növekedésemelkedés koncentrációfüggést mutatott, maximum  $\text{TiO}_2$  koncentráció (100  $\mu\text{g/ml}$ ) esetében a Ct érték  $24,85 \pm 0,64$  értéket vett fel. Az 1,96 qPCR ciklus különbség a  $\text{TiO}_2$ -dal kezelt és a kezeletlen minták DNS mennyisége között megközelítőleg ~3,89 szerez ( $\sim 2^{1,96}$ ) szaporodásemelkedést jelent.

Az Ag nanorészecskékkel kezelt *C. trachomatis* esetében erős gátló hatást figyelhetünk meg 0,5-0,031  $\mu\text{g/ml}$  koncentráció tartományban. Másrészt, a  $\text{TiO}_2$ -Ag NP



esetében csökkent antimikrobás aktivitást figyelhetünk meg az Ag nanorészecskékkel szemben a *C. trachomatis* fertőzés esetén, mindazok ellenére, hogy a TiO<sub>2</sub>-Ag ugyanannyi mennyiségű Ag-t tartalmazott, mint az Ag nanopartikulumok. A legkifejezettebb különbség a két anyag antimikrobás hatása között a 25 µg/ml és 6,25 µg/ml TiO<sub>2</sub>-Ag NP koncentrációknál volt, ahol is a növekedés különbség az Ag NP és TiO<sub>2</sub>-Ag NP kezelt chlamydia esetében 15,59 és 27,92 szerez volt.

#### **4.8 A TiO<sub>2</sub> szaporodást fokozó hatásának időbeli függése *C. trachomatis* esetében**

Kísérleteink során szeretnénk volna meghatározni azt az időtartamot a fertőzések során, mely időtartam alatt befolyásolja a TiO<sub>2</sub> a *C. trachomatis* szaporodását. Ezen időtartam meghatározására a következő kísérletet végeztük el: *i*, a TiO<sub>2</sub>-t együtt inkubáltuk a *C. trachomatis* elemi testekkel egy órán keresztül a fertőzést megelőzően, majd a fertőzés alatt együtt inkubálódtak a sejteken újabb egy órán keresztül, *ii*, a TiO<sub>2</sub> és a *C. trachomatis* elemi testek egy órán át inkubálódtak együtt a fertőzés folyamán *iii*, a fertőzést követően adtuk a TiO<sub>2</sub>-t a sejtekhez különböző időpontokban (0-32 óra). Centrifugálást nem használtunk a fertőzések alatt.

Eredményeink alapján, a TiO<sub>2</sub> növekedés serkentő hatását az előinkubálást követő fertőzés során (~ 2 qPCR ciklus, négyszeres növekedés), illetve abban az esetben is megfigyeltük, amikor az egy órán át tartó fertőzés során adtuk a TiO<sub>2</sub>-t a sejtekhez és a *C. trachomatis*-hoz (~2 qPCR ciklus, négyszeres növekedés).

#### **4.9 A TiO<sub>2</sub>, Ag és TiO<sub>2</sub>-Ag nanorészecskék qPCR-re gyakorolt közvetlen hatásának meghatározása**

Mivel a növekedéshez kapcsolt chlamydia DNS mennyiségét direkt qPCR metodikával mértük, kíváncsiak voltunk a nanorészecskék közvetlen hatására a qPCR során alkalmazott DNS polimerázzal szemben. A qPCR enzim gátlásának esetében hamis chlamydia ellenes hatásról kaphatunk információt, míg egy stimuláló hatás hamis chlamydia növekedésről adhat információt. Abban esetben, ha nincs számottevő hatása a TiO<sub>2</sub>-nak az enzimre, a fertőzött sejtek és a fertőzetlen, de kezelt sejtek lizátumának keveréke azonos Ct értéket ad a PCR során, mint fertőzött és kezeletlen sejtek lizátumának keveréke.

