

# Feline adenovirus izolátum molekuláris és biológiai vizsgálata

Doktori értekezés

**Tarcsai Katalin Réka**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Ongrádi József, CSc., ny. egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Varga Marina, Ph.D., egyetemi adjunktus  
Dr. Tiszlavicz Zoltán, Ph.D., laboratóriumvezető-helyettes

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Ujpál Márta, med. habil., Ph.D., egyetemi docens

Tagok: Dr. Barcs István, CSc., ny. tanszékvezető főiskolai tanár  
Dr. Újhelyi Eszter, Ph.D., biológus, laboratórium vezető

Budapest  
2023

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke .....	3
1. Bevezetés .....	6
1. 1. Adenovírusok általános jellemzői.....	6
1.2. Gazdasejtre ható molekuláris mechanizmusok.....	11
1.3. Adenovírusok által kiváltott immunválaszok .....	13
1.3.1. Veleszületett immunválasz.....	13
1.3.2. Adaptív immunválasz.....	15
1.4. Adenovírusok járványtana .....	17
1.5. Adenovírus fertőzések immunkompetens betegekben.....	19
1.5.1 Légúti fertőzések .....	19
1.5.2. Szemfertőzések.....	20
1.5.3. Gastrointestinális és húgyúti fertőzések .....	20
1.5.4. Egyéb, ritka fertőzések.....	21
1.6. Adenovírus fertőzések immunhiányos betegekben .....	21
1.6.1. Veleszületett immunhiányos állapotok .....	21
1.6.2. Szerzett immunhiányos állapotok .....	22
1.7. Adenovírusok diagnosztikája.....	23
1.8. Adenovírus fertőzések kezelése, terápiája .....	25
1.8.1. Avemar hatása .....	28
1.9. Adenovírus rekombinánsok, mutánsok, vektorok .....	30
1. 10. Állatmodellek.....	33
1.10. 1. Macska AIDS modell .....	33
1. 11. Macska adenovírus (FeAdV) .....	34
2. Célkitűzések .....	38
3. Módszerek .....	39
3. 1. Felhasznált sejtek és vírusok.....	39
3.2. Sejt- és vírusmunkák.....	40
3.3. Génösszehasonlítás .....	44
3. 4. Filogenetikai elemzés.....	45
3. 5. FeAdV ellenállóképességének vizsgálata .....	45
3. 5. 1. Fiziko-kémiai hatások .....	45
3. 5. 2. Antivirális gyógyszerek.....	47

3. 5. 3. Avemar antivirális hatásainak vizsgálata .....	48
3. 5. 3. 1. Az Avemar pulvis hatása a FeAdV replikációra HeLa és CrFK sejtekben .....	48
3. 5. 3. 2. Avemar és FIV fertőzés együttes vizsgálata macska eredetű sejteken	49
3. 6. Gazdasejt receptorainak és koreceptorainak gátlása.....	50
3. 7. FeAdV fertőzött HeLa sejtek citokin termelésének vizsgálata.....	51
3. 8. Statisztikai analízis .....	52
4. Eredmények .....	53
4. 1. Génösszehasonlítás .....	53
4. 2. Filogenetikai elemzés.....	55
4. 3. FeAdV ellenállóképességének vizsgálata .....	56
4. 3. 1. Fiziko-kémiai hatások .....	56
4. 3. 2. Antivirális gyógyszerek.....	59
4. 3. 3. Avemar antivirális hatásainak vizsgálata .....	60
4. 3. 3. 1. Az Avemar pulvis hatása a FeAdV replikációra HeLa és CrFK sejtekben .....	60
4. 3. 3. 2. Avemar és FIV fertőzés együttes vizsgálata macska eredetű sejteken	63
4.4. Gazdasejt receptorainak és koreceptorainak gátlása.....	66
4. 5. FeAdV fertőzött HeLa sejtek citokin termelésének vizsgálata.....	70
5. Megbeszélés .....	73
6. Következtetések.....	83
7. Összefoglalás .....	86
8. Summary.....	87
9. Irodalomjegyzék .....	88
10. Saját publikációk jegyzéke .....	109
10. 1. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények listája: .....	109
10. 2. Egyéb, nem az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények listája: .	109
11. Köszönetnyilvánítás .....	110

## Rövidítések jegyzéke

2,6-DMBQ – 2,6-dimethoxy-p-benzokinon

2-MBQ – 2-methoxy-benzokinon

AdV – adenovírus

AIDS – acquired immunodeficiency syndrome (szerzett immunhiányos tünetegyüttes)

ATCC – American Type Culture Collection

AVP – adenovírus proteáz

bp – bázispár

BSA – bovin szérum albumin

C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH – etil-alkohol

CAR – Cocksackie-adenovírus receptor

CAS – Chemical Abstracts Service (regisztrációs szám a vegyi anyagok azonosítására)

CAV – canine (kutya) adenovírus

COX – ciklooxigenáz

CPH – citopátiás hatás

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol

dGTP – deoxiguanozin-trifoszfát

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO – dimetil-szulfoxid

DNS – deoxiribonukleinsav

DSG2 – desmoglein 2

EC<sub>50</sub> – effektív koncentráció fele

EDTA – etilén-diamin-tetraecetsav

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

FBS – foetalis borjú savó

FDA – Food and Drug Administration

FE – fertőző egység

FeAdV – Feline adenovírus

FIV – feline (macska) immundeficiencia vírus

FIV-M2 – feline (macska) immundeficiencia vírus Pisa-M2 izolátum

FIV-Pet – feline (macska) immundeficiencia vírus Petaluma izolátum

GRAS – Generally Recognized as Safe (általánosan biztonságosan elismert)

HAdV – humán adenovírus  
HCl – hidrogén-klorid (sósav)  
HD – helper-dependens (helper függő)  
HEK-293 – human embryonic kidney 293 cells (humán embrionális vesesejt)  
HIV – humán immundeficiencia vírus  
HPV – humán papillomavírus  
HRP – horseradish-peroxidáz  
HSCT – hematopoetikus őssejt-transzplantáció  
IC<sub>50</sub> – half maximal inhibitory concentration (50%-os gátló koncentráció)  
ICAM – intracelluláris adhéziós molekula  
ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses (Nemzetközi Vírustaxonomiai Bizottság)  
IFN – interferon  
IgCAM – immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule  
IL-10 – interleukin-10  
ISG – interferon-stimulálta gének  
LTR – long terminal repeat (hosszú terminális ismétlődés)  
m/m% – tömegszázalék  
MAdV – marten (nyest) adenovírus  
MHC – major histocompatibility complex (fő hisztokompatibilitási komplex)  
moi – multiplicity of infection (fertőzés mennyisége)  
mRNS – hírvivő RNS (messenger RNS)  
MUSCLE – Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation (Többszörös nukleotid szekvencia illesztésére alkalmas program)  
NaClO – nátrium-hipoklorit  
NaOH – nátrium-hidroxid  
NGS – next-generation sequencing (újgenerációs szekvenálás)  
NK sejt – natural killer sejt (természetes ölősejt)  
ORF – open reading frame (nyitott leolvasási keret)  
PARP – poli-(adenozin difoszfát-ribóz)-polimeráz  
PBS – foszfátpufferelt sóoldat  
PCR – polimeráz láncreakció

ppm – parts per million  
pRb – retinoblasztóma protein  
RC – replication-competent (replikáció kompetens)  
RD – replication-defective (replikáció hibás)  
REA – restrikciós enzim analízis  
RNS – ribonukleinsav  
RPMI 1640 – Roswell Park Memorial Institute 1640 tápfolyadék  
SAdV – simian (majom) adenovírus  
SCID – súlyos kombinált immunhiányos szindróma  
SFU/ml – syncytium forming unit/ml (szincícium képző egység/ml)  
SPF – specific pathogen free (meghatározott kórokozótól mentes)  
TCID<sub>50</sub> – 50% tissue culture infectious dose (szövetkultúrát 50%-ban fertőző dózis)  
TGF-β – transzformáló növekedési faktor béta  
Th sejt – helper T sejt  
TNF – tumor nekrozis faktor  
TP – terminális protein  
VA-RNS – vírus asszociált RNS  
WHO – World Health Organization

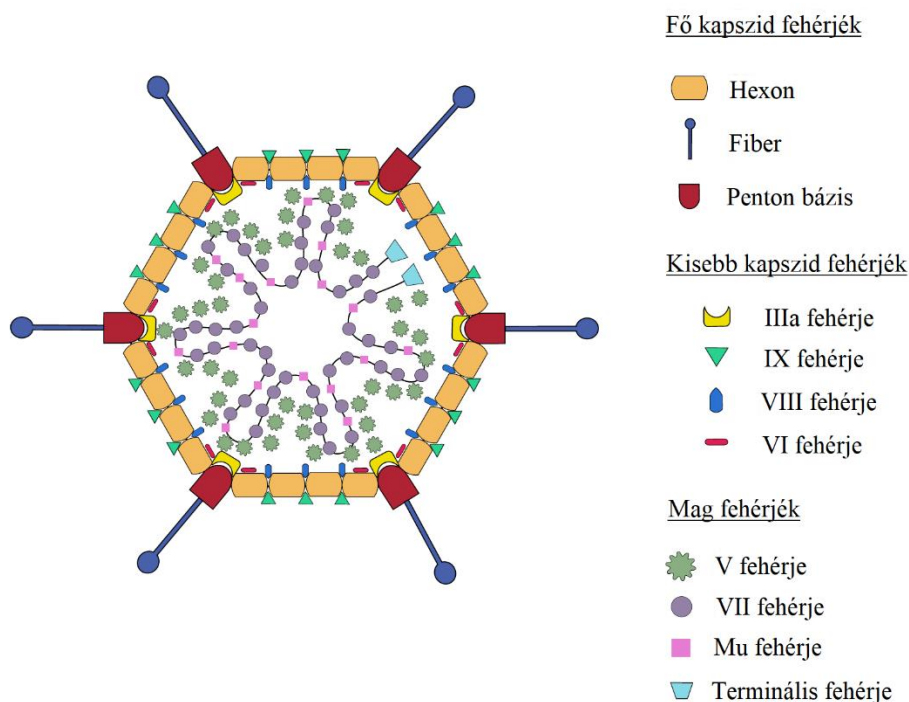
# 1. Bevezetés

## 1. 1. Adenovírusok általános jellemzői

Az adenovírusok (AdV) a *Rowavirales* rend, *Adenoviridae* család tagjai (1). Széles körben előfordulnak gerincesekben, így halakban, kétélűekben, hüllőkben, madarakban és emlősökben, tehát az emberben is (2). Az emberi adenovírusok a *Mastadenovirus* nemzetséghez tartoznak. A fajok legfrissebb taxonómiai elnevezése *Human mastadenovirus* és hét speciesre oszlanak A-G-ig (1). Az egyes csoportokhoz tartozó fajok által okozott betegségek és tünetek hasonlóak. Meningoencephalitist okoznak az A, B és D, hólyaggyulladást, szaru- és kötőhártya-gyulladást a B és D, hepatitiszt a C, pneumóniát a B, C és E, gasztroenteritist az F és G csoport tagjai, de a fertőzés helyén akár több faj is jelen lehet egyszerre (3). A fajokon belül a Human Adenovirus Working Group jelenleg összesen 111 típust tart nyilván, amely magába foglalja a szero- és genotípusokat egyaránt, ez a szám pedig folyamatosan növekszik (4). Korábban az osztályozás szérumszűrés, neutralizáció és hemagglutinációs tulajdonságok alapján történt, ez alapján 51 szerotípusról beszélhetünk, manapság azonban a teljes genomi szekvenciák bioinformatikai analízise a mérvadó. Az elérhető szekvenciák számának növekedése lehetővé teszi azt is, hogy részletesebb filogenetikai elemzéseket is végezzünk, segítve ezzel a még pontosabb osztályozást (5, 6).

Az adenovírusok közepes méretű (70-100 nm), burok nélküli, szimmetrikus ikozaéder alakú partikulák. A legnagyobb peplon nélküli vírusok, örökítőanyaguk 34-36 kb-os kettős szálú, lineáris DNS. Az adenovírusok 11 strukturális fehérjével rendelkeznek, amelyek három csoportba sorolhatók (1. ábra) (7). A hexon, a penton bázis és a fiber a fő kapszid fehérjék, a VI, IIIa, VIII és a IX a kisebb kapszid proteinek, a terminális, Mu, VII, V fehérjék pedig a mag proteinek csoportját alkotják (8, 7). A víruskapszid 240 hexon és az ikozaéder csúcsain elhelyezkedő 12 penton molekulából áll össze. A pentonokat a penton bázis és a belőle kinyúló fiber molekula alkotja, amelyek a víruspenetrációban vesznek részt azáltal, hogy a gazdasejt felszíni receptoraihoz kötődnek. A fiber három további részre, a feji (knob), nyaki (shaft) és farki (tail) régióra bontható. A knob domén egy gömbszerű struktúra, a fehérje C-terminális részén helyezkedik el, ez kötődik az elsődleges sejtreceptorhoz. A shaft domén különböző hosszúságú az egyes adenovírus típusoknál, ez befolyásolja a fiber rugalmasságát,

valamint a gazdasejt integrinjeihez való kötődést. A fiber molekula nagyon vékony struktúra, így könnyen le tud szakadni a vírusról, amely ezáltal elveszíti fertőzőképességét (3, 6, 7, 9). A vírus kisebb fehérjéi, a IIIa, VI, VIII és IX a kapszid stabilizálásában játszanak szerepet, valamint részt vesznek az endoszóma penetrációban, a transzkripció aktiválásban és a sejtmagi folyamatok átszerveződésében. A magfehérjék, mint a V, VII, X és a terminális protein (TP) lépnek kölcsönhatásba a vírus örökítőanyagával, megkönnyítve például a sejtmagba jutást (8, 7).



**1. ábra.** A humán adenovírus (HAdV) sematikus ábrázolása, amely bemutatja a virion 11 szerkezeti fehérjéjét, amelyek három fő csoportba sorolhatók ((10) alapján saját ábra).

A legtöbb adenovírus esetén a Coxsackie-adenovírus receptor (CAR) az elsődleges kötőhely. Az Immunglobulin szupercsalád tagja, sejtadhéziós molekula (IgCAM). Klasszikus szerkezettel rendelkezik, fő részei az extracelluláris domén, a transzmembrán domén és egy intracelluláris domén (11). Az embrionális fejlődés során különböző szövetekben expresszálódik epitél sejteken, például a gyomor-bél és a légzőszervi traktusban, a májban, vesében, nyirokrendszerben, szív-és vázizom sejteken és a hím reproduktív rendszerben, de megtalálható két sejt közötti kapcsolódási pontokon is (11, 12). A fiber-CAR kötődés szerkezeti vizsgálatai feltárták, hogy feltehetőleg csak három CAR molekula tud a fiber knob doménjéhez kötni, amely nagy affinitású kötést



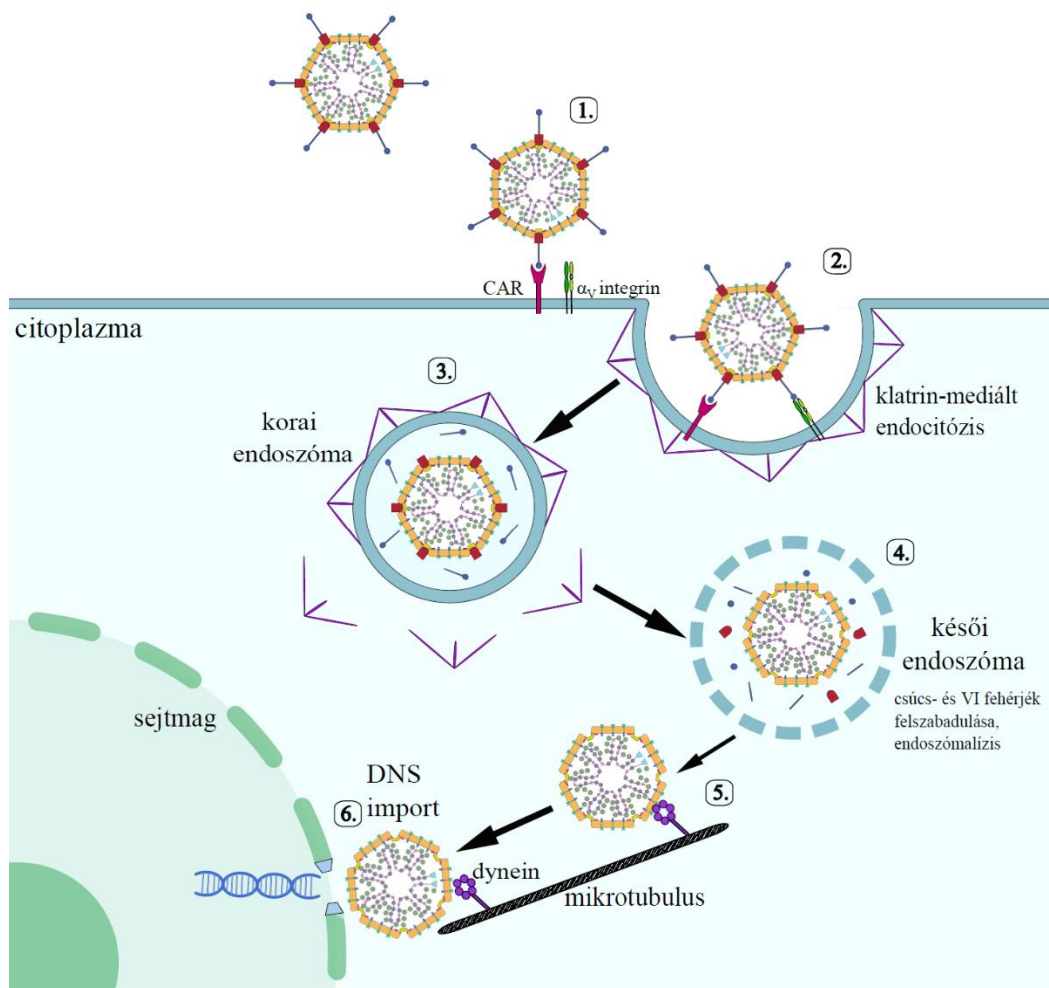
hoz létre, lehetővé téve ezzel a vírusok internalizációját. Azok az adenovírus típusok, amelyeknek a fiber fehérje knob doménje a megfelelő konzervált aminosavszekvenciákkal rendelkezik, képes lesz a CAR-t használni a sejt fertőzésére (7, 13). Azonban nem csak a knob, de a shaft domén is szerepet játszik a receptorhoz való kötődésben, ugyanis a fiber hossza és a rugalmassága befolyásolhatja a fiber-CAR kapcsolódást (14). A megfigyelések azt mutatják, hogy az adenovírusok nem csak a sejtbe való bejutáshoz használhatják a CAR-t, hanem a szöveti barrieréken történő átjutáshoz is. Feltételezhető, hogy a fiber protein képes megszakítani a sejtek közötti adhéziót és képes eljutni a légúti hámszövet távolabbi részeire, majd egy másik gazdára (15). Ahogy a neve is mutatja, a CAR nem csak az adenovírus, hanem a coxsackievírus B receptora is (7).

Amennyiben a fiber knob régiójában nem található meg a CAR kötődéshez szükséges konzervált aminosavszekvencia, akkor az adenovírus más receptort használ elsődlegesként a sejthez való kötődéshez (7). A B és D család számos tagja a CD46 receptorhoz kapcsolódik (16, 17). A CD46 a komplement szabályozó fehérjék családjába tartozik, minden sejtmaggal rendelkező emberi sejtben expresszálandó transzmembrán protein, amely számos baktérium és vírus belépési receptora. Az adenovírusokon kívül például a kanyaró vírus Edmonston törzse, *Streptococcus* A csoportja, IV-es típusú pilussal rendelkező *Neisseria gonorrhoeae* és *Neisseria meningitidis* is a CD46 receptorhoz kötődik (18). Egyetlen transzmembrán doménnel és egy rövid citoplazmatikus farokkal rendelkező molekula. A CAR-hoz hasonlóan három CD46 kötőhely található a fiber knob régióján, amelyek multivalens kölcsönhatásokon keresztül képesek kapcsolódni. Az adenovírusokhoz való kötődés konformációváltást idéz elő a CD46 molekulában (7).

Wang és munkatársai (2011) azonosították, hogy az AdV-3, AdV-7, AdV-11 és AdV-14, tehát a B típus több tagja a desmoglein 2-t (DSG2) használják elsődleges receptorként. A DSG2 egy kalcium-kötő transzmembrán glikoprotein, a cadherin fehérjecs család tagja, a hámsejtek közötti adhéziós szerkezet egyik alkotórésze. Az Ad-DSG2 kötés átmenetileg megnyitja a sejtek közötti szoros kapcsolatokat (*tight junction*) és hozzájárul az olyan receptorok felszabadulásához, mint pl. a CD46 (19). A D csoportba tartozó adenovírusok a sejt felszíni  $\alpha$  (2,3) tartalmú glikokonjugátumokhoz kötött szialinsavat használják receptorként (20).

Az AdV-ok  $\alpha_V$  integrineket használnak másodlagos receptorként a sejtbejutáshoz. Az integrinek a heterodimer sejtfelszíni receptorcsalád specifikus tagjai, olyan sejtbiológiai folyamatokban vesznek részt, mint a sejtadhézió, sejtváándorlás, differenciálódás, vagy a proliferáció (7, 21). Egy meghatározott arginin-glicin-aszparaginsav (RGD) tripeptidszekvenciával rendelkező mátrixmolekula képes az integrineken keresztül sejtadhézió kialakítására. Az AdV penton bázis mind az öt alegysége tartalmazza ezt az RGD szekvenciát, amelyek az ellenanyagkötést, így feltehetőleg az integrin kötést is lehetővé teszik (7). RGD felismerő integrinek közé tartozik az  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_{11b}\beta_3$  és szinte az összes  $\alpha_V$  integrin. A pentonbázis és az  $\alpha_V$  integrin kapcsolata (leggyakrabban az  $\alpha_V\beta_3$  és az  $\alpha_V\beta_5$ ) biztosítja az adenovírusok internalizációját a klatrin burkos vezikulákba (21).