#### **4.10 A TiO<sub>2</sub> *C. trachomatis*-ra gyakorolt hatásának vizsgálata kvantitatív fluoreszcencia segítségével.**

Egy független immunfluoreszcens vizsgálati módszert használtunk a qPCR eredményeink alátámasztása érdekében. A HeLa sejteket 16 szeparált mélyedéssel rendelkező sejtenyészti tárgylemezen tenyésztettük, majd a *C. trachomatis*-szal végzett fertőzést (MOI 8) is ezen a lemezen vittük véghez az egy órás előinkubációt követően, különböző koncentrációjú nanorészecskékkel. Centrifugálás nélkül végeztük a fertőzést. Fertőzött, de kezeletlen illetve kezelt, de nem fertőzött (100 µg/ml TiO<sub>2</sub>) sejteket használtunk kontrollként a lemezeken. A chlamydia zárványokat Alexa-647 festékkel jelölt anti-chlamydia LPS ellenanyaggal festettük meg. Ahogy korábban leírtuk a lemezeket DNS-chip szkennel segítségével szkenneltük, majd a ChlamyCount szoftvert használtuk a zárványok számának meghatározásához. A ChlamyCount által megszámlált zárványok mennyisége alátámasztotta a qPCR által kapott eredményeinket.

A chlamydia elemi testek TiO<sub>2</sub>-dal való előkezelése emelkedést indukált a zárványok számában. a TiO<sub>2</sub> 100 és 50 µg/ml-es koncentrációja esetében 400-500%-os emelkedést figyelhetünk meg, viszont ez a növekedést serkentő hatás koncentrációfüggő, melyet a 25-

3,12 µg/ml koncentrációknál figyelhetünk meg a serkentő hatás csökkenésének formájában. A fertőzetlen, de TiO<sub>2</sub> nanorészecskékkel kezelt sejtek elhanyagolható pozitivitást mutattak, ezzel bizonyítva azt, hogy a megfigyelt növekedett chlamydia immunfluoreszcenciát nem az ellenanyag TiO<sub>2</sub> nanorészecskékhez való aspecifikus kötődése okozta.

## 5 Diszkusszió

### 5.1 1. célkitűzés: Egy automatizált rendszer kifejlesztése chlamydia zárványok detektálására és számolására: ChlamyCount szoftver

Alacsony költségű, közepes teljesítményű metodikát fejlesztettünk ki a chlamydia zárványok meghatározására. A 16 szeparált mélyedést tartalmazó tárgylemezen szaporított chlamydia zárványait fluoreszcensen jelölt gén-specifikus ellenanyaggal jelöltük, majd DNS chip szkennel segítségével készítettünk felvételt a tárgylemezről. Az általunk összeállított detektáló rendszerben a DNS chip szkennel a legdrágább komponens; habár ezek a szkennerek könnyen hozzáférhetőek és gyakran használt eszközök, a mai újgenerációs szekvenálási technikák megjelenése miatt jelenleg kevésbé használtak vagy fölöslegessé vált eszközök. Az általunk fejlesztett technika új szerephez helyezi a DNS chip szkennereket, a nagyfelbontású képek készítésében és a chlamydia zárványok detektálásában váltak használhatóvá. Az elkészült képeket közel teljes mértékben automatikusan dolgozzuk fel egy szoftver segítségével, mely nem igényel nagy teljesítményű asztali gépet.

A zárványok számolására „gold standard”-ként felező hígítással hígított chlamydiával fertőzött sejteken elvégzett számolást használtunk. A metodika képes volt az 1:2-es hígítású zárványok megszámlálására három különböző chlamydia faj esetében és magas korrelációt mutatott a feltételezett zárványszámmal szemben. A rendszer képes volt meghatározni a zárványok mennyiségét 1-log egységen belül, ami hasonló vagy valamivel jobb, mint a korábban leírt metodikák. Más módszerekkel szemben, a ChlamyCount-nak az a hátránya, hogy nagyobb multiplicitású fertőzés esetén, szinte összefüggő fluoreszcens jellel rendelkező területet nem képes megvizsgálni, nem tudja meghatározni a zárványok számát. Ez a jelenség a zárványok tömörülésének köszönhető. A ChlamyCount magasabb zárványszámot határozott meg, mint a manuális számolás során kapott eredmények, ez annak köszönhető, hogy a szoftver kisebb, fluoreszcens jelet adó egységeket is zárványként azonosított. Tehát a szoftver jelenlegi verziója nem használható a zárványok abszolút számának meghatározásához. A ChlamyCount megfelelően használható különböző chlamydia növekedést befolyásoló anyag hatásának vizsgálatára, mivel ebben az esetben a kezelések közötti különbségekre vagyunk kíváncsiak és nem szükséges tudni az abszolút zárványszámot.

Valójában, bizonyítani tudtuk, hogy a meghatározott zárványok száma korrelációt mutatott a manuális és a ChlamyCount-tal végzett számolás során, mely alapján megfelelő lehet a bakteriális zárványszámok közötti különbségek meghatározására, mely MIC értékek meghatározása szempontjából fontos. Két jól ismert, különböző mechanizmuson alapuló antibiotikum MIC értékének meghatározására használtuk rendszerünket: a riboszóma gátló tetracyclin és a giráz gátló moxifloxacin. Mindkét esetben meghatároztuk a MIC értékeket a szoftver segítségével, melyek hasonlóak voltak a manuális számolás után kapott eredményekkel, és a korábban leírt értékekkel. A ChlamyCount képes volt reprodukálhatóan meghatározni az új chlamydia ellenes anyag, a PCC00213 MIC értékét is. Az antibiotikumok mellett más anyagok, például különböző kémiai vegyületek és citokinek is képesek befolyásolni a chlamydia növekedését. Az IFN-γ már korábban leírt hatását is kimutattuk módszerünk segítségével, és bizonyítani tudtuk a DEAE-dextrán és cikloheximide chlamydia-ra gyakorolt növekedést serkentő hatását. Ezen kísérletekből kapott eredmények megmutatták, hogy a ChlamyCount szoftverrel képesek vagyunk kimutatni a kontroll és kezelt mintákban a zárványok számbeli különbségét. Ez a fajta relatív mennyiségi

meghatározás teszi a módszerünket alkalmassá, alapvető biológiai vizsgálatok elvégzésére, és a kezelések kvantitatív eredményeinek meghatározására.

Figyelembe véve a korábban leírt módszereket, a chlamydia növekedés gyors meghatározására két lehetőség adott. Az első megközelítés fluorimétert vagy spektrofotométert alkalmaz a chlamydia-specifikus fluoreszcensen jelzett antitest teljes intenzitásának mérésére, vagy közvetett módon lehet mérni a chlamydia növekedést, a Chlamydia-indukált lízis után fellépő csökkent gazdasejt-anyagcsere mérésével. Ezek a módszerek gyorsak és olcsó a kivitelezésük, viszont nem a specifikusan festődő zárványok számolására támaszkodnak. Ebben az esetben számolnunk kell az aspecifikus ellenanyag-kötődésre, illetve a sejtek nem specifikus anyagcsere-változására. A második metodikai lehetőség nagyrészt, de nem kizárólag automatikus mikroszkópokat használ, hogy bizonyos számú felvételt készítsen a lemezek mélyedéseiről, majd számítógépes elemzést követően meghatározza a specifikus zárványokat és azok számát. A ChlamyCount ezen rendszerekhez hasonló elven működik. Összehasonlítva a korábban leírt automatikus mikroszkóp-alapú számolási módszerrel, a ChlamyCount számos előnnyel és néhány hátránnyal is rendelkezik. Az automata mikroszkóppal végzett módszer 96 mélyedéssel rendelkező lemezeket használ és nagyobb felbontású felvételeket készít a zárványokról. A képek elemzése jelentős számítástechnikai teljesítmény igényel, a képelemzést egy 16 processzorral rendelkező egység végzi. Ezzel összehasonlítva a mi módszerünk kisebb mintaszámot képes feldolgozni egyszerre, viszont az analízis ideje lényegesen rövidebb, ezért a 96 minta (6 x 16 mélyedés a tárgylemez esetében) összevethető a korábban említett 96 minta analízisével. A ChlamyCount rendszer telepítési költsége általában alacsonyabb és nem igényel nagy teljesítményű számítástechnikai eszközöket. Bár alacsonyabb felbontással rendelkezik, a ChlamyCount az automatikus mikroszkóp alapú módszerek egyik legnagyobb előnyét is megőrzi; nevezetesen topológiai információt nyújt a zárványokról.