Az AdV-ok kölcsönhatása a gazdaszervezet sejtjeivel igen összetett (2. ábra). Az adenovírus bejutását első lépésként a fiber molekula knob doménje biztosítja. Epitóp része a CAR-hoz kötődik és a két molekula között interakció elősegíti a vírus klatrin-mediált endocitózisát ko-operálva egyéb társreceptorokkal, mint az integrinek (21). Az integrineknek kritikus szerepük van több sejtfunkcióban, a mikrobiális kórokozók pedig széles körben felismerik őket, így könnyedén képesek megtámadni számos gazdasejtet, amelyek felszínén expresszálódnak ezek az adhéziós molekulák (22). Miután az adenovírusok penton bázisa kölcsönhatásba lépett az  $\alpha_V\beta_3$  és az  $\alpha_V\beta_5$  integrinokkal, a korai endoszómában a vírus alacsony pH-jú környezetben részlegesen lebomlik, így a víruskapszid csúcsain elhelyezkedő fehérjék (pl. fiber, pentonbázis IIIa, penton körüli hexonok), felszabadulnak. A pontos szétszerelődési mechanizmus nem ismert, de feltételezhetően egy internális kapszid fehérje, a VI-es protein felszabadulása segíti elő az endoszóma membrán felbomlását, így a virionok bejutnak a citoplazmába, ahol a mikrotubulus motorok (dynein) segítségével, vektoriális transzporttal eljut a sejtmagig. A virális DNS a nukleáris póruskomplexen át jut be a sejtmagba, ahol megtörténik a vírus DNS replikációja, az új vírusrészecskék termelése és összeszerelése (7, 23, 24).



**2. ábra.** Az adenovírus sejtbe történő bejutásának sematikus ábrázolása. 1. lépés: a vírus fibre az elsődleges receptorhoz kapcsolódik. 2. lépés: a penton bázis kapcsolatba lép az  $\alpha_v$  integrinokkal, amely klatrin mediálta endocitózist vált ki. 3. lépés: a korai endoszómában a vírus alacsony pH-jú környezetben részlegesen lebomlik. 4. lépés: a csúcsfehérjék és a VI fehérje felszabadulnak, elindul az endoszóma disszociációja. 5. lépés: a VI fehérje lehetővé teszi az endoszóma felbomlását, a virion a mikrotubulusokon keresztül a magpórus komplexhez szállítódik. 6. lépés: a vírus DNS-e a nukleáris póruskomplexen át bekerül a sejtmagba ((25) alapján saját ábra).

Az AdV-ok nagyon ellenállóak, nedvességmentes környezetben akár több hétig is fertőzőképesek maradnak, de az egyes szerotípusok eltérő stabilitással rendelkeznek a különböző fiziko-kémiai hatásokkal szemben. Általánosságban elmondható, hogy széles pH tartományban képesek megőrizni a fertőzőképességüket, savasabb környezetben, pl. a gyomorban, epében is túlélnek, még a székletben is kimutathatók. Az AdV-ok 30 percen

belül elpusztulnak 56°C-os hőkezelés vagy UV sugárzás hatására. Mivel burok nélküli vírusok, ezért sok fertőtlenítő szerrel szemben ellenállóak. Az adenovírussal szennyezett eszközök és felületek fertőtlenítésére többek között 85-95%-os alkoholos oldatok (pl. etil-alkohol), kb. 5000 parts per million (ppm) nátrium-hipoklorid, 0,55%-os ortho-phthalaldehid, 2,4%-nál töményebb glutáraldehid vagy a 0,2%-os perecetsav is alkalmazható, a behatási idő pedig felhasznált szertől függ. Éterrel és kloroformmal szemben ellenállónak bizonyultak. A hatékony fertőtlenítés kiemelten fontos a kórházakban, megakadályozva ezzel a transzplantációs és az intenzív terápiás osztályokon a vírus terjedését (3, 6).

## **1.2. Gazdasejtre ható molekuláris mechanizmusok**

Az adenovírusok genomja erősen kondenzált, korai, köztes és késői régiókra oszlik. A vírus fertőző ciklusát korai és késői szakaszra bonthatjuk. A korai szakaszban a korai vírusgének átírása történik, amelyek blokkolják a gazdaszervezet immunválaszát és az apoptózist azáltal, hogy elősegítik a vírus replikációját és a késői gének expresszióját (26). A vírusgenom korai transzkripciós régióját az E1A, E1B, E3, E4 és E2 gének alkotják. Az E1A íródik át elsőként, amely elősegíti a DNS-replikációt, az E2, E3 és E4 transzkripciós egységek expresszióját, amelyek létfontosságúak a genom replikációjához és a gazdasejt antivirális immunválaszának elnyomásához (27). Megakadályozza a retinoblasztóma protein (pRB) és az E2F komplex kialakulását, ami végső soron az E2F hírvivő RNS (mRNS)-átíródást segítő fehérjék aktiválásához vezet, kiváltva a sejt kontrollálatlan növekedését (26, 28). Normál esetben ugyanis az E2F transzkripciós faktorcsaládhoz köt a G1/S átmenetet szabályozó pRb, így a sejt a G1 fázisban marad. Adenovírus fertőzés során azonban az E1A régió által kódolt fehérjék fogják megkötni a pRB-t, így az E2F felszabadul és aktiválja az S-fázisban szükséges géneket (28, 29). Az E2F aktiválódása lehetővé teszi az E2 replikációhoz szükséges korai génjeinek kifejeződését. Az adenovírusok előszeretettel fertőznek differenciált, nem osztódó hámszövetet, így az E1A indukálta sejtproliferáció elősegíti az epiteliális-mezenchimális átalakulást és a vírus DNS replikációját, a tumorszuppresszív sajátossága pedig a mezenchimális-epiteliális transzformációnak kedveznek. Az E1A gén onkogén és tumorszuppresszív tulajdonságai tehát együttesen előnyös környezetet biztosítanak a vírus sokszorozódásához (29, 30). Az E1B működésével kapcsolatban még sok

ismeretlen tényező van, de az már ismert, hogy részt vesz az onkogén transzformációban, valamint elnyomja az interferon-stimulálta géneket (ISG) és a p53 szabályozást, (31). A p53 képes blokkolni a sejtciklust a G1/S átmenetben, vagy akár apoptózist okozni, az E1B azonban olyan fehérjéket kódol, amelyek a p53 represszoraként működnek és elősegítik a vírusreplikációt (29). Az E3 transzkripció egység számos fehérjét kódol, amelyek gátolják a gazdaszervezet immunválaszát. Megakadályozzák például az antigén prezentációt, a gyulladáshoz vezető ingereket és gátolják a fő hisztokompatibilitási komplex (MHC)-I transzportját az endoplazmatikus retikulumból a plazmamembránba, megakadályozva ezzel az MHC-I molekulák vírusantigén prezentációját (28). Az E3 fehérjék gátolják a citotoxikus T-sejtek és a citokinek, például a tumor nekrozis faktor (TNF) által indukált sejthalált (32). Az E4 régió fehérjéi jelentős hatással vannak a gazdaszervezet anyagcseréjére. A géntermékek módosíthatják fertőzés során a transzkripciót, szerepet játszanak a vírus DNS replikációjában, jelen vannak az RNS splicing során és aktív tagjai a fertőzés korai szakaszából a késői szakaszba való átmenetnek, az E4 fehérjéknek egy része pedig onkogén tulajdonságokkal is bír (33). Az E4 lókuszt számos *Mastadenovirusban*, így a humán típusokban is konzervált, ezért feltételezhetően kijátssza a fajspecifikus veleszületett immunválaszt (34).

A vírusgenom replikációja után a késleltetett korai gének, a IVa2 és a IX gének elindítják a vírus ciklus következő szakaszát, a késői fázist. A késői transzkripció egységet öt késői mRNS csoportra lehet bontani, L1-L5-ig, amelyek különböző szerkezeti fehérjéket kódolnak. Ebben a szakaszban íródik át 18, egyetlen pre-mRNS-ből származó fehérje, mint például a penton, hexon, fiber és egyéb kapszidproteinek. Az adenovírusok sejtciklusa során a gazdaszervezet számos celluláris útvonala megváltozik. A DNS-javító enzimek működése, a gazdaszervezet antivirális válaszát kiváltó interferon útvonalak gátlódnak, a sejt mRNS nem képes kijutni a citoplazmába, de az adenovírus mRNS átíródás gondtalanul lezajlik ott (26).

AdV 2-vel és 5-tel fertőzött hámsejteken, fluoreszcens mikroszkóppal végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a vírusok kb. 5-15 percen belül megtapadnak a sejten, bejutnak és elérik a citoplazmát, majd 30-45 perc múlva elérik a nukleáris pórus komplexet, a virális genom felszabadul, és a sejtmagba importálódik. A fertőzés után 1-2 órával kezdődik el a génexpresszió, amelynek első lépése az E1A fehérje termelődése. A replikációs kompartmentek a vírus sejtbe történő belépését követően 6-8 óra múlva

keletkeznek, ez pedig már a gazdaséjt magjában morfológiai változásokat is előidéz. Mielőtt összeszerelődnének a kapszidok a sejtmagban, a szerkezeti fehérjék késői génexpressziójához még szükség van egy replikációra. Miután a replikált genomok csomagolása a IVa protein részvételével megtörtént, az új virionok adenovírus proteáz (AVP) segítségével érési folyamaton esnek át és végül kiszabadulnak a sejtéből. Fontos megjegyezni, hogy a fent említett folyamatok időtartama nagyban függ az egyes kísérletek körülményeitől, az alkalmazott sejtípustól és a vírus mennyiségétől (27).

### **1.3. Adenovírusok által kiváltott immunválaszok**

Az adenovírus fertőzés a gazdaszervezet veleszületett (természetes) és adaptív (szerzett) immunválaszát is kiváltja. A veleszületett immunválasz a szervezet első védelmi vonala, amely egy gyors és azonnali reakció a fertőzésekre és a kórokozók eliminálására, azonban nem specifikus, mivel a receptorai genetikailag kódoltak. Ezzel szemben az adaptív immunitás esetében a receptor gének szomatikus rekombinációja lehetővé teszi, hogy a T- és B-limfociták fókuszáltan képesek legyenek felismerni a patogéneket és létrejöjjön az immunológiai memória, amely ismétlődő fertőzés esetén segít felismerni az ugyanolyan, vagy hasonló kórokozókat. A szerzett immunválasz a fertőzést követően kb. négy nappal aktiválódik teljesen (35, 36).

#### **1.3.1. Veleszületett immunválasz**

A veleszületett immunitás elsősorban mechanikai, kémiai, sejtes és kemokin- vagy citokinvédelemből tevődik össze (37).

A mechanikai védelem része például a tüdőnyálkahártya megtisztulása és a köhögés. A nyálkában számos gátlóanyag található, mint például a nyálka szerkezetében található szialinsav-maradék, amely a vírusok által használt sejtreceptorokhoz kötődik, megakadályozva ezzel a vírusok fertőzőképességét. Az adenovírusok esetében ez a folyamat ugyan nem bizonyított, de mivel egyes adenovírusok a szialinsavat használják sejt felszíni receptorként, így sejt környezettől és AdV típustól függően a természetes immunrendszer ezen mechanizmusa gátolhatja a sejthez való kötődést (35).

A kémiai védekezés elemei közül az antimikrobiális peptideket érdemes megemlíteni adenovírusok kapcsán. Az antimikrobiális peptidek 5  $\mu\text{m}$ -nél kisebb

részecskék, amelyek megkerülve a mechanikai védelmet, képesek eljutni a terminális légutakhoz. A molekuláknak három fő csoportja van: a defenzinek, a katelicidinek és a thrombicidinek (35). A defenzinek antimikrobiális hatással rendelkeznek baktériumok, gombák és bizonyos burkos vírusok ellen. Ugyan az adenovírusok burok nélküli vírusok, úgy tűnik, hogy a defenzinek mégis gátolják az AdV fertőzőképességét, mert megakadályozzák a vírus kicsomagolódását és az endoszómális VI fehérje felszabadulását, ezáltal pedig a vírus genom kiszabadulását és sejtmagba jutását (38).

A sejtvesztésben a rezidens és a véráramból toborzott sejtek egyaránt részt vesznek, főleg a neutrofilek, a makrofágok és a természetes ölüsejtek (NK sejtek) (7, 36). A neutrofilek komplement vagy IgG jelenlétében internalizálják az adenovírust és a tüdőhöz vonzódnak (39). A legjelentősebb rezidens sejtek az alveoláris makrofágok, amelyek mintafelismerő receptorok segítségével felismerik, bekebelezik és megsemmisítik a kórokozókat, valamint antigénprezentáló tulajdonságokkal segítik az adaptív immunrendszer beindulását (35). Gyulladásos reakciókat váltanak ki és elkezdnek proinflammatorikus citokineket termelni (8).

Ezek a gyulladásos reakciók szerepet játszanak az adenovírusok szövetkárosító hatásában. Sejtmigrációt indukáló hatásuk alapján megkülönböztetünk kemotaktikus citokineket (kemokinek) és nem kemotaktikus citokineket (35). A kemokinek és a citokinek olyan szignálmolekulák, amelyek olyan sejten belüli és sejten kívüli immunvédelmi (főleg gyulladásos) folyamatokat indítanak el, amelyek végső soron a gazdaszervezet védelmét szolgálják (40). A kemokinek vonzzák a gyulladásos sejteket, aktiváló és proliferatív hatással bírnak. A nem kemotaktikus citokinek szintén rendelkeznek ilyen tulajdonságokkal, emellett pedig közvetetten stimulálják a kemokinek, így serkentik a kemotaxist (35). Az adenovírus fertőzésre adott válaszként a következő molekulák szabadulnak fel: citokinek közül például az IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , míg kemokinek esetében a CCL2, CCL3 és CXCL10. Ezek a citokinek és kemokinek nem csak emberben, de számos más fajban is dominálnak. Vélhetőleg ezek a gyulladást elősegítő molekulák nélkülözhetetlenek az antivirális immunválasz kialakulásában, a betegség súlyossága pedig korrelál a kemokinek és a citokinek mennyiségével és a fertőzés helyén eltöltött idejünkkel (40, 41). Az adenovírus fertőzés következtében kialakuló citokinválasz önmagában is fontos szerepet játszik a betegség lefolyásában. Klinikai megfigyelések azt mutatták, hogy a proinflammatorikus

citokinek nagyobb mennyiségű felszabadulása és elhúzódó expressziója jellemző azoknál a betegeknek, akiknél az adenovírus fertőzés súlyosabb betegséget okozott. Az IL-6, IL-8 és TNF- $\alpha$  megnövekedett koncentrációja összefüggésben van különböző gyermek adenovírus fertőzés súlyosságával, ugyanis hipoperfúziót, hullámzó lázat, görcsrohamokat és szeptikus sokkot is okozhatnak (41, 42).

### **1.3.2. Adaptív immunválasz**

A veleszületett immunrendszer sejtjei immunszabályozó aktivitásuk révén hozzájárulnak az adaptív immunitás beindításához, amelyben vírusspecifikus T-és B-limfociták vesznek részt (43, 44). AdV fertőzés után csoport- és típuspecifikus antitestek alakulnak ki a legtöbb emberben. A csoportspecifikus ellenanyagok a hexon ellen (amely minden adenovírusban azonos), míg a típuspecifikus ellenanyagok a fiber ellen (amely faj-és típuspecifikus antigéndeterminánsokat hordoz) termelődnek. A csoport-specifikus antitestekre nem jellemző a neutralizáció, míg a típus-specifikus ellenanyagok a víruskapszid hipervariábilis régióit támadva képesek semlegesíteni az extracelluláris vírust (6, 45).

A vírusellenes antitestek számos módon képesek megakadályozni a vírus sejten kívüli terjedését. A vírushoz kötött ellenanyagok Fc része a fagocita sejtek felszíni receptoraihoz köt, így a virionok gyorsabban eltávolíthatók a keringésből. Fertőzött sejtek felületén történő felhalmozódásukkal megakadályozzák a vírus kijutását a sejtből, valamint komplement aktiváló szerepük révén a fertőzött sejt lizálását idézhetik elő. Közvetett módon hozzájárulnak a T és B sejtek számára történő antigénprezentációhoz (43). A vírus a gazdasejtbe jutva valószínűleg védve lesz az antitestekkel szemben, így a sejtes immunválaszok veszik célba, a CD4<sup>+</sup> (helper) és CD8<sup>+</sup> (citotoxikus) T-limfociták elpusztítják a fertőzött sejtet (44). A citotoxikus T-sejtek aktiválásához olyan vírusfehérjék feldolgozása szükséges, amelyeket endogén módon termelnek, vagy fagocitálnak a dendritikus és egyéb antigénprezetáló sejtek. A HAdV-specifikus citotoxikus T-limfociták perforin-függő mechanizmus segítségével lizálják a fertőzött sejteket. A helper T-sejtek működésbe lépéséhez olyan sejtek szükségesek, amelyek más sejtek által kiválasztott antigéneket internalizálnak és prezentálnak. A CD4<sup>+</sup> T-limfocitáknak kulcsszerepe van az antivirális immunitásban, direkt (citokinek termelésével) és indirekt (B- és citotoxikus T-sejtek segítségével) módon részt vesznek a



vírusellenes válaszok létrejöttében (43, 46). Az alapján, hogy milyen gyulladásoos fehérjét termelnek, megkülönböztetünk Th1 és Th2 sejteket. A Th1 sejteknek a celluláris immunválasz szabályozásában és a vírusellenes hatásokban, míg a Th2 sejteknek az ellenanyagtermelésben van szerepe (47).

Az akut fertőzéseket követő korai adaptív immunválaszban fontos szerepe van a B-limfocitáknak, amelyek neutralizáló antitesteket termelnek és megakadályozzák, hogy a vírus a sejtbe jusson. Ezek a protektív ellenanyagok a természetes antitestek szabályozott szekréciója révén, akkor is létrejönnek, ha a gazdaszervezetet még nem érte mikrobiális támadás. Az extrafollikuláris ingerek által szekretált B-sejtek erős gazdasejt védő választ tudnak kialakítani, a centrum germinatívumban végbemenő érési folyamatok pedig hosszútávon is védelmet biztosítanak a szervezet számára, ugyanis plazmasejtek és memória B-sejtek termelődnek, amelyek hozzájárulnak a hatékonyabb B-sejt válaszhoz egy ismételt expozíciót követően (48).

Egészséges egyénekben az AdV gyakran hosszútávú tünetmentes fertőzést okoz, az elsődleges immunválaszok általában nem tudják a vírust teljes mértékben eliminálni a gazdaszervezetből. Ahhoz, hogy az AdV életképes maradjon és terjedhessen a sejtek között, ki kell játszania a gazdaszervezet vírusellenes immunválaszát (49).

HAdV-re vonatkozó vizsgálatok szerint a genom számos immunmoduláló fehérjét kódoló gént tartalmaz. Az E1A régióban átíródó proteinek képesek csökkenteni a sejtfelszíni MHC-I szintjét transzformált patkány és humán sejtekben, így az antigénprezentáció romlik és a fertőzött sejtek nem esnek áldozatul a citotoxikus T-sejtek lízisének (50). Az E1A fehérjék I-es típusú IFN-ellenes hatásokkal is rendelkeznek. Ezek az antivirális citokinek a gazdaszervezet antivirális immunválaszának korai elemei közé tartoznak. Az I-es típusú IFN-receptorokhoz olyan ligandumok kötődnek, amelyek számos gén, köztük vírusellenes fehérjék transzkripcióját segítik elő. Az I-es típusú IFN-ok fokozzák az sejtfelszíni MHC-I molekulák expresszióját, aktiválják az NK sejtek lítikus képességét tehát számos módon részt vesznek a vírus semlegesítésében. Az E1A régióról átíródott proteinek azonban gátolják az I-es típusú IFN-receptorok jelátviteli fehérjeit és az IFN- $\alpha$  és IFN- $\beta$  gének transzkripció aktivitását (51).

Az adenovírus genom ún. vírus asszociált RNS-eket (VA-RNS) kódol, amelyek szintézise a fertőzés korai szakaszában kezdődik. A VA-RNS szintén megakadályozza az I-es típusú IFN vírusellenes hatásait (51). Az E3 domén által kódolt fehérjék több

immunelkerülő mechanizmusban is szerepet játszanak, gátolják a TNF aktivitását és TNF- és Fas-függő apoptózist (32).

#### **1.4. Adenovírusok járványtana**

Az adenovírusok gazdaspecificitása általában szűk, legfeljebb egy, vagy néhány közeli rokon gerinces fajra korlátozódik, azonban a szakirodalom több esetben is beszámolt már fajok közötti terjedésről vagy adaptációról (52).

Egy kaliforniai főemlőskutató központban újvilági majmok zárt kolóniájában egy új AdV faj okozott járványos elhullást az állatok körében, meglehetősen magas, 83%-os mortalitással. Ezzel egyidőben az állatokkal foglalkozó kutatóknál akut légúti tünetek alakultak ki, az antitestvizsgálat pedig megerősítette, hogy ugyanaz az új AdV okozza a megbetegedéseket, amely a kísérleti állatok között is kitört, ráadásul az egyik páciens családtagja is, aki nem érintkezett az állatokkal, szeropozitív lett (53).

Adenovírusokat 1979 óta mutatnak ki tengeri emlősökből. Brazíliában Chiappetta és munkatársai (2017) 23 szabadon élő, májelégtelenségben szenvedő dél-amerikai medvefőka ürülékéből sikeresen mutattak ki AdV DNS fragmentumokat, amelyek nagyfokú hasonlóságot mutattak a HAdV-C speciessel. Mivel a vizsgált területek emberek által sűrűn lakottak, az állatok pedig előszeretettel látogatják a strandokat, így fennáll a lehetősége annak, hogy a hasonlóság oka a fókák és az emberek közötti érintkezés (54).