## **5.2 2. célkitűzés: Új vegyületek és nanoanyagok hatásának vizsgálata *C. trachomatis* és HSV-2 fertőzésekkel szemben.**

Mivel a TiO<sub>2</sub> nanorészecskék használata jelentős és a *C. trachomatis* és a HHSV-2 prevalenciája magas, fontos megvizsgálni a kettő kölcsönhatását. Ezen kapcsolat meghatározása érdekében *in vitro* vizsgálatot végeztünk, mellyel kiértékeljük a nem aktivált TiO<sub>2</sub> nanorészecskék hatását a *C. trachomatis* és HHSV-2 növekedésre. Korábban már leírták, hogy az aktivált TiO<sub>2</sub> nanorészecskék antimikrobás hatással rendelkeznek. Azt feltételeztük, hogy nem aktivált formában nem lesznek hatással a fenn említett két patogénre a TiO<sub>2</sub> nanorészecskék. Valójában a TiO<sub>2</sub>- és TiO<sub>2</sub>-Ag nanorészecskék nem hatottak a vizsgált koncentráció tartományban a HHSV-2 növekedésre, és az Ag nanorészecskék csak minimális gátlást mutattak a legmagasabb koncentrációban. Érdeemes megemlíteni, hogy a TiO<sub>2</sub> nanorészecskék hozzáadása az ezüst nanorészecskékhez teljesen megszüntette ezt a minimális gátló hatást a HHSV-2-vel szemben. Másrészt, a qPCR-rel végzett mérések megmutatták, hogy a TiO<sub>2</sub> nanorészecskék szignifikánsan elősegítették, 100 µg/ml koncentrációban, a chlamydia növekedését. Bár nem érte el a szignifikancia küszöböt, a növekedést elősegítő hatás 50 µg/ml és 25 µg/ml koncentrációban is kimutatható volt. Mivel a TiO<sub>2</sub> nanorészecskék hatása váratlan eredményt hozott, az adatok validálására független immunfluoreszcens módszert alkalmaztunk, mivel aktív növekedés hiányában is megfigyelhető a chlamydia DNS-szintézis (pl.: perzisztencia). A ChlamyCount rendszert használtuk a chlamydia zárványok kvantitatív meghatározására. A ChlamyCount mérések a qPCR adatokat, 100 µg/ml és 50 µg/ml TiO<sub>2</sub> koncentráció tartományban, igazolták a figyelemre méltó növekedést serkentő hatást. A *C. trachomatis* esetében megfigyelt TiO<sub>2</sub> serkentő hatása váratlan volt, de nem volt precedens értékű a szakirodalomban. Korábban

közölt szakirodalomban (Xu et al.) már leírták, hogy nem aktivált TiO<sub>2</sub> nanorészecskék növelik a *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) kötődését/internalizációját a HeLa sejtekhez. A 100 µg/ml TiO<sub>2</sub> nanorészecskékkel 24 órán át kezelt HeLa sejtek (azonos koncentrációban, amely a *C. trachomatis* növekedését körülbelül 400 %-kal növelte a vizsgálatunkban) 250-350%-os *S. aureus* kötődéshez/internalizációhoz vezetett. A chlamydia fertőzéssel ellentétben, a TiO<sub>2</sub> nanorészecskék nem változtatták meg a HHSV-2 növekedést, valószínű, hogy a HHSV szaporodási ciklusa nem részesül a TiO<sub>2</sub> nanorészecske által indukált sejtszintű folyamatokban vagy a TiO<sub>2</sub> nanorészecskék nem képesek a növekedést serkentő hatásokat előidézni Vero sejtekben. Adataink alátámasztják, hogy a TiO<sub>2</sub> nanorészecskékkel összefüggő növekedést serkentő hatás sejtfüggő jelenség, mivel Vero sejteken nem fokozta a chlamydia növekedését.

Kinetikai kísérleteink megmutatták, hogy a TiO<sub>2</sub> nanorészecskék elősegítették a chlamydia növekedését abban a két esetben, amikor a fertőzés előtt, és amikor a fertőzés során adtuk hozzá az elemi testekhez a nanoanyagot. Ezen eredmények azt jelzik, hogy a TiO<sub>2</sub> hozzásegítette a chlamydia elemi testek tapadását/bejutását a gazdasejtbe. .

A *Chlamydia* több mechanizmuson keresztül képes bejutni a célsejtbe, beleértve a fagocitózist, a caveolae vagy a klatrin által közvetített endocitózist. E folyamatok közül a clathrin által közvetített endocitózis tűnik a *C. trachomatis* számára fontosnak a hámsejtekbe való belépéshez. A TiO<sub>2</sub> nanorészecskék is be tudnak jutni clathrin által szabályozott endocitózis során, így feltételezhető az, hogy a TiO<sub>2</sub> nanorészecskék belépése a sejtbe a chlamydia elemi testek belépését elősegíti. Másrészt a TEM során készített képeink TiO<sub>2</sub> nanorészecskék beépülését mutatta 1 óra elteltével mind a HeLa, mind a Vero sejtek esetében. Viszont nem figyeltük meg a chlamydia fokozott szaporodását a Vero sejtek esetében, ezért az együttes felvétel valószínűleg nem a növekedés fokozásának a forrása. A *C. trachomatis* elemi testek felületi töltése negatív, és bizonyos polikationok, mint például a DEAE-dextrán és poly-L-lizin segítik a *C. trachomatis* D-K urogenitális szerovariánsainak szaporodását, illetve bizonyos polianionok (dextrán-szulfát) gátló hatással bírnak. A megfigyelt növekedés serkentő hatás nem magyarázható a negatív töltésű elemi testek és a negatív töltésű gazdasejtek plazmamembránja közötti áthidalást, mivel a TiO<sub>2</sub> nanorészecskék felületi töltése közel nulla volt. Összességében ezek az adatok azt mutatják, hogy a TiO<sub>2</sub> nanorészecskék kötődése/beépülése önmagában nem kulcsfontosságú tényező a chlamydia növekedés elősegítésében, inkább a bekebelezett TiO<sub>2</sub> nanorészecskék egyedi, korai jelátvitelt vagy a plazma membrán megváltozását indukálják a HeLa sejtekben, amelyek a chlamydia növekedés szempontjából előnyösek.

Az ezüst tartalmú szereket gyakran használták *C. trachomatis* okozta fertőzések kezelése előtt és HSV-2 gátlás volt megfigyelhető a kezelése során. Amíg a TiO<sub>2</sub> nem volt hatással a HSV növekedésére, csökkent antimikrobás aktivitás volt megfigyelhető a TiO<sub>2</sub>-Ag nanorészecskék esetében a HSV-2-vel és a *C. trachomatis*-szal szemben, mint az Ag nanorészecskék esetében. A chlamydia ellenes hatás csökkenése bizonyos koncentrációknál 30-szoros volt. Meglehet, hogy az Ag nanorészecskék chlamydia ellenes hatása a magas, negatív felületi töltésnek köszönhető. Mint ahogy már korábban említettük a TiO<sub>2</sub>-Ag nanorészecskék pozitívabb felületi töltést mutattak az Ag nanorészecskékkel szemben, mely lehet a magyarázata az alacsonyabb chlamydia ellenes hatásnak.

Tanulmányunk egyike azon kevésnek, amely a nem aktivált TiO<sub>2</sub> nanorészecskék hatását vizsgálta intracelluláris kórokozók növekedése kapcsán. Mivel magas a prevalencia és a *C. trachomatis* fertőzések károsító szövődményei, a TiO<sub>2</sub> nanorészecskék által indukált serkentő növekedés további állatmodelles kísérlet és epidemiológiai vizsgálatok elvégzését igényli. Az egyik legfontosabb alkalmazása a nanorészecskéknek antibiotikumok hordozóanyagként ismert. Általánosan elfogadott, hogy az azithromycin az elsődlegesen alkalmazott antibiotikum chlamydia fertőzések esetében, mely a hatóanyag sejten belüli

felhalmozódásának köszönhető. Elméletileg a  $\text{TiO}_2$  nanorészecskék felszívódásuk és sejten belüli felhalmozódásuk miatt alkalmasak antibiotikumok hordozóanyagaként intracelluláris kórokozókkal szemben. Az a tény, hogy a  $\text{TiO}_2$  hozzáadása jelentősen csökkentette a chlamydia ellenes hatást és csökkentette az Ag nanorészecskék antivirális hatását, rávilágít a  $\text{TiO}_2$  nanorészecskék további vizsgálatának szükségességére.