Nyuszt májából kimutatott adenovírus 71%-os azonosságot mutatott egy 3-as típusú madár AdV-vel, ami felveti a lehetőségét annak, hogy adenovírus átvitel történt az eltérő fajú ragadozó és zsákmánya között, így az 1-es típusú nyest adenovírus (marten adenovirus type 1, MAdV-1) esetleg egy fertőzött madár elejtése után tudta megfertőzni a vizsgált állatot (55).

Egy koreai állatkertben elpusztult nőtény európai vidra boncolása során szintén adenovírus fertőzésre utaló májelhalás tüneteit észlelték. Az elvégzett PCR reakciók alapján az állat kutya adenovírus 1-es (CAV-1) típusával fertőződött meg. Erre a vírusra leginkább a vadonélő kutyafélék, mint a nyérc és a bűzös borz fogékony, de akár tengeri vidrák is megfertőződhetnek, ezért a fogságban tartott állatok gondozása során elengedhetetlen a megfelelő higiénia az AdV-ok átvitelének megelőzése érdekében (56).

A háziállatok és emberi enterális vírusok vadon élő fajokra történő áttérjedéséhez nagy valószínűséggel hozzájárul az élőhelyek növekvő antropizálása, így többek között a HAdV is egyre nagyobb arányban terjed a vadon élő ragadozóknál. Pamparóák székletmintában például konvencionális PCR technikával HAdV-C, CAV-1 és -2 genomokat mutattak ki (57).

Vadon élő macskafélékben eddig csak egyszer számoltak be AdV fertőzésről, egy fogságban tartott, májelégtelenségben szenvedő leopárdnál (58). Házimacskákban az első AdV fertőzést Kennedy és Mullaney (1993) észlelte egy macska leukémiavírussal fertőzött egyedben. Az eset során elektronmikroszkóp segítségével, sejtmagon belüli zárványtesteket tapasztaltak az endothél sejtekben (59). Az esetet később PCR-rel is megerősítették (60).

Ezek adatok is rámutatnak arra, hogy a potenciálisan kórokozó vírusokkal való tartós fertőzés jelenlétét figyelembe kell venni az állatok élőhelyek közötti áttelepítésekor, valamint fogságban tartott állatok állatkertbe történő áthelyezésekor. Ezenkívül fontos kiemelni, hogy az adenovírusokat, mint a fajok közötti járványkitörések lehetséges okait, szigorúan figyelemmel kell kísérni (53, 55).

A legtöbb HAdV évszaktól és földrajzi helytől függetlenül, világszerte előfordul, egyes típusok országokra, régiókra jellemzők, de földrészek közötti átvitelek előfordulhatnak, ekkor új domináns törzsek jelenthetnek meg adott helyen. Az egyes HAdV típusokat más-más szövettropizmus jellemzi, ezért lehet, hogy a fertőzés csak egy bizonyos szervre korlátozódik, de akár többszervi érintettség is előfordulhat (3). A vírus cseppfertőzéssel, torok-és szemváladékkal, vizelettel, faecalis-orális úton, valamint szennyezett tárgyak felületéről kerülhet a szervezetbe, de a látens vírus is képes reaktiválódni és klinikai tüneteket okozni (3, 5).

A B és C típusú HAdV-k légúti megbetegedéseket okoznak, az F és G típusok a gyomor-bélrendszeri megbetegedésekért felelősek, járványos kötőhártyagyulladásokban ugyan a B csoport tagjai is előfordulhatnak, de a D típusú HAdV-ok dominálnak. Mivel a D alcsoportba tartozó HAdV-k széles szövettropizmussal rendelkeznek, így nem csak az adenovírus okozta szemfertőzésekben, hanem a fent említett betegségek mindegyikében megjelenhetnek (61). A leggyakoribb, emberi megbetegedést okozó típusok a HAdV-C1, -C2, -C5, -B3, -B7, -B21, -E4 és -F41. Immunhiányos betegekben

és transzplantáltak körében főleg a C típusok dominálnak (C1, -C2, -C5), de előfordul még emellett HAdV-A12, -A31, -B3, -B11, -B16, -B34 és -B35 (3).

A lappangási idő 2-14 nap, a primer fertőzések többsége 5 éves kor előtt, főleg az első 2 életévben történik, amikor a humorális immunválasz még nincs teljesen kifejlődve (3, 62). Az adenovírus fertőzések során látens vírushordozás jöhet létre. Az első fertőzés során episzómális formában a nyirokszövetekben, elsősorban T-sejtekben, veseparenchymában és más szövetekben akár évekig képesek lappangani, majd különböző hatásokra, vagy immunszuppresszió kialakulása esetén kismértékben elkezdhetnek szaporodni a limfocitákban és reaktiválódhatnak. Ez hetekig vagy hónapokig is tartó tünetmentes vírusürítést, perzisztenciát okoz. Mivel a sejtbe lépéshez szükséges receptorok számos sejt felszínén prezentálódnak, ezért a reaktiválódott vírusok számos kórképet tudnak kialakítani, ami főleg immunszuppresszált betegek esetében komoly következményekkel járhat (6, 63, 64).

## **1.5. Adenovírus fertőzések immunkompetens betegekben**

Immunkompetens egyéneknél a fertőzés általában tünetmentes, vagy enyhe tünetekkel jár, inkább szezonális járványok figyelhetők meg, télen, vagy kora tavasszal. Esetükben a fő kockázati tényező, hogy a zárt közösségekben gyorsan terjedhet, főleg felső légúti megbetegedéseket okozhat. Egészséges személyekben ritkán alakul ki súlyos, disszeminált infekció (3, 62, 65). A fatális kimenetel szintén nem jellemző, esetenként a kialakult tüdőgyulladás szövődményént fordul elő, azonban az utóbbi időkben beszámoltak olyan típusokról (pl. HAdV-14) vagy rekombinánsokról, amelyek esetén a fertőzött betegek nagyobb arányban igényeltek intenzív terápiás támogatást, és a halálozás is magasabb volt (62, 66).

### **1.5.1 Légúti fertőzések**

Adenovírus fertőzés esetén leggyakrabban légúti megbetegedés jellemző. A gyermekkorban kb. 5-10%-a, felnőttkorban kb. 1-7%-a a légúti megbetegedéseknek adenovírus eredetű, a tünetek az esetek nagy részében két héten belül spontán gyógyulnak és típus-specifikus neutralizáló ellenanyagok termelődnek a szervezetben (5, 67). A klinikai manifesztációk megnyilvánulhatnak köhögés, lázzal járó, torok, mandula-, garat-

vagy középfülgyulladás formájában. Tüdőgyulladás főleg az újszülöttek vagy a csecsemők körében jellemző, de ritkán egészséges felnőtteknél is előfordul. Újszülött intenzív vagy krónikus osztályokon, óvodákban, árvaházakban endémiás formában fordul elő, amelyet a B típus tagjai okoznak. Zárt közösségekben, mint például szociális intézményekben, bentlakásos iskolákban, laktanyákban akut légúti HAdV járványok alakulhatnak ki influenzaszerű tünetekkel, esetenként légcső- és hörgőgyulladással vagy hasmenéssel (5, 6, 68).

### **1.5.2. Szemfertőzések**

A szemet érintő adenovirális fertőzések járványos kötőhártyagyulladást, nem-specifikus kötőhártyagyulladást, vagy légúti tünetekhez társulva pharyngoconjunctivalis lázat okoznak. A megbetegedések általában felnőtteknél fordulnak elő, a nyári hónapokban gyakoribbak, ugyanis a nem megfelelően klórozott medencék vagy az édesvízi tavak ideális környezetet nyújtanak az AdV transzmissziójához (5). Kórházi fertőzések formájában viszonylag gyakran előfordul, mivel a korai tünetek pl. vörös szem, nem specifikusak, ezért szennyezett szemészeti műszerekkel, oldatokkal, kézzel könnyen átvihető. A nosocomiális járványok megfékezése csak szigorú ellenőrzésekkel és a sterilizálási szabályok betartásával érhető el (69, 70).

### **1.5.3. Gastrointestinális és húgyúti fertőzések**

A gyomor-bélrendszeri fertőzésekre a csecsemők és a kisgyermek a leginkább fogékonyak, esetükben akkor is kialakulhatnak a tünetek, ha az elsődleges fertőzés a légúti traktust érinti. A tünetek leggyakrabban gasztroenteritis és hasmenés, ritkán haemorrhágiás vastagbélgyulladás, hepatitis, epehólyag gyulladás vagy hasnyálmirigy gyulladás formájában manifesztálódnak (5). Egyes típusok (pl. HAdV-11, -21, 37) akut haemorrhágiás húgyhólyaggyulladást vagy húgycsőgyulladást okozhatnak (71, 72). A 36-os típus összefüggésbe hozható az elhízással, főleg a gyermekek körében, ugyanis kiváltja a zsírszövet differenciálódását, metabolikus zavarokat okoz és fokozza olyan gének kifejeződését, amelyek szerepet játszanak az elhízásban (73).

#### **1.5.4. Egyéb, ritka fertőzések**

Immunkompetens egyéneknél ritkán encephalitis, meningitis, szívizomgyulladás, kardiomiopátia, mononukleózis jellegű tünetek, tüdő diszplázia, gyerekeknél bélelzáródás, vagy hirtelen csecsemőhalál fordulhat elő (5).

#### **1.6. Adenovírus fertőzések immunhiányos betegeknél**

Veleszületett vagy szerzett immunhiányos egyéneknél a primer fertőzés súlyos lefolyású, legtöbbször azonban a vírus reaktiválódása okozza a kórképeket. A beteg életkorától, az alaptervesség jellegétől, az érintett szervtől és a HAdV típusától függően tüdőgyulladás, hepatitisz, vérzéses hólyaggyulladás, vastagbélgyulladás, hasnyálmirigygyulladás, meningoencephalitis jellemző (61).

##### **1.6.1. Veleszületett immunhiányos állapotok**

A veleszületett vagy kogenitális immundeficiencia rendellenességei az immunsejtek nem megfelelő fejlődéséből és érési folyamataiból eredeztethetők, ennek következtében a gazdaszervezet fogékonyabbá válik a fertőzésekre (61). AdV fertőzés következtében disszeminált vagy súlyos, ismétlődő légúti fertőzések alakulhatnak ki, melynek következtében a halálozási arány több mint 50%. 2-3 éves gyermekek súlyos kombinált immunhiányos szindrómával (SCID), akiknek a humorális és a celluláris immunitásuk sérült, vagy hiányzik, rendkívül fogékonyak az adenovírus fertőzésekre. A rendellenesség X kromoszómához kötött, így fiúkban gyakoribb, a különböző típusok más-más szervet érintő megbetegedést okoznak, tüdőgyulladás, haemorrhágiás cystitis, hepatitis, gastrointestinális tünetek jellemzőek. Di George szindróma, X-kromoszómához kötött agammaglobulinaemia, CD40 ligand deficiencia szintén hajlamosít a súlyos adenovírus fertőzésekre, ezen immunhiányos állapotok során meningitis, encephalitis, aplasztikus vérszegénység, máj- és lépmegegyesülés mellett az adenovírus fertőzés akár halálos kimenetellel is járhat (6, 61, 74, 75).

Immunszuppresszióval járó terhesség során az adenovírusok reaktiválódhatnak, a placentán átjutva pedig foetalis betegségeket, leggyakrabban hydrops fetalist és

intrauterin növekedési elmaradást okozhat, de egyéb kórképek, például myocarditis, intracraniális eltérések, vagy iker-transzfúziós szindróma is kialakulhat (76).

### **1.6.2. Szerzett immunhiányos állapotok**

Szerzett immundeficienciás állapotok több okra visszavezethetően is kialakulhatnak, a betegséget okozó AdV típusa és a klinikai manifesztáció pedig a beteg életkorától, valamint az érintett szervtől függően igen változatos lehet (74, 75).

Az adenovírus reaktiválódás szempontjából a hematopoetikus őssejt-transzplantációt (HSCT) igénylő betegek az egyik legveszélyeztetettebbek, ez a beavatkozás ugyanis nagymértékű immunsuppresszióval jár. Ezekben az egyénekben 5-47%-os arányban (gyermekes esetében nagyobb százalékban, mint felnőtteknél) alakul ki AdV fertőzés a transzplantációt követően, súlyos, akár több szervet érintő megbetegedéssel, valamint magas kb. 26%-os mortalitási rátával. A viraemia megelőzi a tünetek kialakulását, de átlagosan 100 napon belül izolálják a vírust, leggyakrabban székletből, vizeletből vagy torokból (5, 61, 77).

Szervátültetett recipiensekben a betegség elsősorban az átültetett szervet érinti. Az allograft típusától és az immunsuppresszió mértékétől függően vese recipienseknél 11%-ban, máj recipienseknél 3,5-38%-ban, szív, tüdő és szív-tüdő recipienseknél 7-50%-ban, bél és multiviscerális recipienseknél 4,3-57,1%-ban fordul elő adenovírus infekció (78). A fertőzést általában a transzplantációt követő hónapokban detektálják, de előfordult már halálos kimenetelű megbetegedés több mint egy évvel az átültetést követően is (62).

A humán immundeficiencia vírus (HIV) által okozott szerzett immunhiányos tünetegyüttes (AIDS) jelentkező celluláris immunhiány szintén kedvez az adenovírus fertőzéseknek. Széleskörű szervtropizmusuk révén az AdV-ok fontos szerepet játszanak az AIDS progressziójában (75). Leggyakrabban gastrointestinalis fertőzéseket és nephritist okoznak, emellett jellemző kórkép még a pneumonia, a meningoencephalitis és a hepatitis, de akár súlyos, disszeminált fertőzés is kialakulhat (61, 79). A HIV betegek 12-28%-nál fordul elő valamilyen AdV okozta megbetegedés, amely a diagnózist követő két hónapon belül az esetek 45%-ában halállal végződik (80). Tekintve, hogy az AIDS betegekben más opportunistáknak is fertőzést tudnak okozni, így a halálesetek nem köthetők kizárólag az AdV infekcióhoz (81). Leggyakrabban a D és B fajok mutathatók

ki a béltraktusból és a vizeletből, utóbbival akár hosszú ideig, tünetmentesen is ürülhet az AdV. Fontos kiemelni, hogy az AIDS betegekben a hosszútávú vírushordozás miatt különböző típusok együttesen is jelen lehetnek, ez pedig felveti a mutációk és a rekombináció lehetőségét a típusok között és a típusokon belül. A vírus E1A és E1B géntermékei ráadásul elősegítik a HIV replikációját a long terminal repeat (LTR)-szekvenciák aktiválása révén, így súlyosbítják az AIDS kórlefolyását (5, 82, 83).

A daganatos megbetegedések során alkalmazott intenzív citotoxikus és immunszuppresszív terápiák szintén AdV reaktivációt eredményezhetnek. Leggyakrabban pneumonia formájában jelentkeznek a tünetek, főleg a B és C fajok dominálnak (74, 84). Rágcsálókban történő vizsgálatok kimutatták, hogy az adenovírus géntermékek onkogén, valamint immunrendszer elkerülő tulajdonságaik révén daganatokat okozhatnak (6). Emberekben a daganatkeltő képességet még nem sikerült egyértelműen bizonyítani, de felmerült a gyanú, hogy egyes malignitásokban (pl. non-Hodgkin lymphomában, urogenitális tumorok esetén) kofaktor szerepe van a vírusnak (85, 86).

### **1.7. Adenovírusok diagnosztikája**

Az AdV-ok detektálhatók a fertőzés helyén, például orr-garatváladékból, bronchoalveolaris mosásból, vérből, vizeletből, székletből (5).

A hagyományos víruskimutatási módszerek közé tartozik a vírusizolálás, a direkt és indirekt antigén kimutatás, a szövettani vizsgálatok és az elektronmikroszkópia. A vírus a megfelelő emberi eredetű sejtvonalakon (pl. HeLa, Hep-2, A549, HEK) jól szaporodik és citopátiás hatást (CPH) vált ki, amely a felhasznált sejtípustól függően 2-10 napon belül észlelhető (61, 87). A direkt antigénkimutatás a csoport-specifikus hexon antigén kimutatására alkalmas immunfluoreszcens vagy ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) vizsgálatokkal, az indirekt antigénkimutatás pedig immunkromatográfiával, vagy latex agglutinációval történik (61, 88). Az antitestek kimutatásának az AdV vektorterápiában lehet fontosabb szerepe, amikor a kezelés előtt és közben szükség lehet az ellenanyagok minőségi és mennyiségi felmérésére a neutralizáció elkerülése érdekében (6). AdV fertőzött szöveteket vizsgálva szöveti elváltozás tapasztalható, a fertőzött sejtek megnagyobbodott magjában bazofil zárványok láthatók, in situ hibridizáció, immunhisztokémia vagy polimeráz láncreakció (PCR)



segítségével pedig meg lehet erősíteni az adenovírus jelenlétét a szövetben. A vírus egyedi, ikozaéderes morfológiája elektronmikroszkóppal is látható fertőzött sejtek magjában, parakristályos aggregátumok társaságában. A fertőzött sejtek mellett ezzel a módszerrel székletmintából is kimutatható a vírus, de a klinikai rutinlaboratóriumok körében az elektronmikroszkópos vizsgálat nem elterjedt (61, 89).

Bár a sejt kultúrákon történő AdV vizsgálatok még mindig „gold standard”-nek tekinthetők, ez és a többi hagyományos módszer időigényes és korlátozott érzékenységgű, ezért a laboratóriumok áttértek a molekuláris technikákra, mint pl. a PCR, amely mára a humán klinikai virológia egyik legfontosabb rutin diagnosztikai eszköze lett (61, 90). A vírusgenom amplifikációján és kimutatásán alapuló technika immunkompetens és immunhiányos betegek esetében is gyorsan eredményt ad. A próbák konzervált vagy hipervariábilis AdV szekvenciákon (főleg E1A, E1B, VA-RNS, hexon vagy fiber) alapulnak, csoport- és típus-specifikus primerekkel, amelyek bármilyen mintatípusból kiváló érzékenységgel és specificitással képesek kimutatni az AdV-okat (84).

Immunhiányos betegekben a leginformatívabb mintatípus a perifériás vér. Amennyiben itt már kimutatható a vírus jelenléte, az magas kockázatú disszeminált fertőzést jelez, a molekuláris módszerek azonban nagyon jól alkalmazhatók az ilyen jellegű infekciók diagnosztikájára is, transzplantált recipiensknél pedig az ismételt PCR vizsgálatok lehetőséget adnak arra, hogy az AdV szervezetbe jutása esetén, még a tünetek megjelenése előtt elkezdhesék a terápiát (3, 5). A valós idejű (real-time) PCR-ek segítségével ráadásul nyomon követhető a vírus mennyiségének változása a terápia során, azonban fontos szem előtt tartani, hogy a vírusterhelés nem feltétlenül egyenes arányos a tünetek megjelenésével, valamint a betegség súlyosságával (5, 90).

A rutin diagnosztikai laboratóriumok jellemzően nem végeznek AdV tipizálást, amelynek elsősorban epidemiológiai szerepe van, de informatív értékkel bírhat az egyes típusok elkülönítése szokatlan, vagy súlyos fertőzések esetén, valamint a megfelelő kezelés kiválasztása során. A genotipizálás restrikciós enzim analízissel (REA), egyszálú konformáció polimorfizmus analízissel vagy heteroduplex mobilitási vizsgálattal, a klasszikus szerotipizálási módszerek pedig neutralizációval vagy a hemagglutináció gátlással történtek (5, 61).

Mivel ezek az AdV típus elkülönítő módszerek idő- és költségigényesek, ezért a legtöbb laboratórium itt is áttért a gyors és megbízható, leginkább a fiber génekre és a

hipervariábilis régiókra fókuszáló multiplex PCR-ek, illetve a hexon és a fiber géneken alapuló, vagy a teljes genom szekvenálási módszerek alkalmazására (5, 61). Hagyományos, első generációs szekvenálási technológia a Sanger szekvenálás, amely 99,99%-os pontosságú, viszont időigényes módszer. Az újgenerációs (next-generation sequencing, NGS) szekvenálás meglehetősen drága, ezért a rutindiagnosztikában kevésbé elterjedt, ráadásul a leolvasásokat egy referencia genomhoz vagy transzkriptomhoz kell illeszteni, így a mutációk vagy a rekombinációk gyakran figyelmen kívül maradnak. A nanorészecskékkel végzett szekvenálás alacsony költségű és kevés mintaelőkészítést igényel, azonban nagy hibaarányal ad eredményt (91). A szekvenálási technológiák fejlődése és a költségek csökkenése a jövőben várhatóan egyre több laboratórium számára megengedi, hogy az újgenerációs és a teljes genom szekvenálás a rutindiagnosztikában is elérhetővé váljon (3).

## 1.8. Adenovírus fertőzések kezelése, terápiája

Az immunkompetens betegek nagy része tünetmentes a virémia idején, vagy enyhe tüneteket tapasztalnak, gyakran spontán gyógyulnak és nem igényelnek orvosi ellátást. A súlyos, kórházi ellátást igénylő, főleg immunszuppresszált páciensek, akiknél az immunszuppresszió nem csökkenthető vagy súlyos limfocitopéniában szenvednek, megfontolandó az antivirális kezelés alkalmazása. Az adenovírus fertőzés ellen jelenleg nincs az amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal (Food and Drug Administration, FDA) által engedélyezett specifikus terápia, de vannak gyógyszerek, amelyek hatásosnak bizonyulnak a vírus ellen, bár az AdV ellenes antivirális terápiákról a legtöbb elérhető adat *in vitro* vizsgálatok körében készült (3, 5, 61). Számos nukleozid és nukleotid analóg ígéretesnek bizonyul AdV ellen azáltal, hogy a fertőzött sejtekben gátolja a virális DNS-polimeráz közvetített DNS replikációt, ilyen a ribavirin, a cidofovir, a brincidofovir, a ganciklovir, a zalcitabin vagy a stavudin (92).

A ribavirin egy purin (guanozin) nukleozid analóg, *in vitro* aktivitással rendelkezik számos DNS és RNS vírus ellen. Nem tisztázott, hogy hogyan hat az AdV ellen, de több mechanizmus is ismert a szer esetében, például gátolja a víruspolimerázok aktivitását és növeli a mutációkat az újonnan szintetizált DNS-ek esetén (61). Morfin és munkatársai (2005) több AdV típust megvizsgáltak és azt találták, hogy csak a C faj tagjai érzékenyek a ribavirinre, *in vivo* hatékonysági vizsgálataik azonban ellentmondásosak (3,

93). Mellékhatása enyhe vérszegénység lehet, amely visszafordítható, ezért érdemes megfontolni a terápiás alkalmazását. Orálisan, intravénásan és aeroszolozos kezelési módok is elérhető (3, 61). Intravénásan az AdV fertőzés által okozott súlyosabb megbetegedésekben, például tüdőgyulladás, gyomorhurut vagy haemorrhágiás cystitis esetén alkalmazzák (92).

A cidofovir egy aciklikus nukleozid-foszfát analóg, amely foszfát csoporttal rendelkezik, így nem igényel celluláris foszforilációt, képes gátolni a DNS polimerázt és a vírus replikációját (5, 61, 92). DNS vírusokkal szemben antivirális hatása van, *in vitro* kísérletek alapján úgy tűnik, hogy minden fajban hatásos az AdV ellen, bár előfordulnak rezisztens mutánsok (3, 94). Jelenleg az egyik legjobb AdV elleni *in vitro* aktivitással rendelkező vírusellenes szer, főleg a csontvelő- és szervátültetettek esetében használják. Intravénásan érhető el, de számos központi idegrendszeri mellékhatást, vesekárosodást, csontvelő-szuppressziót, uveitist és retinotoxicitást is megfigyeltek az alkalmazása során. A vesekárosodás minimalizálásában segít a hidratálás és a probenecid tartalmú készítmények. A terápia időtartama néhány héttől néhány hónapig is eltarthat, hossza több tényezőtől, a klinikai választól, az AdV perzisztenciájától és eradikációjától is függ. Azon betegek esetében, ahol nagyobb esély van a disszeminált fertőzés kialakulására, célszerű lehet preemptív terápiát alkalmazni. Főleg HSCT és szervtranszplantációt követően érdemes a vírus megjelenését monitorozni a szervezetben, így már a tünetek és a gyulladásos válaszok megjelenése előtt elkezdődhet a cidofovir terápia (5, 61, 94). A brincidofovir (CMX001) a cidofovir lipidkonjugátuma, azonban kevesebb mellékhatással rendelkezik és kevésbé toxikus. Minden kétszálú DNS vírus ellen antivirális hatást mutat. Orálisan adható, miután áthalad a bélfalon, bejut a célsejtbe, ahol felszabadul a cidofovir (94).

A ganciklovir a 2'-deoxiguanozin szintetikus analógja, amely vírus kinázok általi foszforilációt igényel, hogy sejtes kinázok által katalizált mechanizmusok során ganciklovir mono-, majd ganciklovir di- és trifoszfáttá alakulhasson. A ganciklovir-trifoszfát kompetitív gátlója a deoxiguanozin-trifoszfátnak (dGTP), megakadályozza a virális DNS polimerázokat és megzavarja az AdV DNS szintézisét. Mivel azonban az AdV-ok sejtes kinázai nem túl hatékonyak a foszforilezésben, ezért a ganciklovir nem tűnik túl hatásosnak a fertőzések kezelésében, de őssejt-transzplantáltak esetén a

citomegalovírus-profilaxis céljából adott ganciklovir valamennyire csökkentette az AdV fertőzések előfordulását (3, 95).

A zalcitabin egy nukleozid reverz-transzkriptáz gátló, *in vivo* és *in vitro* körülmények között is AdV ellenes hatással rendelkezik, bár csak AdV-2, -4, -8 és 37-es típusnál történtek vizsgálatok. Szájon át bevehető tablettá formájában elérhető, azonban dózisfüggő módon perifériás neuropátiát és nyelőcsőfekélyt válthat ki (92).

A stavudin egy pirimidin (timidin) nukleozid analóg, nukleozid reverz transzkriptáz inhibitorok közé tartozik. A celluláris kináz foszforilezése után stavudin-trifoszfáttá alakul, így képes leállítani a DNS szintézist. Alapvetően a HIV terápiában alkalmazzák, de a 3-as és a 4-es típusú AdV ellen jelentős gátló hatást fejtett ki. Származéka, a stampidin *in vitro* és *in vivo* hatásosnak bizonyult gyógyszerérzékeny és gyógyszerrezisztens AdV ellen (92, 94).

A nukleokleozid analógok mellett számos egyéb lehetséges antivirális szer áll vizsgálatok alatt, például micro RNS-ek, átmeneti fém-komplexek, vagy bispecifikus monoklonális ellenanyagok (94).

Az adenovírus fertőzések elleni antivirális terápia jelenleg nem elégséges, további kutatásokra, esetleg új irányvonalakra van szükség a legmegfelelőbb gyógymód eléréséhez. Az antivirális gyógyszerek mellett az AdV terápiájában nagy szerepe van az immunrendszer helyreállításának. Hatásos lehet a sejtes immunválasz támogatása HAdV specifikus T-sejtek átvitelével allogén T-sejtdonorok segítségével, de ígéretesnek bizonyulnak azon vizsgálatok is, amelyek a CD4<sup>+</sup> limfociták mellett típus-specifikus antitestek növelésével, esetleg, ha megoldható, akkor az immunszuppresszív terápia átmeneti csökkentésével, vagy intravénás immunglobulin terápiával próbálják eliminálni az AdV-t a szervezetből (3, 96, 97).

Adenovírus elleni vakcina lakossági felhasználásra nem áll rendelkezésre. Az Egyesült Államok hadserege számára 1971 óta, a 4-es és a 7-es típus ellen van élő, attenuált vírust tartalmazó orális vakcina, amely megakadályozza a járványokat a katonai kiképző központokban, az oltás hatására termelődő ellenanyagok pedig keresztvédelmet nyújthatnak más típusok ellen is (5, 98).

### 1.8.1. Avemar hatása

Az immunrendszer helyreállítását célzó AdV terápiák során érdemes lehet megfontolni a speciális táplálékkiegészítők használatát. Az Avemar elnevezésű speciális élelmiszer egy magyar, szabadalmaztatott fermentált-búzacsíra kivonat. Az amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal (Food and Drug Administration, FDA) által elfogadott, általánosan biztonságosnak elismert státuszú (Generally Recognized as Safe, GRAS) produktum (81, 99). Magyarországon 1998-ban került forgalomba, 2002-ben pedig daganatos betegek étrendkiegészítőjeként törzskönyvezték az Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet engedélyével. Az Avemar készítmények aktív összetevője az Avemar pulvis (100, 101, 102).

Az Avemar alapját a búzacsíra előnyös tulajdonságai szolgáltatják, ugyanis a búza ezen része tápanyagokban rendkívül gazdag, esszenciális zsírsavakat, vitaminokat és ásványi anyagokat tartalmaz (103). Az 1950-es évek óta ismert, hogy *Saccharomyces cerevisiae* segítségével történő erjesztés során a csírasejtek glikozidjai benzokinonokra hasadnak, a kinonoknak pedig már Szent-Györgyi Albert is tumorelles hatást tulajdonított (104). Az Avemar gyártása során szintén *Saccharomyces cerevisiae* segítségével történik az erjesztés (18 órán át, 30°C-on), a végtermék pedig 0,04%-os koncentrációjú, standardizált methoxy-szubsztituált benzokinonokat (2-methoxybenzokinon, 2-MBQ és 2,6-dimethoxy-para-benzokinon, 2,6-DMBQ) tartalmazó vegyület. Az Avemar pulvisban ezenkívül megtalálható az erjesztett búzacsíra összes vízben oldódó anyaga porlasztva szárítva, olyan segédanyagokkal, mint az élelmiszer-minőségű maltodextrin és szilícium-dioxid (104, 105).

Az Avemarral történő kutatások eddig számos pozitív tulajdonságról számoltak be, többek között immunmoduláló, rákos betegekben gyulladáscsökkentő, tumorelles hatásokról (103, 106, 107). A klinikai vizsgálatok alapján előnyös lehet autoimmun és daganatos megbetegedések kiegészítő kezelésekként, mert pozitívan befolyásolhatja a betegség lefolyását (108). Ezen tulajdonságait széleskörű hatásmechanizmusának köszönheti. Elősegíti a daganatos sejtek apoptózisát azáltal, hogy gátolja a poli-(adenozin-difoszfát-ribóz)-polimeráz (PARP) enzimet (109). Megakadályozza a rákos sejtek MHC-I szintézisét, így a sejt immunválasz működésbe lép és ezek a sejtek a természetes ölősejtek (NK sejtek) áldozataivá válnak (110). A *de novo* DNS szintézis egyik kulcsenzimének, a ribonukleotid-reduktáznak, *in situ* aktivitását is jelentősen

csökkenti (111). Endotheliális sejteken növeli az intracelluláris adhéziós molekula-1 (ICAM-1) expresszióját, így lehetővé válik a fehérvérsejtek eljutása a daganatos sejtekhez (112). Azzal, hogy a pentóz-foszfát ciklus különböző útvonalain gátló hatást fejt ki, végső soron hozzájárul ahhoz, hogy a rákos sejtek kevesebb glükózt tudjanak felvenni, így a betegség progressziója is lelassul (106). Az Avemar gyulladáscsökkentő hatása abban nyilvánul meg, hogy gátolja a Ciklooxygenáz-1, -2 (COX-1, -2) enzimeket, amelyek a gyulladással mediátorok termeléséért felelősek (113).

Az Avemarnak forgalomban van egy állatorvosi gyakorlatban alkalmazott verziója is, az Immunovet, amelyet haszon- és háziállatok körében használnak prebiotikumként, ezzel is segítve az állatok egészségesebb körülményeit (114). Jótékony hatásai hozzájárulnak többek között a tej-és tojáshozam növeléséhez, az állatok súlygyarapodásához, de segítségével csökkenthető az antibiotikum használat és növelhető a populáció élettartama (103, 114, 115).

Az Avemar antimikrobiális tulajdonságait illetően eddig kevés adat áll rendelkezésre, ezen kutatások pedig kizárólag baktériumok, gombák és protozoonok vizsgálatára korlátozódtak (116, 117, 118, 119). Antivirális hatásai kutatásaink előtt egyáltalán nem voltak ismertek. Korábban sejtproliferációs és citotoxikus assay segítségével megtörtént az Avemar hatásának vizsgálata különböző sejtek (MBM, FL-4, CrFK és HeLa) morfológiájára, replikációjára és életképességére (120). Az MBM és FL-4 sejteket alacsony, 1000 µg/ml-es és ezalatti Avemar koncentráció stimulálta, CrFK és HeLa sejtekre pedig minimális hatással volt. CrFK sejtek esetén kezdetben egy átmeneti csökkenést lehetett tapasztalni a szaporodásában, de ezután a sejtek visszanyerték replikációképességüket. A kezelés első három napjában a HeLa sejtek ellenállónak bizonyultak minden koncentrációval szemben, azonban az Avemar késleltetett hatása (a vizsgálat kezdetétől számított 7. napon) visszafordíthatatlanul károsította a HeLa sejteket (99). Ez az adat összhangban van Zhurakivska és munkatársai (2018) adataival, miszerint az Avemar apoptotikus hatással rendelkezik a humán rosszindulatú daganatos sejtekre (121). A töményebb, 2000 µg/ml-es és afeletti koncentrációk már mind a négy vizsgált sejtvonal számára toxikusnak bizonyultak (99).

## 1.9. Adenovírus rekombinánsok, mutánsok, vektorok

Az AdV típusok kialakulása olyan fontos evolúciós folyamatoknak köszönhető, mint a homológ rekombináció és a mutáció. A legtöbb HAdV típus a D fajba tartozik, ami főleg a hexon, a penton és a fiber gének homológ rekombinációjának köszönhető, míg a HAdV-B fajon belül inkább a mutációk meghatározóbbak. A rekombinációhoz a gazdaszervezet hosszútávú vírusterhelésére és arra van szükség, hogy egyes sejteket egyszerre legalább két különböző AdV fertőzzön, amelyek hasonló nukleotidokkal rendelkeznek az ún. rekombinációs „hot-spot” szakaszokban, ahol a rekombinációs események nagy része történik (2, 3). A rekombinációk feltételezhetően befolyásolják a vírus patogenezt és virulenciáját. Dhingra és munkatársai HAdV-C fajokat vizsgálva többszörös rekombinációkat találtak a korai gén régiókban (pl. E1 és E4), ami hozzájárulhat a C fajok evolúciójához, míg a kapszidfehérjék génjeinek rekombinációja elenyészőnek bizonyult (122).

Az adenovírusokról már több esetben bebizonyosodott, hogy nem csak fajon belül, hanem fajok közötti rekombinációra és adaptációra is képesek. Számítógépes elemzés során valószínűsíthető, hogy a HAdV-E fajhoz tartozó 4-es típus egy majom AdV-al (SAdV-E26) horizontális géntranszferrel két rekombinációs esemény során alakulhatott ki. A szakirodalom már beszámolt különböző zoonózisokról, főemlős, denevér, macskaféle, sertés, kutya, juh és kecske esetében is (52-123). Mivel feltételezhetően a jövőben is számolni kell hasonló eseményekkel, fontos az AdV diagnosztika fejlesztése és a klinikusok, kutatók szemléletformálása, hogy időben azonosítani tudják a potenciális veszélyeket (2).

Az elmúlt évtizedekben génterápiás vektorok céljára is rekombináns adenovírusokat állítanak elő (124). Az AdV-vektor előnye, hogy nagy mennyiségben előállítható, *in vivo* és *in vitro* is képes eljuttatni a célgéneket osztódó és nem osztódó sejtekhez, alacsony az inszerció onkogenezis kockázata, mivel az AdV-ok nem épülnek be aktívan a gazda genomjába, ha pedig a transzgéntermékek ellen nem alakul ki immunválasz, akkor még évekig expresszáldhatnak a nem osztódó sejtekben. Hátrányuk, hogy sejt felszíni receptornak CAR-t és  $\alpha\beta$  integrineket igényelnek, ezért a specifikus célbajuttatás nem lehetséges, emellett az AdV vektorok immunreakciót váltanak ki a szervezetben, mivel az általuk kis mennyiségben expresszált sejt felszíni receptorokra a veleszületett és szerzett immunrendszer is reagál (125, 126). Az AdV

vektorok előnyeinek kihasználása érdekében pontos klónozási és génszerkezeti eljárásokat kell alkalmazni (2).

Az adenovírusok jól használhatók onkolitikus vírusként, génalapú vakcinaként vagy génterápiás vektorként. (2, 125). A daganatellenes terápiában daganattípustól függően más-más vektort kell használni. Az onkolitikus terápiás vektorokat úgy alakítják ki, hogy specifikusan képesek legyenek a tumorsejtekben replikálódni és elősegíteni a sejtlízist. Ezen vektorok segítségével a transzgenek a tumorsejteken belül tudnak amplifikálódni és így jelen lenni az egész daganatban (126, 127).

Az utóbbi évtizedben elkezdtek az AdV-okat a vakcinagyártásban is alkalmazni, mivel a vektorba be lehet ültetni más mikrobák (pl. influenzavírus, Ebola-vírus, HIV, *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis*, SARS-CoV-2) antigén kódoló génjeit. Mivel az emberek közel 100%-a fertőződik élete során különböző AdV típusokkal, ezért a populáció nagy része szeropozitivitást mutat a vírus ellen, az ellenanyagok pedig neutralizálhatják a vektort, gátolva így a transzgen hatását. Ebből kifolyólag olyan AdV-okat alkalmaznak a vakcinagyártás során, amelyek ritkán fertőzik a humán populációt, módosítottak, vagy állati eredetűek, így az immunválaszok, például a citokin vihar elkerülhetők (128). 2014-ben a kínai CanSino Biologics vállalat már készített AdV-alapú oltóanyagot az ebola ellen, de a 2019-es koronavírus járvány alatt is számos hasonló vektor alapú vakcinát készítettek, például az Oxfordi Egyetem és az Astra-Zeneca által gyártott oltóanyag estén a SARS-CoV-2 tüskefehérje génjét rekombináns csimpánz AdV vektorba építették, a moszkvai Sputnik V oltási sorozat tagjai pedig HAdV-26 és HAdV-5 alapú vektorok (126, 129, 130).

Az adenovírusal végzett génterápiás vizsgálatok leginkább a rákgyógyításra és oltóanyag fejlesztésére irányulnak, amelyekben a cél egy olyan vektor létrehozása, amely idegen antigénfehérjéket, vagy genetikai hiba kijavítására szolgáló nem mutáns fehérjét expresszál (131).

Biztonsági profilját és expresszióját tekintve az AdV-ok nagyon hatékony génszállítók. Az elmúlt évtizedekben a vad típust fokozatosan módosították, hogy minél biztonságosabbá és hatékonyabbá tegyék. Leggyakrabban az AdV-2 és AdV-5 típusokat használják rekombináns vektorok előállításához, mivel ezek enyhe légúti tüneteket okoznak, nem onkogének, így csak enyhe immunválaszt váltanak ki a szervezetben (126).



Az AdV vektoroknak különböző típusai vannak. A replikáció hibás (RD) AdV vektorokból hiányzik a DNS replikációhoz, a gazdasejt apoptózisának kiváltásához és az utóvírusok létrehozásához szükséges E1A, E1B és E3 gén, így a vektor csak bejuttatja a kívánt gént a sejtbe, amely ennek hatására nagymennyiségű terápiás transzgén fehérjét expresszál, de a vírus nem tudja elpusztítani a sejtet, tehát nem alakul ki valós AdV fertőzés a szervezetben. Ezen vektorok előnye, hogy biztonságosak, mert kevés vektorfehérjét expresszálnak, az E1 gén hiánya miatt pedig több idegen DNS-t tudnak szállítani, akár  $10^{13}$ /ml víruspartikula juttatható be a szervezetbe, valamint osztódó és nem osztódó sejteket egyaránt képes fertőzni (125, 126). A replikáció-kompetens (RC) vektorokat a daganatos terápiákban vizsgálják, mert életciklusuk végén lizálják a rákos sejteket. Mivel a tumorsejtek génexpressziója elősegíti az AdV replikációt, ezért az AdV-vektorok jobban szaporodnak ezekben a sejtekben, mint a normálakban, ahol a sokszorozódáshoz több AdV fehérjét kell átírni. Hátrányuk, hogy nem képesek a transzgén replikálására és a transzgén kifejeződésének növelésére, ráadásul hiába hiányzik az E1 gén, a vírus fennmaradó részei képesek immunválaszt kiváltani, így a CD8<sup>+</sup> T-limfociták elpusztítják a vektorokat. Erős humorális és T-sejtválasz indukáló tulajdonságuk révén alkalmasak vakcinának (125, 131). Az immunválasz megakadályozásának érdekében ún. helper-dependens (HD) AdV vektorokat hoztak létre. Ezek liposzómába zárt, vagy polimerekkel borított virionok, amelyek nem termelnek virális fehérjéket, ugyanis az összes nyitott leolvasási keret (open reading frame, ORF) eltávolításra került. A HD-AdV vektorok szintén nem képesek amplifikálni a transzgéneket, T-sejt választ csak akkor tudnak kiváltani, ha a transzgén fehérje immunogén (6, 132). Léteznek replikáció-kompetens AdV-ok, amelyekből nem hiányzik az E1 gén, így egy transzgént akár többezerszeresen is képesek lemásolni, azonban ezek használata során fennáll a lehetősége annak, hogy AdV fertőzéseket okoznak a gazdaszervezetben (125). Barry és munkatársai (2018) olyan egyciklusú AdV vektorokat fejlesztettek ki, amelyek nagymennyiségű génamplifikációra képesek (E1 gén jelen van) anélkül, hogy utóvírusok termelődnének (pIIIa gén hiányzik), így nem képesek fertőzést okozni. Mivel ezek a vektorok erősebb és tartósabb immunválaszt generálnak, ezért előnyösen alkalmazhatók vakcinaként (133). Az E1 vagy az E4 promóterek kicserélésével, vagy az E1A és E1B fehérjék mutációjával feltételesen replikálódó AdV-ok hozhatók létre, amelyek képesek specifikusan csak a rákos sejtekben aktiválódni, így

a jövőben potenciálisan felhasználhatóvá válik a daganatellenes terápiában, bár még szükség van további *in vivo* vizsgálatokra. Az AdV-ok tehát rendkívül hatásos *in vivo* génexpressziós rendszerek, azonban a hátrányaik kiküszöbölése érdekében további megoldások szükségesek. Adeno-asszociált vektorok alkalmazásával, például korlátozott immunválasz alakul ki, azonban ezek kapacitása is kisebb (125, 126).

## 1. 10. Állatmodellek

Alapvetően számos laboratóriumi kisállat áll rendelkezésre a vírusok *in vivo* patogenezisének vizsgálatára, azonban az adenovírusok tanulmányozására nincs ideális állatmodell, mivel a vírus rendkívül fajspecifikus (134). Egyes egértörzsekben alacsony szinten képes a HAdV szaporodni, azonban ez a replikáció nem elegendő ahhoz, hogy modellezni lehessen vele a humán szervezetben végbemenő folyamatokat. Léteznek állatmodellek kifejezetten egy-egy betegségre, pl. új-zélandi fehér nyulat használnak az AdV okozta járványos keratoconjunctivitis, ADS-12 egér tüdőadenokarcinóma sejtvonalat pedig onkolitikus adenovírus fertőzés tanulmányozására (64, 135).