## 6 Összefoglalás

A Chlamydia fajok Gram-negatív, obligát, intracelluláris patogének. A gazdasejt energiakészleteit használják fel életben maradásukhoz, mivel nem képesek az ATP szintézisre. Emiatt a kezdetben vírusként definiálták őket. A *C. trachomatis* és *C. pneumoniae* ismert humánpatogén kórokozók, a *Chlamydia psittaci* (*C. psittaci*) az ornithosis vagy psittacosis okozója, mely primer madár légúti megbetegedés, emellett képes zoonóziként manifesztálódni humán szervezetben is. A *C. trachomatis*-nak számos szerovariánsa van, melyeket a külső membrán fehérjék szerint csoportosítottak. Az A, B, Ba és C szerovariánsok okozzák a trachomát, amely a vezető oka a megelőzhető vakságnak, és endémiás a harmadik világ országaiban. A D-K szerovariánsok a leggyakoribb okozói a szexuálisan átvihető genitális fertőzéseknek világszerte: cervicitist, endometritist/salpingitist okoznak nőkben és urethritist nőkben és férfiakban is. Ezek a szerovariánsok légzőszervi megbetegedéseket is képesek okozni csecsemőkben. Az L1-L3 szerovariánsok a lymphogranuloma venereumot okozzák. Mivel a *C. trachomatis* és a *C. pneumoniae* fertőzések gyakoriak, fontos egy gyors és nagy mennyiségű minta feldolgozására képes vizsgálati módszer kialakítása, a különböző bioaktív anyagok chlamydia fertőzések elleni hatásának vizsgálatára.

Újabb antimikrobás anyagok felfedezése orvostudományi szempontból fontos kutatási terület, a kezelések és a lehetséges prevenció érdekében. Potenciális chlamydia ellenes anyagok nagy mintaszámot igénylő vizsgálata nehézkes a baktérium obligát intracelluláris volta és kicsi mérete miatt. A vizsgálatokat sejt kultúrában végeztük. A gazdasejt megfertőzése után a chlamydia jól körülhatárolt zárványt hoz létre. Mivel alacsony multiplicitású fertőzés (MOI) esetében egy chlamydia sejt egy zárványt tud képezni, az eredeti baktérium mennyiséget indirekt módon, immunfluoreszcens jelölést követően, manuális mikroszkópos számolással tudjuk meghatározni. A munkai igényes és szubjektív kiértékelési folyamat helyett kifejlesztettünk egy aránylag olcsó, könnyen használható módszert, mellyel automatizáltuk a számolást. A rendszer DNS chip szkennerből és egy általunk fejlesztett képanalizáló szoftverből áll. Ezt a módszert fluoreszcens jelölt chlamydia zárványok számolására használtuk, a fertőzést egy 16 szeparált mélyedéssel rendelkező szövettenyésztő tárgylemezen (chamber slide) végeztük. A szkennelt képek analízisét az ImageJ programba beilleszthető általunk létrehozott ChlamyCount bővítménnyel végeztük. A képek feldolgozása szinte teljes mértékben automatikusan történt, a 16 sejtes terület kiemelését, a zárványok detektálását, kivágását és a számolását is beleértve. A ChlamyCount eredményesnek bizonyult antibiotikumok MIC értékének meghatározására is, mint például a tetraciklin, moxifloxacin és egy új PCC002132 jelölésű anyag esetében is. A ChlamyCount használható volt olyan anyagok vizsgálatára is, melyek indirekten befolyásolják a chlamydia szaporodási ciklusát, mint például a gamma interferon, a DEAE-dextrán vagy a cikloheximid.