Ezek a modellek azonban nem alkalmasak teljes szervezetet érintő fertőzés reprodukálására. A HAdV fajok eltérő fertőzőképessége egyes kisállat fajokban jelenleg nem tisztázott. Két olyan rágcsálófaj van, amelyekben a HAdV-C és bizonyos HAdV-B fajok replikálódnak, a gyapotpatkány (*Sigmodon hispidus*) és a szíriai aranyhörcsög (*Mesocricetus auratus*) (135). A megfelelő kisállatmodell megtalálásán kívül fontos a különböző állati adenovírusok és a természetes gazdaszervezeteik között kialakult patológiai folyamatok feltárása és összehasonlítása az emberi szervezetben ismertekkel, mert így új ismereteket szerezhetünk a humán kórlefolyást illetően is (134).

### 1.10. 1. Macska AIDS modell

A HIV-hez hasonlóan a feline immunodeficiency virus (FIV) macskákban okozza a macskák szerzett immunhiányos tünetegyüttesét. Mindkét vírus a *Retroviridae* család *Lentivirus* nemzetségébe tartozik, genetikai, strukturális, biológiai tulajdonságaikat, valamint kórlefolyásukat tekintve is nagyon hasonlóak (81, 136).

A HIV-hez hasonlóan a FIV fertőzésre is jellemző, hogy egy tünetmentes, enyhe, vagy közepesen súlyos tünetekkel járó akut fázissal kezdődik, ezt pedig fokozatosan egy

terminális fertőzésbe történő átmenet követi (137). A korai szakaszban, amely a fertőződést követően kb. 4-8 hétig tart, a humán kórlefolyáshoz hasonlóan a CD4<sup>+</sup> T-lymphocyták száma hirtelen megnő. Ezt egy elhúzódó, tünetmentes időszak követi, melynek során a vírus szintje stabil marad, a CD4<sup>+</sup> T-lymphocyták és egyéb immunsejtek számában pedig fokozatos csökkenés tapasztalható. Ezzel egyidőben a CD8<sup>+</sup> T-sejtek száma és az általuk mediált programozott sejthalálok emelkednek (138). A humán tünetekhez hasonlóan a klinikai fázisban szájüregi opportunistá fertőzések, nekrotizáló vagy fekélyes gyulladások, felsőlégtúti megbetegedések jellemzők és a FIV is összefüggésbe hozható a daganatos megbetegedésekkel, macskákban leggyakrabban B-sejtes lymphoma alakul ki (81, 138).

A HIV és a FIV közötti hasonlóságok lehetőséget teremtenek a humán AIDS megbetegedések jobb megértésére a macska AIDS-modellen keresztül. Jelenleg ez az egyetlen kisállatmodell, amelyet nemzetközi körökben is használnak és lehetőséget kínál új terápiás lehetőségek tesztelésére és a humán kórlefolyás jobb megértésére. A modell azonban nem csak a HIV, de egyéb humánpatogén és retrovírus kölcsönhatások vizsgálatára is alkalmazható, mivel a házimacskák több humán homológ vírust, baktériumot és gombát hordozhatnak (139).

### **1. 11. Macska adenovírus (FeAdV)**

A macska (*Felis catus*) az emberi AIDS egyetlen természetes kisállatmodellje, így tanulmányozhatók a retrovírusok és egyéb heterológ mikrobák közötti kölcsönhatások a macska AIDS során (139, 140).

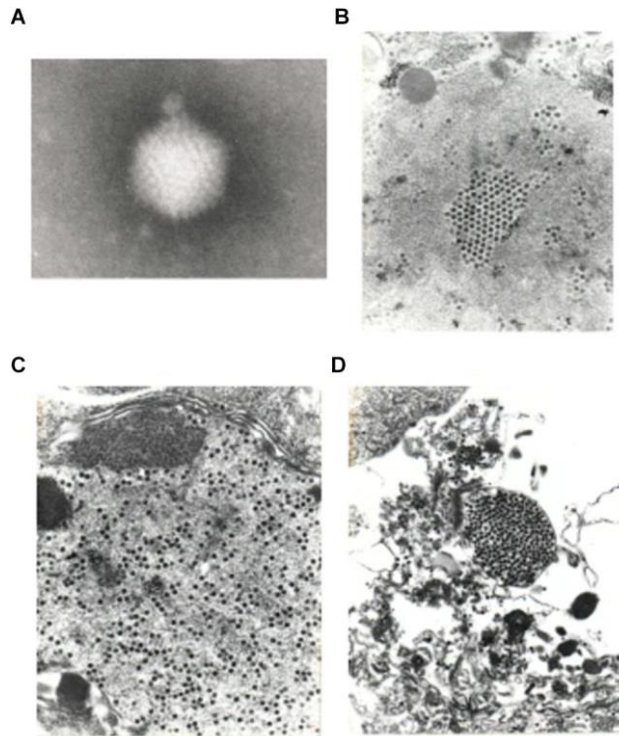
Mivel az AdV számos fajban megtalálható, képes transzaktiválni a HIV-et, valamint különböző vektorterápiában alkalmaznak rekombináns AdV-okat, így felmerült az igény a macskákon végzett AdV vizsgálatok iránt, amelyeket azonban olyan körülmények nehezítenek, hogy a macskák természetes AdV fertőzéseiről elenyésző adat áll rendelkezésre, valamint a diagnosztika eszközei is hiányoznak. Néhány tanulmány beszámolt potenciális AdV jelenlétről fekete párducban és házimacskában, de a vírusizolálásra nem került sor (58, 59).

Lakatos és munkatársai (2000) a 90-es években több AdV kutatást is végeztek macskákban. Először Európa több országából és az Egyesült Államokból származó állatok vérének vizsgálták meg házi ELISA kittel HAdV-1 hexon antigén jelenlétében és a macskák

9,8-20,3%-a (a magyarországi minták 15%-a) bizonyult szeropozitívnak. Pozitív kontrollként szeronegatív SPF macskákat immunizáltak tisztított HAdV-1 hexon fehérjével bőr alatti kötőszövetbe és izomba juttatva és azt tapasztalták, hogy az inokuláció >1:3200-as ellenanyagtitert eredményezett bennük, a szerzők pedig felvetették annak a lehetőségét, hogy a macskák természetes úton és bizonyos hajlamosító tényezők (pl. FIV fertőzés) hatására megfertőződhetnek AdV-al (141). Ezt követően a szeropozitív házimacskákból garat és végbélmintákat vettek, majd konszenzus primereket alkalmazva nested PCR segítségével tesztelték a mintákat (142). Végül az egyik PCR pozitív végbélmintából sikerült izolálni az AdV-t egy olyan laboratóriumban, amely adenovírusoktól mentes volt, kizárva ezzel a kontamináció lehetőségét (143). Ezután megtörtént a vírus alapvető jellemzése különböző módszerekkel.

Az izolátummal összesen 25 emlős eredetű sejtvonalat fertőztek, amelyek között hámsejt, fibroblaszt, idegi eredetű és fehérvérsejt, valamint számos állati (sertés, majom, egér, hörcsög, macska) eredetű tenyészet is volt, majd 14 napon keresztül figyelték az esetlegesen kialakuló citopátiás hatást, amely ugyan eltérő ütemben és mértékben, de több vizsgált sejtvonalon (pl. CRFK, PD-50, VERO, HeLa, U87) is észlelhető volt. HeLa, HEK293, CRFK és MeWO sejteket összehasonlítva különböző mennyiségű (multiplicity of infection (moi) 0,01 és 1 vírussal fertőzve az volt a tapasztalat, hogy az izolátum moi 1 esetén a négy vizsgált sejtvonal közül háromban (HEK293, HeLa és CRFK) ugyanolyan mértékben szaporodott. Kis mennyiségű kiindulási vírus esetén (moi 0,01) a CRFK sejtekben alacsony replikáció volt jellemző, a MeWO sejtekben pedig rendkívül lassan szaporodott az AdV, feltételezhetően a MeWO sejtek szemipermisszivitása miatt (144).

A különböző sejtvonalak permisszivitását immunfluoreszcenciával és immuncitokémiai vizsgálatokkal monitorozták, a vizsgált emlőssejtek mindegyikében volt kimutatható AdV antigén, amerikai házimacskák vérsavója pedig 1:640, vagy nagyobb titert mutatott az izolátummal fertőzött M426 sejteken. A viriont sikerült elektronmikroszkóppal láthatóvá tenni (3. ábra), a PD-5, M426, HeLa, CRFK sejtek citoplazmájában pedig az adenovírusokra jellemző parakristály aggregátumok voltak láthatók (144).



**3. ábra.** Fertőzött PD-5 sejtenyészlet felülúszójából származó, negatív festődésű macska adenovírus (FeAdV) izolátum elektronmikroszkópos felvételei. A: Ikozaéder alakú,  $88 \pm 4$  nm nagyságú virion, a fiberek vizualizációja nélkül (80 000x + képnagyítás). B: adenovírusokra jellemző *pseudo array* képződmény a PD-5 sejtek magjában. C, D: vírusok szétszóródott elhelyezkedése a citoplazmában (10 000x + képnagyítás) (144).

Az izolátum hexon és fiber génjeit, amelyeknek fontos szerepe van többek között az adenovírusok osztályozásában, Sanger-féle módszerrel megszekvenálták. Fajspecifikus (HAdV-C) és típus-specifikus (HAdV-1) primereket alkalmazva két amplikont nyertek. Más primereket alkalmazva negatív eredmények születtek. A fent említett vizsgálatok alátámasztották, hogy a vírus egy macska adenovírus izolátum (feline adenovirus, FeAdV) és feltételezhetően közeli rokonságban áll a HAdV-al. Az antitest vizsgálatok során egyértelműen látszott, hogy a HAdV és a FeAdV antigénszerkezete különbözik, a macskák savójában található ellenanyagok pedig nagyobb aviditással kötődnek a FeAdV antigénekhez. A különböző sejt kultúrákon tapasztalt tág permisszivitás alapján feltételezhető, hogy a FeAdV képes azokat a sejteket megfertőzni, amelyek rendelkeznek CAR receptorokkal és  $\alpha_v\beta_3$  vagy  $\alpha_v\beta_5$  integrinokkal, ráadásul a fiber knob régiójában talált változások szintén hozzájárulhatnak a kiterjedt tropizmusához. Mivel az immunfluoreszcens és az immunhisztokémiai vizsgálatokkal sikerült FeAdV

antigéneket kimutatni humán B és T limfocita sejtekből, ezért számolni kell azzal, hogy a vírus képes megfertőzni ezeket a sejtípusokat (144).

A HAdV-C fajokról már ismert, hogy akár élethosszig tartó perzisztenciát tudnak okozni a limfoid szövetekben, ami hasonló a FeAdV kísérletekben tapasztalt eredményekkel (145). A FeAdV izolálása bizonyíték lehet arra, hogy az AdV macskákat is fertőzhet. Lakatos és munkatársai egy kétéves, májelégtelenségben szenvedő házimacskából vett, korábban már AdV szeropozitívnek bizonyult garat és rektális mintákból egy esetben PCR pozitív eredményt kaptak és egy 301 bp-os hexon gént sikerült szekvenálniuk (142). A FeAdV és a HAdV közötti hasonlóságok, valamint a macska izolátum széles szöveti permisszivitása felveti a kérdést, hogy vajon fennáll-e a zoonózis kockázata ezen vírus esetében.

## 2. Célkitűzések

1. Macskából elsőként izolált, mások által bizonyítottan emberi fertőzésre is képes adenovírus (FeAdV) hexon és fiber génszekvenciájának összehasonlítása egyéb humán és macska eredetű hexon és fiber génekkel.
2. Macska adenovírus filogenetikai elemzése és főbb biológiai karakterizálása a megfelelő rendszertani helyre történő beilleszthetőség céljából.
3. Macska adenovírus szaporodását befolyásoló főbb fizikai, kémiai, környezeti tényezők és antivirális szerek hatásának vizsgálata.
4. A daganatos betegek kiegészítő terápiájában alkalmazott fermentált búzacsírákivonat, vagyis az Avemar hatásának meghatározása macska adenovírusra és macska immundeficiencia vírusra.
5. Macska adenovírus immunmoduláns hatásainak vizsgálata és annak meghatározása, hogy az izolátum alkalmas-e génterápiás vektorként történő alkalmazásra.
6. Annak a feltérképezése, hogy a FeAdV ugyanazokon a receptorokon keresztül képes-e a sejtekbe lépni és ott fertőzést okozni, mint az adenovírusok nagy része.

### 3. Módszerek

#### 3. 1. Felhasznált sejtek és vírusok

Kísérleteink során monolayer HeLa, Crandell-Rees feline kidney (CrFK) és humán embrionális vesesejt-293 (HEK-293), valamint MBM és FL-4 szuszpenziós sejtvonalakkal dolgoztunk. A HeLa humán cervicalis carcinoma sejtvonal (ATCC CCL-2), amelyet már az 1970-es évektől használnak tudományos kutatásokban (146). A CrFK normál macska vese epiteliális sejt (ATCC CCL-94), olyan macskavírussal kapcsolatos vizsgálatokban alkalmaznak, mint például a FIV kutatás (147). A HEK-293 humán embrionális vesesejtvonal (ATCC CRL-1573), széles körben használják adenovírus vektorok és vakcinák előállításához, mivel a vírus igen hatékonyan szaporodik ezen a sejtvonalon (148). Az MBM macska T-sejt eredetű sejtvonal, amely kiválóan alkalmas az akut FIV fertőzés *in vitro* tanulmányozására, hiszen az európai eredetű FIV-Pisa/M2 és az amerikai eredetű FIV-Petaluma törzs is kiválóan szaporodik rajta (149). Az FL-4 macska limfoid sejt, amelyek krónikusan termeli a kaliforniai FIV-Petaluma (FIV-Pet) izolátumot CPH nélkül (150). Az MBM és FL-4 sejteket a Pisai Egyetem munkatársa, Dr. Mauro Pistello biztosította számunkra (Pisa, Italy) (99).

A monolayer sejtek tenyésztéséhez 4,5 g/l glükóz tartalmú DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) tápfolyadékot használtunk, L-glutaminnal és nátrium-piruváttal kiegészítve (Lonza Group AG, Bazel, Svájc), amelyhez 10% hőinaktivált foetalis borjú savót (FBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok), illetve a bakteriális fertőződés megelőzése érdekében 1% penicillin-sztreptomicint (Lonza Group AG) adtunk. A szuszpenziós sejteket 10% FBS (Sigma-Aldrich), 1% penicillin-sztreptomicint, 1% L-glutamint és 25 mM Hepes puffert (Lonza Group AG), tartalmazó RPMI-1640 tápfolyadékban szaporítottuk. A tenyésztés során minden sejtet 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében inkubáltunk 37 °C-on. A sejtek fenntartása a kísérletek során folyamatos volt, háromnaponta passzáltuk őket. Mindhárom monolayer sejtvonal passzálása során a PBS-sel történő mosási lépés után tripszin-EDTA-t (Lonza Group AG) használtunk, hogy a kitapadást segítő fehérjeszálak elemésztdjenek és a sejtek leváljanak a flaska faláról. Vírussal való fertőzés előtt a sejteket T25-ös sejtenyészítő flaskákban tenyésztettük, 90%-os konfluencia eléréséig. A sejtek mycoplasma mentesek voltak, amelyet mycoplasma detektálására alkalmas fluoreszcens DAPI (4',6-diamidino-



2-fenilindol) festékkel (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) ellenőriztünk.

Vizsgálatainkban a magyarországi macska adenovírus (FeAdV), kaliforniai FIV-Pet és európai FIV Pisa-M2 (FIV-M2, Clade B) izolátumot használtuk. A FeAdV-t tisztító szűrővel (ViraBind™ Adenovirus Purification Kit, Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, Amerikai Egyesült Államok) tisztítottuk és koncentráltuk (144). A vírus végső koncentrációja  $3,43 \times 10^9$  fertőző egység/ml (FE/ml) volt HeLa-sejteken titrálva.

A FIV-M2 vírust MBM sejtek fertőzésével szaporítottuk fel, a FIV-Pet pedig FL-4 sejtek felülűszójából származott. A vírusok koncentrációját CrFK sejteken történő titrálással határoztuk meg. A FIV-Pet titere  $10^5$  szincícium képző egység/ml (syncytium forming unit, SFU/ml), a FIV-M2 titere pedig  $10^4$  SFU/ml volt. A FIV törzskészletét a Pisai Egyetem munkatársa, Dr. Mauro Pistello biztosította számunkra (Pisa, Italy) (99).

### **3.2. Sejt- és vírusmunkák**

#### **Sejtek felvétele, passzálása és fagyasztása**

Szükség esetén a fagyasztva tárolt sejteket lehető leggyorsabban 37°C-os vízfürdőbe helyeztük és felolvasztottuk, minimális szintre csökkentve ezzel a hőmérsékletváltozás okozta sejtkárosodást. A sejteket tápfolyadékkal egészítettük ki, így a fagyasztáshoz alkalmazott dimetil-szulfoxid (DMSO, Merck KGaA, Darmstadt, Németország) toxikus hatása kevésbé hatott már rájuk, majd lecentrifugáltuk (5 perc, 1000 rpm). Ezt követően a felülűszót leöntöttük, a sejteket pedig tápfolyadékban felfuszpendáltuk és T25-ös flaskába pipettáztuk annyi DMEM+10% FBS-sel (MBM és FL-4 esetén RPMI-1640) együtt, hogy a végtérfogat kb. 10 ml legyen. A sejteket fenntartás és szaporítás céljából hetente kétszer passzáltuk. Monolayer sejtek esetén első lépésként óvatosan leszívtuk a tápfolyadékot, majd 2 x 3ml PBS-es (Lonza Group AG) mosással eltávolítottuk az esetlegesen elhalt sejteket és törmelékeket a flaska falairól. Ezt követően 1 ml 0,025%-os tripszin-EDTA (Lonza Group AG) oldat keverékét mértük a szövettenyésztő edénybe úgy, hogy ellepje a sejteket, majd maximum 5 percre inkubátorba helyeztük és állni hagytuk. Ha a sejtek sikeresen leváltak az edény faláról, akkor tápfolyadék segítségével leállítottuk a tripszin fehérjeemésztő hatását, a sejteket felfuszpendáltuk, majd újra lecentrifugáltuk őket. A felülűszó leöntése után a sejteket

szétosztottuk a szükséges számú flaskákban és kb. 8 ml tápfolyadékkal kiegészítettük, majd termosztátba helyeztük (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). MBM és FL- 4 sejtek esetén a szövettenyésztő edényben található sejtszuszpenziót lecentrifugáltuk a fent leírt paramétereken, a felülúszót leöntöttük, a szükséges mennyiségű sejtet pedig friss tápfolyadékban vettük fel.

A hosszútávú tárolás érdekében a fertőzetlen sejteket a fent leírtak alapján leválasztottuk a szövettenyésztő edény faláról, 5 percig 1000 rpm erővel centrifugáltuk, majd a felülúszó leöntése után a sejt-fal károsodását megakadályozó 10% DMSO-t (dimetil-szulfoxid) tartalmazó FBS-ben felfuszpendáltuk, 1 ml-es fagyasztócsövekben lefagyasztottuk és -80°C-on, valamint folyékony nitrogénben tároltuk. Fertőzött sejtek esetén a vírusátvitel miatt a sejtek tripszin-EDTA nélkül is leváltak a flaska faláról, így a sejteket elég volt felfuszpendálni, lecentrifugálni, majd a fertőzetlen sejtekhez hasonlóan 10% DMSO-s FBS-ben lefagyasztani. A fertőzött sejtek felülúszóját szintén 1 ml-es ampullákba mértük és -80°C-ra vagy folyékony nitrogénbe helyeztük.

### **Sejtszámolás, 24 lyukú lemez készítése**

A sejteket KOVA™ Glasstic™ Slide 10 (Fisher Scientific International, Inc, Hampton, NH, Amerikai Egyesült Államok) segítségével számoltuk meg. A sejtszámláló kamrába 100 µl-t pipettáztunk a sejtszuszpenziókból, majd fénymikroszkóp segítségével, összesen 10 négyzetben megszámláltuk a sejteket. Átlagot számoltunk, majd a sejtszámláló kamra használati utasítása alapján a következő képlettel számoltuk ki a milliliterenkénti sejtszámot:

$$10 \text{ négyzetben számolt sejtek átlaga} \times \text{szorzótényező} \times \text{hígítás} = \text{sejt/ml}$$

A kísérleteinkben 24 lyukú lemezeket (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Németország) használtunk az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz. Ezen lemezekhez az ideálisan kivitelezhető módszer érdekében  $2,5 \times 10^5$  db sejtre volt szükségünk milliliterenként. A korábban számolt sejt/ml értékből a következő aránypárral kiszámolható, hogy mennyi sejtszuszpenzióra lesz szükségünk a kívánt cél eléréséhez (a kísérletek során mindig biztonsági ráhagyással számoltuk ki a mennyiségeket):

$$\frac{A \text{ lemez elkészítéséhez szükséges sejtszám összesen (sejt/25 ml)} \times 1000}{\text{sejt/ml}}$$

Az egyenletben kapott mennyiséget kimértük a rendelkezésre álló sejtszuszpenzióból és annyi tápfolyadékkal egészítettük ki, hogy a végtérfogat 25 ml legyen. Alapos szuszpendálás után az elegyünkéből a 24 lyukú tenyésztőedény minden rekeszébe 1 ml-t pipettáztunk és a lemezt termosztátba helyeztük, hogy a sejtek kitapadhassanak.

### **Sejtek fertőzése FeAdV-vel a vírustitráláshoz**

Amikor a sejtek kb. 80-90%-ban befedték a szövettenyészítő flaska felületét, a tápfolyadékot leöntöttük a sejtekről, majd egyszer PBS-sel mostuk. Mosás után a -80°C-on 1 ml-es csövekben tárolt vírust felolvasztottuk, majd rápipettáztuk a sejtekre, hogy egyenletesen elfedje őket. 2 órán át 37°C-os termosztátban, 5% CO<sub>2</sub> koncentráció mellett inkubáltuk. Ezután a flaska tartalmát 8-9 ml 10% FBS-t tartalmazó tápfolyadékkal kiegészítettük és inkubátorba helyeztük. Minden nap fénymikroszkóp segítségével ellenőriztük a citopátiás hatást. Negatív kontrollként párhuzamosan egy nem fertőzött sejteket tartalmazó flaskát is fenntartottunk.

### **FeAdV koncentrációja**

Régebben a vírusok sejtfehérjéktől és táptalaj komponensektől történő eltávolítása cézium-kloridos ultracentrifugálással történt, azonban ez a folyamat időigényes (kb. 16-24 óra) (151). Kísérleteink során ezért a ViraBind™ Adenovírus Purification Mega Kit-et (Cell Biolabs, Inc.) használtuk, amely az AdV kapszidfehérjéinek egyedi tulajdonságain alapuló módszer, amely 1-2 óra alatt elvégezhető és az AdV több mint 90%-a kinyerhető a fertőzött szövetből. A protokoll ajánlásától eltérően HEK 293-as sejtek helyett HeLa sejtekkel dolgoztunk. A sejteket 2-3 passzálást követően addig hagytuk növekedni, amíg elérték a 90%-os konfluenciát, majd a fent leírtak alapján FeAdV-vel fertőztük a sejteket. 48 óra után, amikor a citopátia már elkezdődött, de a sejtek még nem váltak le a flaska faláról, a szövettenyészítő palackban lévő tápfolyadék segítségével a lehető legtöbb sejtet lemostuk az edény felületéről. A fertőzött sejteket lecentrifugáltuk (1000 g 5 perc), majd 50 ml felülúszót hagytunk a sejteken, a felesleget eltávolítottuk és -80°C-on tároltuk, hogy majd szükség esetén újabb sejteket lehessen fertőzni vele. Háromszor lefagyasztottuk és felolvasztottuk a fertőzött sejteket, így azok

szétestek és az AdV-ok kiszabadultak. 3000 g-n 10 percig fugáltuk a szuszpenziót, majd óvatosan leszívtuk a felülúszót, amelyet 0,45 µm-es steril szűrő segítségével szűrtünk. Ezután a kitben található tisztító szűrőn először fecskendő segítségével mosópuffert engedtünk át, majd a maximális visszanyerés érdekében kétszer egymást követően a vírus felülúszót. Ez a lépés biztosította, hogy a vírusok a szűrő pórusaiban maradjanak. Három mosási lépés után a tisztítószűrő alá egy gyűjtőcsövet helyeztünk és 2-3 ml eluáló puffer segítségével lemostuk a vírusokat a szűrő felületéről. Az átszűréseket lassan, gravitációs áramlással (max. 3-5 ml/perc áramlási sebességgel) végeztük. Végül a tisztított vírushoz 10% glicerint adtunk, 1 ml-enként szétosztottuk és -80°C-on tároltuk felhasználásig.

### **FeAdV vírustiter meghatározása immunhisztokémiával**

A vírustitert hagyományosan plakk titrálással határozzák meg, ami kb. 10 napot vesz igénybe. A QuickTiter™ Adenovirus Titer Immunoassay Kit (Cell Biolabs, Inc.) ezzel szemben 2 nap alatt eredményt ad. A kit alkalmazásával hexonfehérjék elleni antitestekkel, immunhisztokémiai festés segítségével adenovírus hexon fehérjét tudunk detektálni. A reagenseket a kit leírása szerint hígítottuk.

2,5 x 10<sup>5</sup>/ml sejtet 24 lyukú lemezre helyeztünk és 1 óráig inkubáltuk 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> koncentráció mellett. A vírusból tízszeres tovaftató hígítási sort készítettünk, és 100 µl-t pipettáztunk a hígított vírúsmintákból a 24 lyukú lemezen lévő sejtekre. A lemezt két napig inkubáltuk 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> tartalom mellett.

Két nap múlva a sejtekről óvatosan leszívtuk a tápfolyadékot, majd a fertőzött sejteket metanollal fixáltuk 20 percig -20°C-on. Az inkubációs idő letelte után a sejteket háromszor 5 percig PBS-sel mostuk, majd a nem-specifikus protein-kötőhelyek blokkolása következett szobahőmérsékleten, rázatógépen, 1 órán keresztül 1% BSA-t (bovin szérúm albumin) tartalmazó PBS-sel. Miután leszívtuk a blokkoló elegyet, minden lyukba hígított anti-hexon antitest oldatot pipettáztunk és rázatógépre helyeztük 1 órára, majd háromszor 5 percig mostuk a sejteket PBS-sel. Ezután a hígított, HRP-konjugált másodlagos antitestet mértük a sejtekre és újabb 1 órán keresztül inkubáltuk a lemezt rázatógépen, ezt követően pedig ötször 5 perces PBS-es mosás következett. Végül a frissen hígított DAB oldattal 10 percig ráztuk a lemezt, majd kétszer 5 percig PBS-sel újra lemostuk a sejteket. A vírustiter meghatározásához fénymikroszkóp segítségével, 10x-es nagyításon, minimum 5 külön látótérben számoltuk meg a barnára színeződött

fertőzött sejteket, majd az alábbi, kit-ben megadott képlet segítségével határoztuk meg a milliliterenkénti fertőző egységek számát:

$$\text{Virus titer (ifu/ml)} = \frac{\text{pozitív sejtek átlaga / mező} \times 49 \times (\text{hígítási faktor})}{0,1 \text{ mL}}$$

A hígítási faktor az a legnagyobb hígítás, ahol még meg tudunk számolni egy látótérben 5 db fertőzött sejtet. A 49-es érték megadja, hogy hány látótér található a 24 lyukú lemez 1 lyukában, az alkalmazott labormikroszkóp 10x-es objektív lencseátmérőjéből számolt érték, a kitben megadott képlet alapján.

A kísérleteink során  $10^9$  FE/ml törzskoncentrációjú vírussal dolgoztunk, amelyből minden kísérlet előtt a megfelelő hígítást készítettük el attól függően, hogy milyen moit értékkel akartuk fertőzni a sejteket. A vírus hígítás számolása a fent leírt sejt számolási lépéshez hasonlóan történt.

### 3.3. Génösszehasonlítás

A fertőzés szempontjából kulcsfontosságú hexon és fiber gének szekvenciáival összehasonlító vizsgálatokat végeztünk. A FeAdV hexont egy másik FeAdV izolátum részleges hexon génjével (GenBank azonosító: AF172246) (142), egy közép-európai (holland) klinikai mintából származó HAdV-1 izolátum hexonjával (D11 genotípus, GenBank azonosító: MN398196) (152, 153) és a HAdV-1 referencia genom hexon szekvenciájával (Genbank azonosító: AF534906) illesztettük, majd elemeztük. A FeAdV fiber génjét a közép-európai HAdV-1 izolátum fiberével (D11 genotípus, Hollandia, 1970, GenBank azonosító: MN398197) és a HAdV-1 referencia genom fiber szekvenciájával (Genbank azonosító: AF534906) hasonlítottuk össze. A többszörös szekvencia illesztésekhez az online elérhető MUSCLE (MUltiple Sequence Comparison by Log- Expectation) felületet használtuk (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). Az illesztett szekvenciák elemzése és szerkesztése BioEdit 7.2 (<https://bioedit.software.informer.com/7.2/>) és GeneDoc 2.7 (<https://genedoc.software.informer.com/2.7/>) szoftverek segítségével történt.

### 3. 4. Filogenetikai elemzés

A FeAdV 2889 bp hosszú hexon (GenBank azonosító: AY512566) és 1749 bp nagyságú fiber (GenBank azonosító: AY518270) génszekvenciáit összehasonlítottuk a GenBank adatbázisában elérhető olyan hexon és fiber szekvencia részletekkel, amelyek átfedtek a magyarországi izolátummal. A DNS szekvenciákat FASTA formátumban töltöttük le az adatbankból, a többszörös szekvencia illesztés MUSCLE segítségével történt. Az illesztett szekvenciákat GeneDoc program segítségével analizáltuk. A filogenetikai fa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) szoftver 7.0 verziójával készült, ún. szomszédösszevonó vagy *neighbor-joining* klaszterező módszerrel. Az evolúciós távolságmátrix kiszámolásához a program a Kimura 2 paraméteres modelljét alkalmazta, a törzsfá megbízhatóságát pedig 1000 ismétléses bootstrap vizsgálattal határozta meg. Az összehasonlított szekvenciák G+C arányát a  $(G + C) / (A + T + G + C) \times 100$  képlet segítségével adtuk meg.

### 3. 5. FeAdV ellenállóképességének vizsgálata

#### 3. 5. 1. Fiziko-kémiai hatások

A FeAdV-ről nagyon kevés adat áll rendelkezésünkre, a vírus alapvető jellemzéséhez azonban hozzátartozik az ellenállóképességének vizsgálata, ezért minden esetben három párhuzamos vizsgálatot végeztünk, amelyek során hőhatásnak, UV besugárzásnak, különböző pH-jú környezetnek és detergensnek tettük ki a vírust, majd meghatároztuk a fertőzőképességét. Ezek az adatok azért is fontosak, mert információt kaphatunk arról, hogy milyen sterilizálási módszerek hatásosak a vírus ellen, illetve az eredményekből következtetni lehet arra, hogy milyen szervezetekben lehet szaporodóképes.

A kísérletekben alkalmazott behatási időket és koncentrációkat a szakirodalom alapján gyűjtöttük össze, elsősorban a HAdV-1, -2 és -5 típusokkal történő kutatásokat kerestünk, de bármelyik humán AdV eredmény referenciaként szolgálhatott. Mindegyik fiziko-kémiai vizsgálat során  $2,5 \times 10^5$ /ml koncentrációban, 1 ml tápfolyadékban, 24 lyukú szövettenyésztő lemezekon szaporítottuk a HeLa sejteket és  $10^9$  FE/ml törzskoncentrációjú vírussal, moi 1 értékkel fertőztünk. Az egyes kísérletek előtt előre kiszámoltuk a szükséges vírusedményeket és 1 ml-es mikroszövetekben készítettük el a

vírus hígításokat tápfolyadék felhasználásával. Ezeket az 1 ml-es, vírusszuszpenziót tartalmazó ampullákat tettük ki hő és UV hatásnak. A különböző pH-jú oldatok és detergenssek esetén a vírust közvetlenül a megfelelő pH-jú vagy koncentrációjú oldatba pipettáztuk.

A FeAdV-vel fertőződött sejtek számát immunhisztokémiával határoztuk meg. Az eredményeket összevetettük a kezeletlen sejtekkel kapott adatokkal és a kettő különbségéből állapítottuk meg a vírusra gyakorolt hatás mértékét. Mindegyik behatás esetén azt a legkisebb időt és/vagy dózist kerestük, amely már nem eredményezett vírusszuszpenziót az immunhisztokémiai vizsgálattal.

Az AdV-ok általános hővel való sterilizálása 56°C-on, 30 percig történik (154). Kísérletünk során vízfürdő (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Németország) segítségével állítottuk be az 56°C-ot, amelybe a FeAdV tartalmú 1 ml-es csöveket helyeztük. A megfelelő behatási idő után a vírusszuszpenziót eltávolítottuk a vízből és azonnal 4°C-os hűtőbe helyeztük a sejtek fertőzéséig. A vizsgált időtartomány kezdetben szélesebb volt, 5, 10, 15, 20, 25, 30 és 35 percig tartó hőhatásnak tettük ki a vírust, majd leszűkítettük a vizsgálati tartományt és 1, 2, 3, 4 és 5 perces kezelés után fertőztük a sejteket.

UV-C fényről 200-270 nm-en beszélhetünk, ezen a tartományon belül 254 nm körül a molekuláris kötések lebomlanak, pirimidin dimerizáció révén pedig károsodik a baktériumok és a vírusok örökítőanyaga (155). A FeAdV UV besugárzással szembeni ellenállását UV-C germicid lámpa segítségével vizsgáltuk, amelynek a csúcsteljesítménye 253,7 nm-es hullámhossz és 50,5 mW/m<sup>2</sup> volt. A hőhatás vizsgálatához hasonlóan, az UV kezelést is egyre kisebb időintervallumokban alkalmaztuk. Először 10, 15, 20, 25 és 30 perces, majd ezután 1-10 perc között percenkénti sugárzásnak tettük ki a vírust. A kezelésnek kitett vírus tartalmú szuszpenziót kb. 30 cm távolságra helyeztük el az UV fénycsőtől, majd a behatási idő lejártával a szuszpenziókat 4°C-os hűtőbe helyeztük a sejtek fertőzéséig.

A vírust változó kémhatásoknak történő kitétele segítségével kívántuk monitorozni, hogy a szervezetben belül hol lehet szaporodóképes. A FeAdV ellenállását pH1-14-ig és 25°C és 37°C-on, az emberi test átlaghőmérsékletén, 5 percig vizsgáltuk. A savas kémhatású oldatokat hidrogén-klorid (HCl), a lúgos kémhatásúakat pedig nátrium-hidroxid (NaOH) alkalmazásával készítettük, a pH értékeket kézi pH mérő (VWR®),

pH10 Pen, VWR International, LLC. Radnor, PA, Egyesült Államok), OP-211/1 digitális pH mérő (Radelkis Elektroanalitikai Műszergyártó Kft. Budapest, Magyarország) és elektróda, valamint pH-indikátor papír (MColorpHast™) segítségével ellenőriztük.

Detergensek közül két népszerű fertőtlenítő hatású vegyület FeAdV ellenes hatására voltunk kíváncsiak. A nátrium-hipoklorit (NaClO) a háztartási hipó alkotóeleme, széles körben alkalmazzák fertőtlenítő hatása miatt. Az etil-alkohol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) 70%-os oldata antimikrobiális hatással bír, a felület-és kézfertőtlenítők gyakori összetevője. A NaClO oldatból (CAS szám: 7681-52-9) 40 g/l-es, a 65,5% etil-alkoholban oldott 0,4% alkil-dimetil-benzil-ammonium klorid tartalmú higiénés kézfertőtlenítő szerből (CAS szám:64-17-5 és 68424-85-1) 650 mg/l-es törzsoldatokat készítettünk, majd ezekből 2-es és 10-es léptékű hígítási sort készítettünk és ezekbe mértük be a vírusszuspenziót. A behatási időt a szakirodalmi adatok alapján, ahol számos munkacsoport különböző időpontokban vizsgált fertőtlenítőszereket egyes AdV típusok ellen, valamint mivel általánosságban elmondható, hogy a mindennapi fertőtlenítőszerek behatási ideje viszonylag rövid, 5 percben állapítottuk meg. Ennek letelte után fertőztük a sejteket az eltérő koncentrációjú detergenseknek kitett vírussal.

### **3. 5. 2. Antivirális gyógyszerek**

Az AdV okozta megbetegedésekben leggyakrabban alkalmazott gyógyszerek, a ribavirin, a cidofovir és a stavudin FeAdV-re gyakorolt hatását vizsgáltuk. Kísérletünkkel arra voltunk kíváncsiak, hogy az egyes gyógyszerek a vírus okozta megbetegedés kezelésére, vagy esetleg preemptív terápiaként történő alkalmazás esetében hatásosabbak.

A három vizsgált antivirális szerből előkísérlet gyanánt 10-es léptékű hígítási sort készítettünk, hogy fel tudjuk mérni, melyik az a tartomány, amelyen belül részletesebb kísérletekre lesz szükség, hogy megállapíthassuk az egyes szerek hatását a FeAdV szaporodására. Ezután vizsgálataink egyik részében a fertőzetlen sejteket kezeltük elő a gyógyszerekkel. Miután a sejtek kitapadtak és konfluens réteget képeztek a szövettenyésztő lemez falán, mindhárom antivirális szerből felező hígítási sort készítettünk és minden hígításból 100 µl-t pipettáztunk a sejtekre. 1,5 óráig termosztátban inkubáltuk a lemezt, majd ezután a gyógyszer tartalmú felülúszókat óvatosan leszívtuk és 10<sup>9</sup> FE/ml törzskoncentrációjú FeAdV-vel fertőztünk.



A kísérlet másik részében a vírusfertőzést követően 2 és 24 órával leszívtuk a vírustartalmú felülúszót a sejtekről és ezt követően adtuk a gyógyszerhígításokat a 24 lyukú szövettenyésztő lemezekben szaporított,  $25 \times 10^4$ /ml koncentrációjú sejtekhez. Az inkubációs idők lejárata után a sejtekre mindig új tápfolyadékot helyeztünk, ezzel leállítva az egyes hatásokat. A negatív kontroll kezeletlen, fertőzetlen sejtekből, a pozitív kontroll kezeletlen, fertőzött sejtekből állt. Korábban, előkísérlet céljából a gyógyszerek sejtekre való hatását megvizsgáltuk, mivel azonban toxicitást nem tapasztaltunk, ezért ilyen jellegű sejtkontrollt a későbbiekben nem alkalmaztunk. A gyógyszereket liofilizált állapotban vásároltuk (Sigma-Aldrich) és DMEM-mel hígítottuk. A törzsoldatunk ribavirin esetén 50 mg/ml-es, cidofovirt és stavudint illetően pedig 10 mg/ml-es volt, amelyeket felhasználásig  $-20^\circ\text{C}$ -on tároltunk. A kísérlet előtt frissen felező hígítási sort készítettünk a szerekből és három párhuzamos vizsgálatot végeztünk mindegyik körülmény esetén. A fiziko-kémiai hatások vizsgálatához hasonlóan a FeAdV-vel fertőződött sejtek számát itt is immunhisztokémiával határoztuk meg.

### **3. 5. 3. Avemar antivirális hatásainak vizsgálata**

Az Avemar pulvis közvetlenül a gyártótól (Biropharma Kft. Budapest, Magyarország) került beszerzésre. A por állagú szert DMEM tápfolyadékkal 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ -es koncentrációjúra oldottuk be. Az így készített oldatot centrifugálással tisztítottuk, majd 22  $\mu\text{m}$ -es szűrő segítségével sterilizáltuk és felhasználásig  $-20^\circ\text{C}$ -on tároltuk.

Az Avemar antivirális hatásának tanulmányozása esetén vizsgálataink nem csak a FeAdV-re korlátozódtak. Mivel az AdV-ok képesek transzaktiválni a HIV-et, ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy a FeAdV mellett a FIV-re való hatását is érdemes lehet ebben a kontextusban kielemezni.

#### **3. 5. 3. 1. Az Avemar pulvis hatása a FeAdV replikációra HeLa és CrFK sejtekben**

A FeAdV kísérleteink során egyaránt kíváncsiak voltunk az Avemar terápiás célú, valamint profilaktikus hatására is. HeLa és CrFK sejteket  $2,5 \times 10^5$ /ml koncentrációban, 1 ml tápfolyadékban, 24 lyukú szövettenyésztő lemezekben szaporítottuk. 1 órával később 500  $\mu\text{l}$  10, 50, 100, 250, 500 és 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  végkoncentrációjú Avemar pulvissal kezeltük, majd ezt követően 1 és 24 óra elteltével fertőztünk sejteket 100  $\mu\text{l}$   $2,5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  vagy

$25 \times 10^5$  FE/ml (moi 1; 2 és 10) FeAdV-vel. Ezzel párhuzamos kísérletben pedig a sejteket a fent leírtak szerint 24 lyukú lemezeken tenyésztettük, a fertőzés és az Avemar kezelés azonban fordítva történt. A sejtek lemezre történő kihelyezése után 1 órával, amikor a sejtek már kitapadtak az edény falára, először FeAdV-vel fertőztünk, majd 1 és 24 óra után pipettáztuk az Avemar korábbiakban leírt koncentrációit a fertőzött sejtekre. Pozitív kontrollként vagy csak Avemarral kezelt, vagy csak FeAdV fertőzött sejtek szolgáltak. 48 órával posztinfekció után a fertőzött sejteket a korábban leírt immunhisztokémiai módszerrel tettük láthatóvá. A kezelt és a fertőzött sejtek arányát a víruskontrollhoz viszonyítva, százalékos arányban ábrázoltuk az Avemar koncentrációk függvényében. A vizsgálattal egyidejűleg az Avemarral előkezelt, majd moi 0,1 és moi 1 mennyiségű vírussal fertőzött CrFK sejtek felülúszóiból mintákat vettünk a fertőzést követő 3. napon. A reziduális FeAdV fertőzőképességét HeLa sejteken titráltuk a korábban leírtak alapján, a titrálás eredményeit a 7. és 9. napon olvastuk le. A kapott eredményeket az Avemar koncentrációk függvényében ábrázoltuk.

### **3. 5. 3. 2. Avemar és FIV fertőzés együttes vizsgálata macska eredetű sejteken**

96 lyukú lemez lyukaira 100-100  $\mu$ l  $4 \times 10^4$  MBM sejtet helyeztünk, majd három párhuzamos vizsgálatban előkezeltük őket 0-1000  $\mu$ g/ml koncentrációjú Avemarral. Négy órával a kezelés után 50  $\mu$ l tápfolyadékban felvett  $10^5$  50%-os fertőző dózis egység (TCID<sub>50</sub>) mennyiségű FIV-Pet és FIV-M2 vírusokkal fertőztük a sejteket. A felülúszókból a 0., 5., 7., 8. és 11. napokon mintákat vettünk és CrFK sejteken titrálva meghatároztunk a két FIV izolátum fertőzőképességét. Ehhez  $4 \times 10^4$ /lyuk koncentrációban CrFK sejteket mértünk a 96 lyukú szövettenyésztő lemez lyukaiba. Amikor a sejtek elérték a 90%-os konfluenciát, eltávolítottuk a felülúszót és az Avemar kezelésnek kitett sejtek és felülúszók 10-es léptékű hígítási soraiból 100-100  $\mu$ l-t adtunk minden lyukhoz. A citopátiás hatást inverz fénymikroszkóppal követtük nyomon, majd Reed–Muench módszere alapján kiszámoltuk a TCID<sub>50</sub> értéket, amelyből meg tudtuk állapítani egy fertőző egység moi értékét (156). A kapott vírustiter eredményeket az Avemar koncentrációk függvényében ábrázoltuk.