Könnyen használható és pontos rendszert fejlesztettünk ki, mellyel ismert és új antibiotikumok chlamydia ellenes hatását és különböző vegyületek baktériumnövekedésre gyakorolt hatását vizsgálhatjuk. További céljaink új nyersképfeldolgozást és javított terület kivágási algoritmus kifejlesztése, kiterjesztett dinamikus tartomány és abszolút zárványbecslés érdekében.

A titán-dioxid ( $\text{TiO}_2$ ) gyakran alkalmazott fehér színt biztosító adalék (pl.: kozmetikumok) és élelmiszer adalékanyag (E171), átlagosan napi 0,2-2 mg/testsúly kilogramm bevitellel. Az E171 adalékanyag különböző méretű  $\text{TiO}_2$  részecskéket tartalmaz, 60 és 300 nm között. Eltekintve a nagyobb részecskéktől, az E171 és az E171 adalékanyagot tartalmazó ételek 5-15%-a 100 nm-nél kisebb  $\text{TiO}_2$  nanorészecskéket tartalmaznak. Némely tanulmány azt bizonyítja, hogy orálisan beadott  $\text{TiO}_2$ -t tudtak kimutatni a máj, lép, vese és a tüdő szövetekből. Másik tanulmány szerint, az intravénásan beadott  $\text{TiO}_2$  90 nap után a szervezet számos szövetében kimutatható volt. Az említett alkalmazási területeken kívül a  $\text{TiO}_2$  intravénás gyógyszerek hordozóanyagaként is ismert. A  $\text{TiO}_2$  nanorészecskék számos gyógyszer hordozóanyagaként használatosak, mint a paclitaxel, 5-fluorouracil és az antiszenz oligonukleotidok. Az UV fény által aktivált  $\text{TiO}_2$  nanorészecskéknek erős az oxidációs potenciálja, mely a jól ismert antimikrobás hatásért felelős, az élelmiszer adalékanyagként és gyógyszer hordozóanyagként való alkalmazásához erre az aktivitásra nincs szüksége.

Kísérleteink során a nem aktivált  $\text{TiO}_2$  hatásának vizsgálatát tűztük ki célul a *C. trachomatis*-sal és a HSV-2-vel szemben. Azt bizonyítottuk be, hogy a  $\text{TiO}_2$  nanorészecskék koncentrációtól függően emelik a *C. trachomatis* szaporodását, megközelítőleg négyszeres mértékben 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $\text{TiO}_2$  koncentrációnál. Ez a hatás patogénfüggő, mivel a HSV-2 fertőzés esetében nem figyelhettünk meg ilyen hatást. Eredményeink szerint nem várt mellékhatásra mutattunk rá egy élelmiszeradalék és gyógyszer hordozóanyag esetében.

## 7 Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani mindenkinek, aki támogatásával segítette munkámat PhD tanulmányaim során. Mély és őszinte hálámat szeretném kifejezni témavezetőimnek **Prof. Dr. Deák Juditnak** és **Dr. Virók Dezsőnek**, segítségükért, bizalmukért és támogatásukért.

Hatalmas köszönettel tartozom **Dr. Burián Katalinnak**, az Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet vezetőjének, hogy lehetőséget adott az intézetben történő munkavégzésre.

Köszönettel tartozom **Dr. Endrész Valériának** tanulmányaim során nyújtott segítségéért, a számtalan tanácsért és a barátságos légkörért.

Hálával tartozom **Prof. Dr. Mándi Yvettnek**, az Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola korábbi vezetőjének a sok segítségért.

Szeretném megköszönni a hasznos tanácsokat **Dr. Urbán Editnek**, a Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet vezetőjének.

Továbbá köszönettel tartozom kollégáimnak és barátaimnak **Dr. Mosolygó Tímeának**, **Dr. Szabó Ágnes Mírának**, **Lantos Ildikónak**, **Dr. Spengler Gabriellának**, **Kincses Annamáriának**, **Batki Szilviának** és **Raffai Tímeának** a sok segítségért, a jó hangulatért és támogatásukért.

PhD tanulmányaim során elvégzett kísérletek nem valósulhattak volna meg az asszisztensek **Lévai Tilda**, **Deák Györgyi**, **Ürmös Kitti** és **Váradi Anikó** segítségével.