100  $\mu$ l  $4 \times 10^4$  FIV-et folyamatosan termelő FL-4 sejt és RPMI-1640 szuszpenzióját helyeztünk 96 lyukú szövettenyésztő lemez celláiba, majd 4 órával később 100-100  $\mu$ l különböző koncentrációjú Avemar oldatot (0-1000  $\mu$ g/ml) helyeztünk a

sejtekre, három párhuzamos vizsgálatban. A sejtek morfológiáját és életképességét a 0., 5., 7., 8. és 11. napon monitoroztuk. Az egyes Avemar koncentrációkkal kezelt sejtuszuspenziókból 20 µl-t, 10<sup>6</sup>/ml-es koncentrációban, teflon borított tárgylemezekre helyeztünk, majd száradás után metanollal (Sigma- Aldrich) fixáltuk és Giemsa festékkel (Sigma-Aldrich) festettük a sejteket. A fénymikroszkópos képeket 200x-os nagyításban készítettük. A kezelést követő 4. napon mintát vettünk a sejtekből, majd centrifugálással (1000 g, 5 perc) elválasztottuk egymástól az üledéket és a felülúszót. A sejteket háromszor lefagyasztottuk és felolvasztottuk, majd 100 µl RPMI-1640 tápfolyadékban felszuszpendáltuk. A felülúszók, valamint a pelletek FIV-Pet tartalmát CrFK sejteken történő titrálással határoztuk meg a fent leírt módon.

### **3. 6. Gazdasejt receptorainak és koreceptorainak gátlása**

A FeAdV korábbi karakterizálása során már kiderült, hogy a vírus számos emlős sejtvonalon képes szaporodni. A gazdasejtek CAR és  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  integrin receptorainak gátlásával arra voltunk kíváncsiak, hogy vajon a FeAdV képes-e egyéb receptorokon keresztül is a sejtbe jutni. Kísérleteinkben 2 µg/ml végkoncentrációjú anti-CAR poliklonális antitestet, valamint 3 µg/ml végkoncentrációjú anti-  $\alpha_v\beta_3$  és anti- $\alpha_v\beta_5$  integrin monoklonális antitesteket használtunk a receptorok blokkolására (Sigma-Aldrich, ZooMAb<sup>®</sup>). Előzetes vizsgálatként  $25 \times 10^4$ /ml HeLa sejtet (mivel a korábban tapasztaltak alapján ezen a sejtvonalon szaporodott a legjobban a FeAdV) helyeztünk 24 lyukú szövettenyésztő lemezre és az egyes antitesteket külön-külön vizsgáltuk moi 1 FeAdV fertőzés során. Ezt követően szintén  $25 \times 10^4$ /ml HeLa, CrFK és HEK-293 sejtet mértünk újabb szövettenyésztő lemezekre, majd 1 órás inkubálás után (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) különböző antitest kombinációval (anti-CAR+anti- $\alpha_v\beta_3$ , anti-CAR+anti- $\alpha_v\beta_5$ , anti- $\alpha_v\beta_3$ +anti- $\alpha_v\beta_5$ , anti-CAR+anti- $\alpha_v\beta_3$ +anti- $\alpha_v\beta_5$ ) inkubáltuk őket 1 órán át szobahőmérsékleten, rázatógépen, majd ezután fertőztük a sejteket moi 0,1, moi 1 és moi 10 FeAdV inokulummal. A vírussal 2 órán keresztül inkubáltuk a sejteket 37°C-os termosztátban, majd eltávolítottuk az antitesteket és a vírust tartalmazó tápközeget és friss tápfolyadékot adtunk a sejteknek. 48 óra múlva immunhisztokémiával ellenőriztük a vírusfertőzés mértékét. Az eredményeket a víruskontrollhoz viszonyítva, százalékos arányban ábrázoltuk.

### 3. 7. FeAdV fertőzött HeLa sejtek citokin termelésének vizsgálata

Az AdV fertőzés hatására felszabaduló citokinek közül az interleukin-10 (IL-10) és a transzformáló növekedési faktor béta-1 (TGF- $\beta$ 1) termelődését vizsgáltuk ELISA módszerrel (Human IL-10 és Human TGF- $\beta$ 1, DuoSet<sup>®</sup> ELISA, R&D Systems, Inc, Minneapolis, MN, Egyesült Államok). A választás ezekre a molekulákra esett, mert az IL-10-nek fontos szerepe van a gazdaszervezet immunválaszának kialakulásában, gyulladásos és daganatos megbetegedések esetén is (157). A TGF- $\beta$ 1 egy pleiotróp citokin, a TGF- $\beta$  jelátviteli út tagjaként pedig létfontosságú szerepet játszik a biológiai folyamatokban és a betegségekben (158).

A vizsgálat első lépéseként  $10^9$  FE/ml törzskoncentrációjú FeAdV-vel fertőztünk HeLa sejteket 10 arányban, majd a sejtek felülúszójából 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48, 72, 96 és 168 óra után mintát vettünk, lecentrifugáltuk (1000 g, 5 perc) és a felülúszót és a mérésig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A fertőzött sejtekkel párhuzamosan fertőzetlen HeLa sejtek felülúszójából is ugyanezekben az időpontokban történt mintavétel, amely kontrollént szolgált a vizsgálat során.

Az ELISA vizsgálat első lépéseként a kitben leírtak szerint előkészítettük a szükséges reagensek hígításait, valamint az IL-10 és a TGF- $\beta$ 1 standard, felező hígítási sorát. Ezt követően kihígítottuk a Capture Antibody-t a kitben megadott munkahígításra, majd ezzel bevontuk egy 96 lyukú szövettenyésztő lemez lyukait és egy éjszakán keresztül lefedve, szobahőmérsékleten inkubáltuk. Másnap leszívtuk a lyukak tartalmát és három mosást követően, amikor már minden folyadékot alaposan eltávolítottunk a lyukakból, következett a blokkolási lépés 1% BSA tartalmú PBS-sel (TGF- $\beta$ 1 esetén 5% Tween 20 tartalmú PBS-sel). 1 órás szobahőmérsékleten történő inkubálást követően ismét háromszor mostuk a lemezt, így teljesen előkészítettük a vizsgálati eljáráshoz. 100  $\mu\text{l}$ -t pipettáztunk minden mintából az egyes lyukakba, majd lefedve, szobahőmérsékleten 2 órán keresztül inkubáltuk a lemezt. Háromszoros mosási lépést követően először a Reagent Diluent-el hígított Detection Antibody-val 2 óráig, majd újabb mosások után a Streptavidin-HRP munkahígításával 20 percig szobahőmérsékleten, fénytől védett helyen állni hagytuk. A lemezt ismét átmostuk, majd minden lyukba szubsztrát oldatot pipettáztunk és újabb 20 percig inkubáltunk lefedve, szobahőmérsékleten, fénytől védve. Végül a Stop Solution segítségével leállítottuk a

reakciót. ELISA leolvasó segítségével, 450 és 540 nm-en leolvastuk a lemezt, a mért értékeket pedig kivontuk egymásból, a háttérkorrekció érdekében.

### **3. 8. Statisztikai analízis**

Minden kísérlet során egyidejűleg három párhuzamos vizsgálat készült (n=3). Az adatokat standard hiba feltűntetésével ábrázoltuk. Kétmintás T próbával  $p < 0,05$  (\*) és  $p < 0,001$  (\*\*) értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

## 4. Eredmények

### 4. 1. Génösszehasonlítás

A FeAdV hexon génjét összevetve egy másik, részleges FeAdV hexonnal azt tapasztaltuk, hogy a vizsgált szakaszon összesen négy nukleotid különbség (78., 297., 312., 313. bázis) volt, amelyek közül egy aminosav változást is eredményezett, valin helyett metionin helyezkedik el a részlegesen szekvenált FeAdV szekvenciájában. A közép-európai HAdV-D11 típushoz képest három csendes mutációt (378., 1890. és 2196. pozícióban) tapasztaltunk, de mivel mindegyik bázis a triplet kód utolsó helyén volt, ezért aminosav változás nem történt. A HAdV-1 referencia szekvencia esetén egy aminosav változást nem okozó nukleotid csere történt (1. táblázat)

**1. táblázat.** A macska eredetű adenovírus (FeAdV) hexon génjének bázis és aminosavszerű összehasonlítása egy másik, részleges szekvenciával rendelkező, potenciálisan FeAdV (GenBank azonosító: AF172246), egy közép-európai 1-es típusú humán adenovírus (HAdV-1) (GenBank azonosító: MN398196) és a HAdV-1 referencia (GenBank azonosító: AF534906) hexon szekvenciáival. A bázis és aminosav eltéréseket különböző színek jelölik, a szekvenálás során nem meghatározható bázisok piros, a nem tesztelték szürke színnel kiemelve láthatók, az aminosavak töltése a zárójelben található.

Bázis pozíció	FeAdV hexon	HAdV-D11 hexon	FeAdV részleges hexon	HAdV hexon	Aminosav pozíció	Elhelyezkedés	FeAdV aminosav	HAdV-D11 aminosav	FeAdV (részleges) aminosav	HAdV-1 aminosav
78/61*	G	G	N	G	26	C1 5'-vég	glicin	glicin	glicin	glicin
297/280*	C	C	T	C	99	C1 5'-vég	tirozin	tirozin	tirozin	tirozin
306/289*	T	T	C	T	102	C1 rekombináns régió	izoleucin	izoleucin	izoleucin	izoleucin
312/295*	C	C	T	C	104	C1 rekombináns régió	glicin	glicin	glicin	glicin
313/296*	G	G	A	G	105	C1 rekombináns régió	valin	valin	metionin	valin
378	A	G	n.t	A	126	C1 rekombináns régió	lizin (+)	lizin (+)	n.t	lizin (+)
1890	T	Y	n.t	T	630	C4 3'-vég	fenilalanin	fenilalanin	n.t	fenilalanin
2196	A	G	n.t	A	732	C4 3'-vég	valin	valin	n.t	valin
2874	C	C	n.t	T	958	C4 3'-vég	alanin	alanin	n.t	alanin
2890	n.t	A	n.t	T	964	C4 3'-vég	n.t	treonin	n.t	treonin

\* a FeAdV részlegesen szekvenált hexon nukleotidjainak sorszámai

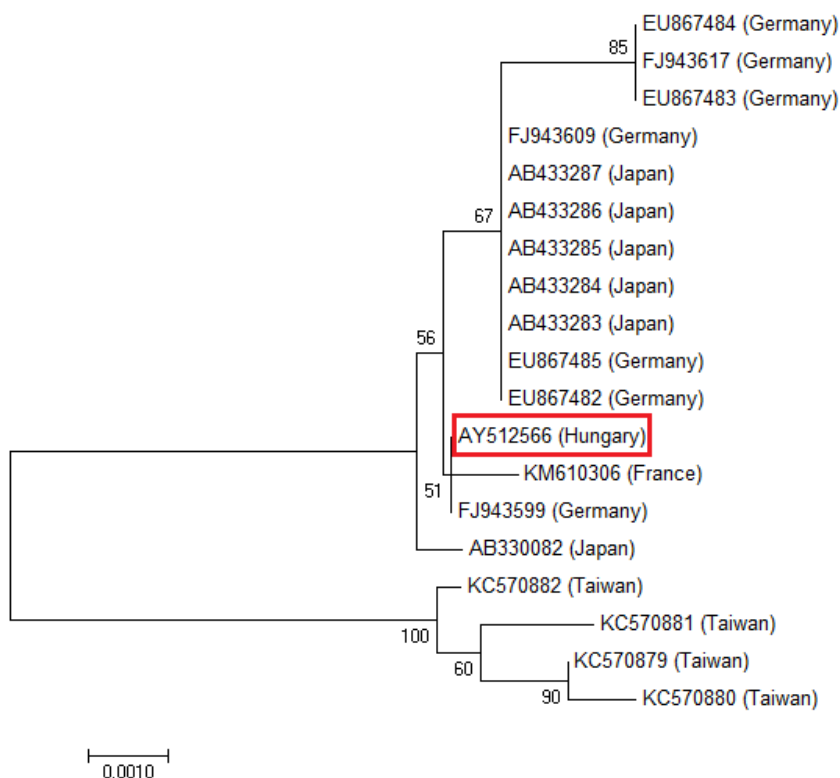
A fiber szekvenciát a HAdV-D11 típusához hasonlítva összesen 12 különbséget találtunk, ebből 3 bázis (220., 596., 1015.) a shaft régióban helyezkedett el. Mindegyik esetében aminosav változás is történt, ráadásul a 74. és a 339. aminosavak töltése meg is változott. A 74. pozícióban a negatív töltésű glutaminsav helyett pozitív töltésű lizin, a 339. aminosav esetében pedig a poláros, töltéssel nem rendelkező aszparagin helyett pozitív töltésű hisztidin található a FeAdV szekvenciájában. A FeAdV fiber knob doménjében kilenc nukleotid különbséget tapasztaltunk, négy esetben (414., 442., 472., 527.) pedig aminosav változás is történt, amely a 414. aminosav esetén töltésváltozással is járt, ugyanis a hidrofób oldallánccal rendelkező tirozin helyett egy pozitív töltésű hisztidin található. Ez a csere a fiber AB hurok régiójában helyezkedik el, amely a CAR-hoz való kötődésben jelentős szerepet játszik. A HAdV-1 referencia genom esetén a 981., 1659. és 1743. pozíciójú nukleotidok tértek el egymástól, de egyik esetben sem tapasztaltunk aminosav változást a szekvenciában (2. táblázat).

**2. táblázat.** A macska eredetű adenovírus (FeAdV) fiber génjének bázis és aminosavszintű összehasonlítása egy közép-európai 1-es típusú humán adenovírus (HAdV-1) (GenBank azonosító: MN398197) és a HAdV-1 referencia (GenBank azonosító: AF534906) fiber szekvenciáival. A bázis és aminosav eltéréseket különböző színek jelölik, az aminosavak töltése a zárójelben található ((144) alapján saját szerkesztés).

Bázis pozíció	FeAdV fiber	HAdV-D11 fiber	HAdV-1 fiber	Aminosav pozíció	Elhelyezkedés	FeAdV aminosav	HAdV-D11 aminosav	HAdV-1 aminosav
Shaft (nyél) régió (45-401 aminosavig)								
220	A	G	A	74	2. pseudorepeat	lizin (+)	glutaminsav (-)	lizin (+)
596	A	G	A	199	9. pseudorepeat	aszparagin	szerin	aszparagin
981	A	A	G	327	17. pseudorepeat	lizin (+)	lizin (+)	lizin (+)
1015	C	A	C	339	18. pseudorepeat	hisztidin (+)	aszparagin	hisztidin (+)
Knob (feji) régió (402-582 aminosavig)								
1240	C	T	C	414	AB hurok	hisztidin (+)	tirozin	hisztidin (+)
1284	C	T	C	428	BC hurok	cisztein	cisztein	cisztein
1325	G	A	G	442	CD hurok	arginin (+)	lizin (+)	arginin (+)
1341	T	C	T	447	CD hurok	prolin	prolin	prolin
1395	A	G	A	465	DE hurok	glicin	glicin	glicin
1414	A	G	A	472	DE hurok	szerin	glicin	szerin
1581	A	T	A	527	GH hurok	glutaminsav (-)	aszparaginsav (-)	glutaminsav (-)
1659	C	A	A	553	HI hurok	szerin	szerin	szerin
1743	G	A	A	581	C-terminális	glutamin	glutamin	glutamin

## 4. 2. Filogenetikai elemzés

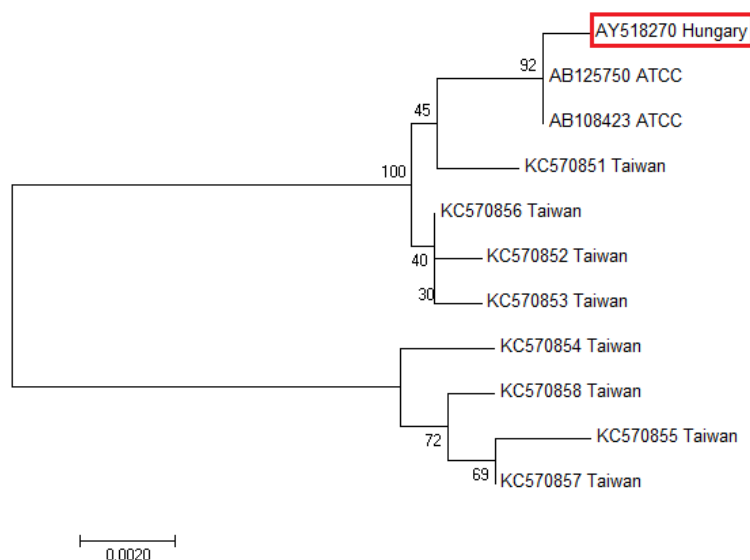
Az AdV-ok biológiai tulajdonságaiban és az osztályozásban betöltött fontos szerepe miatt a FeAdV izolátum hexon és fiber gének szekvenciáit összehasonlítottuk a GenBank adatbázisban található egyéb publikált szekvenciákkal és azt találtuk, hogy a hexon gén egy 2014-ben izolált francia (Marseille) HAdV-1-gyel áll a legközelebbi rokonságban (159) (4. ábra). Bár a szekvencia az 5' végen 341, a 3' végen pedig 171 nukleotiddal rövidebb, összesen két nukleotid különbséget találtunk (egy C-T és egy G-A csere), így az összehasonlítható részek homológiája 99,85%. A nukleotid cserék nem eredményeztek aminosav változást. A G+C tartalom 4,41%-kal magasabbnak bizonyult a FeAdV izolátumban, mint a francia hexon génben. A hexon homológiáján alapuló filogenetikai fa azt mutatja, hogy a FeAdV rokonságban áll számos német, japán és tajvani HAdV-1-gyel (4. ábra).



**4. ábra.** Macska adenovírus (FeAdV) és a GenBank adatbázisban elérhető 1-es típusú humán adenovírus (HAdV-1) hexon szekvenciák illesztésével készült filogenetikai vizsgálat eredménye. A filogenetikai fa Kimura 2 paraméteres modelljével 1000-szeres bootstrap ismétléssel készült, piros keret jelzi a FeAdV izolátum helyét (144).



A fiber gént illetően azt találtuk, hogy a legszorosabb rokonságban az 1953-as, első adenovírus izolátummal áll, amely Rowe és munkatársai nevéhez kötődik (160, 161) (5. ábra). Egyetlen, aminosav változással nem járó nukleotid különbséget tartalmaznak a szekvenciák, a köztük lévő homológia 99,83%. A G+C tartalomban elenyésző a különbség, mindössze 0,43%-kal magasabb a FeAdV fiberben. A filogenetikai fán jól látszik, hogy érdekes módon a tajvani izolátumok is egész közeli rokonságban állnak a FeAdV fiber génjével (5. ábra).



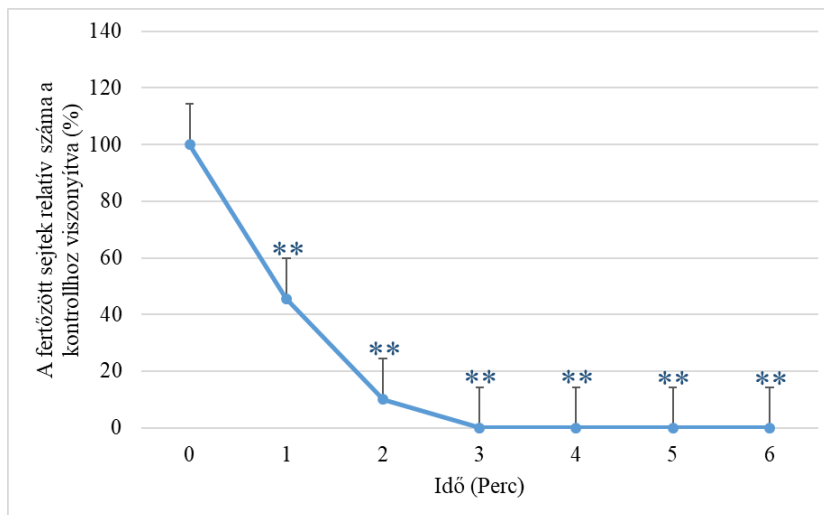
**5. ábra.** Macska adenovírus (FeAdV) és a GenBank adatbázisban elérhető 1-es típusú humán adenovírus (HAdV-1) fiber szekvenciák illesztésével készült filogenetikai vizsgálat eredménye. A filogenetikai fa Kimura 2 paraméteres modelljével 1000-szeres bootstrap ismétléssel készült, piros keret jelzi a FeAdV izolátum helyét (144).

### 4. 3. FeAdV ellenállóképességének vizsgálata

#### 4. 3. 1. Fiziko-kémiai hatások

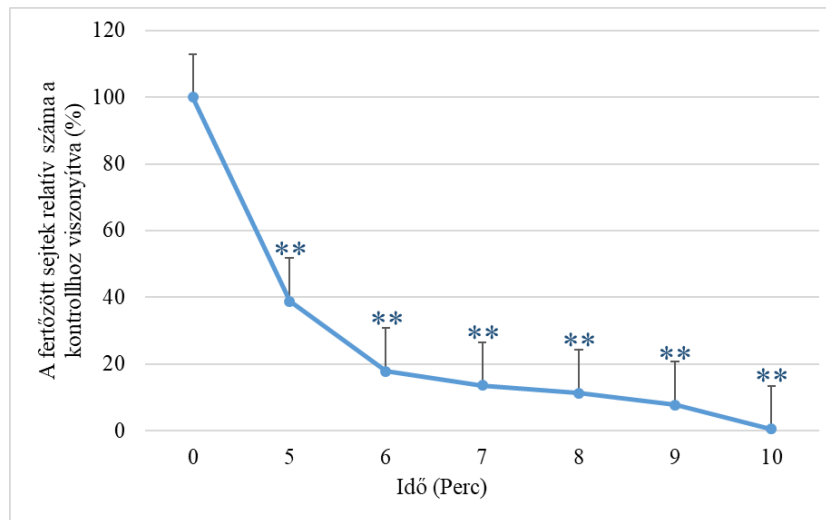
A FeAdV-t először 0, 5 és a szakirodalomban általánosan elfogadott 30 perces hőhatásnak tettük ki. Eredményeink azt mutatták, hogy 5 és 30 perc esetén már nem tudott szaporodni a vírus, ezért a vizsgálati tartományt a továbbiakban 0 és 5 perc között határoztuk meg. 56°C-os hőhatásnak kitéve, a FeAdV fertőzőképessége a kezelés hosszától függően közel exponenciálisan csökkent. Az 1 perces hőkezelés 54%-kal, a 2

perces hőhatás pedig már több mint 90%-kal szorította vissza a vírusszaporodást. Immunhisztokémiai módszerrel a 3 percig tartó hőkezelés esetén már nem tudunk fertőzött sejtet kimutatni (6. ábra).