Nagy köszönettel tartozom a támogató és kellemes környezetért a **Kollégáimnak** és az Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet valamint a Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet valamennyi **Munkatársának**.

Szeretném megköszönni **Dr. Vályi-Nagy Tibornak**, **Dr. Vályi-Nagy Klárának** és **Dr. Deepak Shukla**-nak Chicagóban az Illinois-i Egyetemen töltött idő alatt a sok segítségért és támogatásért. Emellett nagy köszönettel tartozom a lehetőségért, **Ferencz és Diane Rosztoczy**-nak és a **Rosztoczy Alapítványnak**, hogy Chicagóban élhettem és tanulhattam.

Nagy köszönettel tartozom férjemnek, **Varga-Bogdanov Attilának**, hogy szeretetével és türelmével segítette tanulmányaimat, illetve mindvégig hitt bennem.

Utolsóként, de nem utolsó sorban mély hálával tartozom szüleimnek **Bócsik Juditnak** és **Szpisják Tamásnak**, testvéremnek **Szpisják Nórának**, egész családomnak és a világ legjobb barátjának **Polczer Katalinnak** szeretetükért, türelmükért és biztatásukért.

Nekik ajánlom dolgozatomat!

## Publikációk az értekezés témájában

- I. Anita Bogdanov**, Valeria Endrész, Szabolcs Urbán, Ildikó Lantos, Judit Deák, Katalin Burián, Kamil Önder, Ferhan Ayaydin, Péter Balázs, Dezső P. Virok  
Application of DNA Chip Scanning Technology for Automatic Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae* Inclusions  
*Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 405–413 (2014).  
IF: **4.48**
- II. Anita Bogdanov**, László Janovák, Ildikó Lantos, Valéria Endrész, Dániel Sebők, Tamás Szabó, Imre Dékány, Judit Deák, Zsolt Rázga, Katalin Burián, Dezső P. Virok  
Non-Activated Titanium-Dioxide Nanoparticles Promote the Growth of *Chlamydia trachomatis*  
*Journal of Applied Microbiology Online* **123** (5):1335-1345 (2017)  
IF: **2.099**

Összesített impakt faktor: 6,579

## Egyéb közlemények:

- I. Jaishankar D, Yakoub AM, Bogdanov A, Valyi-Nagy T, Shukla D.**  
Characterization of a proteolytically stable D-peptide that suppresses herpes simplex virus 1 infection: implications for the development of entry-based antiviral therapy.  
*Journal of Virology.* **89**, 1932-1938 (2015)  
IF: **4.439**

**Kumulatív impakt faktor: 11,018**

## Konferencia absztraktok:

- 2012:** *Chlamydia* inklúziók automatizált számolása fluoreszcens DNS-chip szkennel segítségével  
**Bogdanov Anita**, Urbán Szabolcs, Endrész Valéria, Burián Katalin, Balázs Péter Attila, Deák Judit, Virok Dezső.  
11. Cserhádi István Emlékülés : Fiatalok Tudományos Fóruma 2012.11.23-24
- 2015:** *Detection of Chlamydia trachomatis attachment to epithelial cells by the ChlamyCount software using images produced by a DNA-chip scanner.*  
**Anita Varga-Bogdanov**, Ildikó Lantos, Ildikó Eszik, Péter Balázs, Judit Deák, Katalin Burián, Valéria Endrész, Dezső Virok.  
17th International Congress, Hungarian Society for Microbiology, An Eötvös Scientific Conference, Eötvös Loránd University Convention Centre, Budapest, Hungary July 8-10, 2015
- Chlamydia trachomatis* szaporodás mérése DNS-chip szkennel segítségével  
**Bogdanov Anita**, Lantos Ildikó, Endrész Valéria, Deák Judit, Burián Katalin, Balázs Péter, Virok Dezső



A Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Tanári Testületének Ünnepi Tudományos Ülése a Szent-Györgyi Napok alkalmából, „Előttem az utódom” : doktori iskolák reprezentatív témáinak és hallgatóinak bemutatkozása, 2015. november 13.