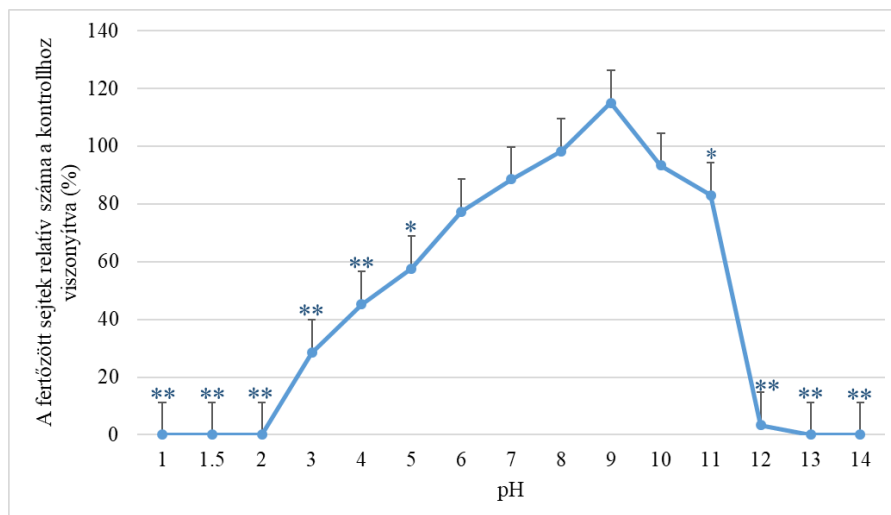
**6. ábra.** Macska adenovírussal (FeAdV) fertőzött HeLa sejtek számának változása hőkezelés hatására (56°C) a kontrollhoz képest, az idő függvényében. n=3. \*p<0,05; \*\*p<0,001.

A macska izolátum UV érzékenysége tanulmányozását szintén nagyobb időléptékekben kezdtük. A hőhatás vizsgálatához hasonlóan az első kísérlet során itt is 0, 5 és 30 perces besugárzást alkalmaztunk, lévén, hogy az általános fertőtlenítő eljárás UV sugárzással minimum 30 perc. Azt tapasztaltuk, hogy 0 és 5 perces UV hatás még nem pusztította el az összes vírust, azonban a 30 perces kezelés esetén már nem voltak láthatók fertőzött sejtek. A következő vizsgálatunkban 10, 15, 20, és 25 percig tettük ki a FeAdV-t UV fénynek, azonban a szövettenyésztő lemez egyetlen lyukában sem tudunk fertőzött sejtet kimutatni immunhisztokémiával. Ezek az eredmények arra engedtek következtetni, hogy a vírus UV érzékenysége valahol 5 és 10 perc között lehet, ezért ebben a tartományban folytattuk az izolátum érzékenysége vizsgálatát. Az immunhisztokémiai reakciót követően szépen látszott, hogy 0 és 5 perc között több mint 60%-kal kevesebb vírus volt képes fertőzni a sejteket. Ezt követően percről percre egyenletesen csökkent a fertőzött sejtek mennyisége és a 10. perc esetén már nem találtunk FeAdV szaporodásra utaló jeleket (7. ábra).



**7. ábra.** Macska adenovírussal (FeAdV) fertőzött HeLa sejtek számának változása UV kezelés hatására a kontrollhoz képest, az idő függvényében. n=3. \*p<0,05; \*\*p<0,001.

Különböző pH-jú oldatoknak tettük ki a FeAdV-t, az ellenállóképességét 1-14-es pH tartományon belül vizsgáltuk két hőmérsékleten, 25°C és 37°C-on. Az eltérő hőfok nem okozott jelentős változást az eredményekben, ezért ábránkon csak a 25°C-os eredményeket mutatjuk be (8. ábra). A savas tartományban pH 1 és pH 2 között teljes inaktiválódást tapasztaltunk. 2-es pH után szignifikáns növekedést láttunk a vírus fertőzőképességében a semleges tartomány eléréséig. Az izolátum pH 7 és pH 10 között bizonyult a legstabilabbnak, sőt eredményeink alapján a pH 9 még serkentő hatással is volt a vírusszaporodásra, ugyanis több fertőzött sejtet mutattunk ki immunhisztokémiával, mint a kezeltlen víruskontroll esetén. A 11-es és 12-es pH értékek között egy hirtelen, nagymértékű (közel 80%-os) fertőzéseszkökenést tapasztaltunk. A nagyon lúgos tartományban (pH 13-pH 14) pedig a savas tartományhoz hasonlóan, teljes inaktiválódást láttunk (8. ábra).



**8. ábra.** Macska adenovírus (FeAdV) ellenállóképességének változása különböző pH hatásoknak kitéve. n=3. \*p<0,05; \*\*p<0,001.

A NaClO oldat 40 g/l-es, és az alkil-dimetil-benzil-ammonium klorid tartalmú etil-alkohol 650 mg/l-es törzsoldatából első lépésként 10-es léptékű hígítási sort készítettünk, és ezekbe mértük be a vírusszuszpenziót. Annak érdekében, hogy semmiképp ne legyen toxikus a sejtek számára egyik szer sem, ezért a szövettenyésztő lemezre az 5 perces behatási idő után csak a  $10^2$  koncentrációtól mértük be a vírust tartalmazó hígításokat és azt tapasztaltuk, hogy a FeAdV szaporodása mindkét alkalmazott szer esetében egyenletes mértékben, szignifikánsan csökkent, de még a  $10^2$  koncentrációban is ki tudtunk mutatni fertőzött sejteket. Ezen eredmények függvényében a NaClO és az etil-alkohol törzsoldatokból 2-es léptékű hígítási sort készítettünk és 5 perc behatási idő után a NaClO esetében a nyolcszoros (5 g/l, vagyis 0,067 mol/l), az etanolos oldatot illetően pedig tízszeres (65 mg/l, vagyis 1,412 mol/l) hígításnál már nem volt immunhisztokémiával kimutatható fertőzött sejt (adatok nincsenek ábrázolva).

#### 4. 3. 2. Antivirális gyógyszerek

A ribavirin, cidofovir és stavudin tízszeres hígítási sorával végzett előkísérlet során azt tapasztaltuk, hogy ribavirin esetén  $10^2$  hígítás már egyáltalán nem tudta gátolni a vírusszaporodást. Cidofovir és stavudin esetében azonban  $10^1$  hígításban már látványosan kevesebb fertőzött sejtet láttunk, de még nem volt teljes a gátlás. Az

eredmények függvényében arra a következtetésre jutottunk, hogy a továbbiakban ribavirin esetén  $10^1$  és  $10^2$ , a másik két antivirális szer esetén pedig tömény és  $10^2$  közötti hígításokra szűkítjük a vizsgálati tartományt. A három vizsgált gyógyszer 2-es léptékű hígítási sorával 1,5 óráig előkezelt sejtek FeAdV-vel történő fertőzése során 50%-os gátló koncentrációt ( $IC_{50}$ , inhibitor concentratinon) tapasztaltunk a ribavirin 20x-os (0,625 mg/ml), a cidofovir 4x-es (0,625 mg/ml) és a stavudin 8x-os (0,3125 mg/ml) hígítása esetén. Abban az esetben, ha a FeAdV fertőzést követően 2 órával kezeltük a sejteket az egyes gyógyszerhígításokkal, ugyanezeket az eredményeket kaptuk. Ha a FeAdV-vel 24 órán keresztül inkubáltuk a sejteket és csak másnap adtuk hozzájuk az antivirális szereket, azt tapasztaltuk, hogy a ribavirin esetén már nem volt elég a 10x-es hígítás a gátláshoz, így a vizsgálati tartományunkat tovább szűkítve kiderült, hogy a 2x-es (25 mg/ml) képes 50%-ban gátolni a FeAdV-t. Fertőzés után 24 órával a másik két szer is kisebb mértékben bizonyult hatásosnak, a cidofovir 2x-es (1,25 mg/ml), a stavudin 4x-es (0,625 mg/ml) hígítása tudott csak 50%-os vírusgátló hatást kifejteni (3. táblázat).

**3. táblázat.** Macska adenovírus (FeAdV) fertőzőképességét befolyásoló antivirális gyógyszerek  $IC_{50}$  értéke a vizsgálat során alkalmazott elő-, valamint 2 és 24 órás utókezelések során.

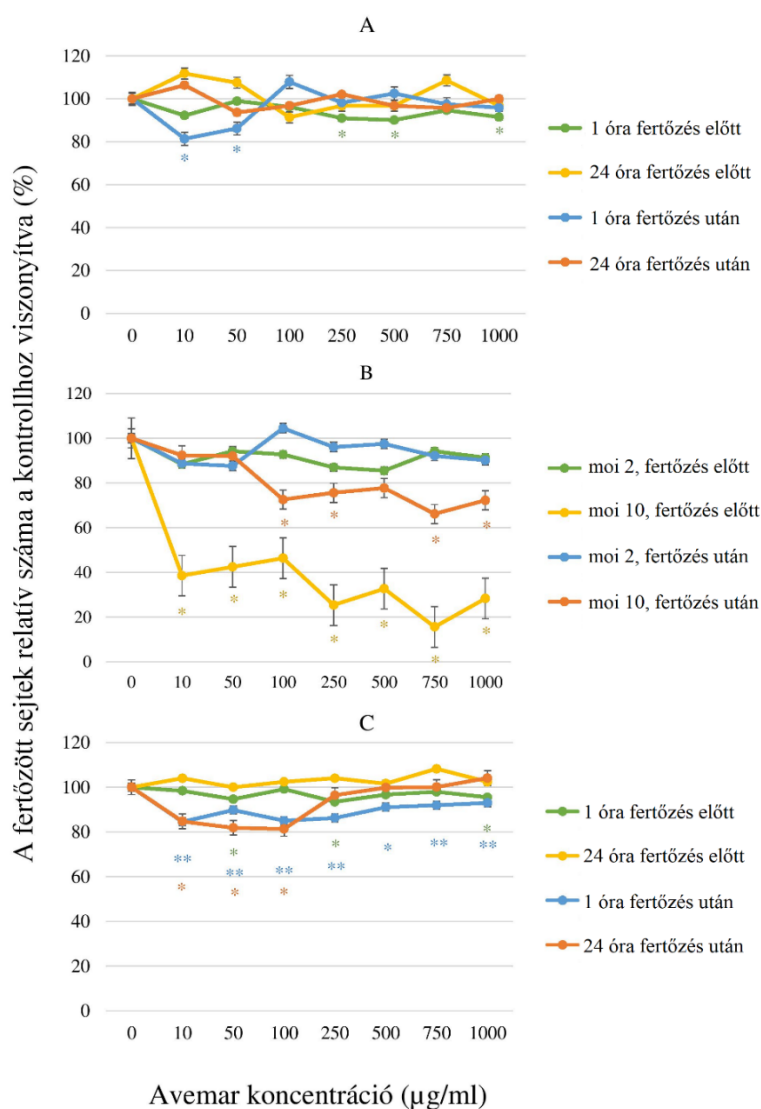
	Sejtek előkezelése	Fertőzött sejtek kezelése	
		2 óra után	24 óra után
<b>Ribavirin</b>	0,625 mg/ml	0,625 mg/ml	25 mg/ml
<b>Cidofovir</b>	0,625 mg/ml	0,625 mg/ml	1,25 mg/ml
<b>Stavudin</b>	0,3125 mg/ml	0,3125 mg/ml	0,625 mg/ml

#### 4. 3. 3. Avemar antivirális hatásainak vizsgálata

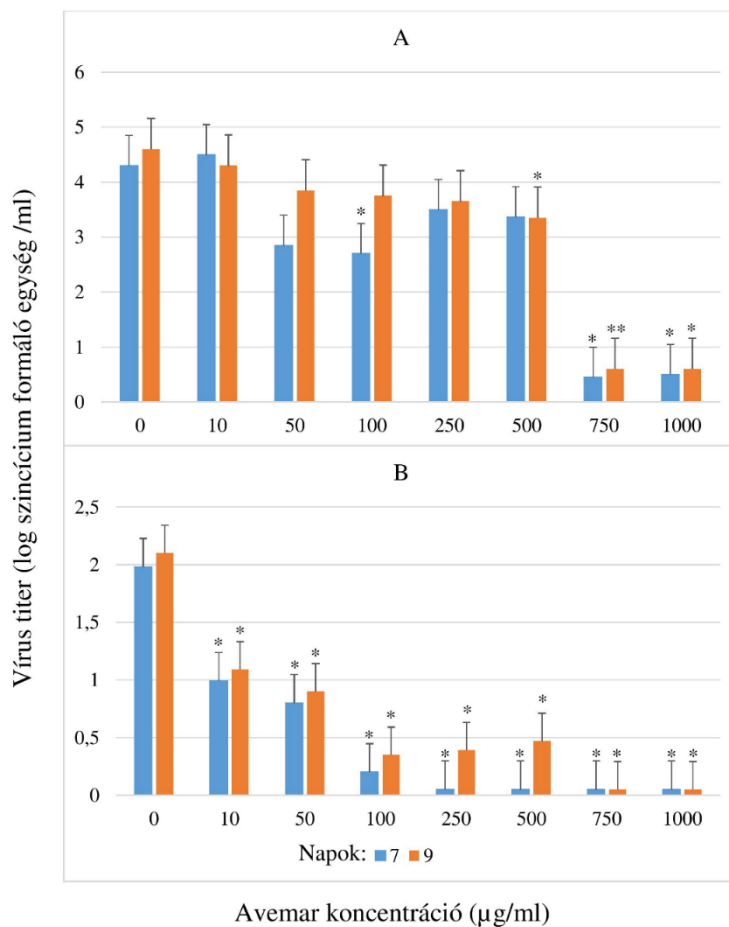
##### 4. 3. 3. 1. Az Avemar pulvis hatása a FeAdV replikációra HeLa és CrFK sejtekben

Általánosságban elmondható, hogy Avemar kezelés nélkül a FeAdV fertőzés után 3-5 napon belül mindkét sejtvonal esetében csomókba rendeződött, lekerekedett sejteket figyeltünk meg fénymikroszkóppal, a sejtek leváltak a szövettényesztő edény faláról. Az immunhisztokémiai vizsgálatok azt mutatták, hogy abban az esetben, ha a sejteket előkezeltük Avemarral, a citopátiás hatás dózistól és behatási időtől függően csak később

alakult ki. CrFK sejteken kis mennyiségű (moi 1 és moi 2) vírusfertőzés esetén sem az Avemar elő-, sem pedig az utókezelések nem eredményeztek jelentős különbséget a FeAdV hexon antigén termelésében sem 1, sem 24 óra után (9. ábra, A és B). Nagyobb (moi 10) vírusedményekkel történő fertőzés során azonban a fertőzött sejtek száma az alkalmazott Avemar koncentrációtól függően az elő és utókezelések során is csökkenő tendenciát mutatott. A dózisfüggő gátlás jelentősebb volt, amikor a sejteket Avemar előkezelésnek tettük ki a FeAdV fertőzés előtt 24 órával. Ebben az esetben a kontrollhoz viszonyítva már 10 µg/ml töménységű fermentál búzacsíra kivonat is 60%-kal csökkentette a fertőzött sejtek számát, 1000 µg/ml-es Avemar koncentráció alkalmazásakor pedig több mint 70%-os gátlást tapasztaltunk (9. ábra, B). Moi 10 arányú fertőzés esetén az utókezelés során is csökkent a fertőzött sejtek száma, bár kisebb arányban, mint amit az előkezelésnél láttunk. Eredményeink azt mutatták, hogy az utókezelés csak közel 30%-os csökkenést idéz elő (9. ábra, B). A változás mindkét esetben szignifikáns ( $p < 0.05$ ) volt. Titrálási eredményeink szintén azt mutatták, hogy az Avemar előkezelés dózisfüggő módon gátolta a FeAdV szaporodását CrFK sejteken nagyobb (moi 1) és kisebb (moi 0,1) bemeneti vírus esetén is (10. ábra). Moi 1-gyel történő fertőzés során a legnagyobb vírustiter csökkenést 750 és 1000 µg/ml-es Avemar koncentrációknál tapasztaltuk, 10-500 µg/ml-es töménységű szer alkalmazása esetén kisebb mértékű volt a gátlás a titrálás 7. és 9. napján egyaránt (10. ábra, A). Abban az esetben, ha kisebb mennyiségű (moi 0,1) vírussal fertőztük az Avemarral előkezelt CrFK sejteket, már 10 µg/ml-es koncentrációnál kb. 50%-os titercsökkenést tapasztaltunk a kezeletlen sejtekhez képest, 100-1000 µg/ml esetén pedig tovább csökkent a FeAdV replikációja (10. ábra, B). A kísérletet HeLa sejteken is megismételtük, de immunhisztokémiai eredményeink alapján sem az elő-, sem pedig az utókezelés nem befolyásolta jelentősen a FeAdV hexon antigéntermelődést moi 1 fertőzés esetén, a gátlás 20% alatti volt (9. ábra, C).



**9. ábra.** Avemar hatásának vizsgálata Crandell-Rees macska vese (CrFK) és HeLa sejteken. A: a különböző koncentrációban alkalmazott Avemar hatása a fertőzést megelőző és fertőzést követő 1 és 24 órával elteltével CrFK sejteken, moi 1. B: moi 2 és moi 10 egységgel fertőzött CrFK sejteken az különböző koncentrációjú Avemar hatása fertőzés előtt és után. C: A különböző koncentrációban alkalmazott Avemar hatása a fertőzést megelőző és fertőzést követő 1 és 24 órával elteltével HeLa sejteken, moi 1. n=3. \*p<0,05; \*\*p<0,001 (99).

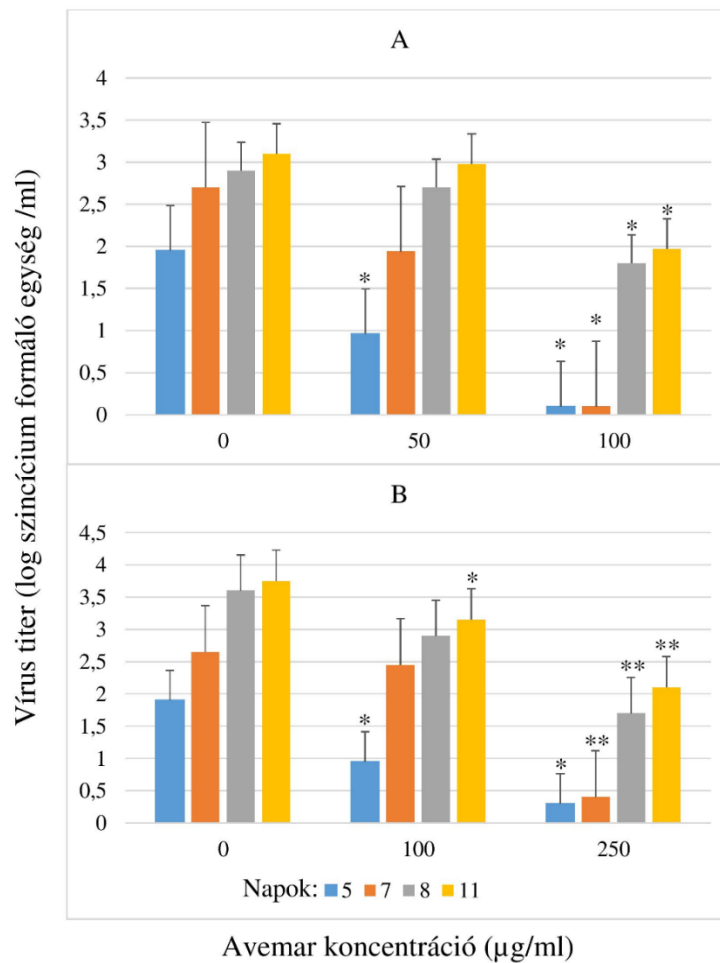


**10. ábra.** Reziduális macska adenovírus (FeAdV) mennyiségi meghatározása Avemarral előkezelt Crandell-Rees macska vese (CrFK) sejtek felülúszójában. A fertőzésre használt FeAdV mennyisége a következő volt: A: moi 1, B: moi 0,1. A mintákat a fertőzést követő 3. napon vettük, a titrálás eredményeit a 7. és 9. napon olvastuk le. n=3. \*p<0,05; \*\*p<0,001 (99).

#### 4. 3. 3. 2. Avemar és FIV fertőzés együttes vizsgálata macska eredetű sejteken

Avemarral történő előkezelés hatására lényegesen lecsökkent a FIV vírus replikációja MBM sejtekben. Az alkalmazott koncentrációtól függően mindkét vizsgált vírus esetén 3-5 log titercsökkenés is megfigyelhető volt, az idő elteltével pedig, ahogy az MBM sejtek fokozatosan pusztultak, a felülúszók vírustartalma növekedett. A FIV-M2 és a FIV-Pet vírus replikációjában minimális különbségeket tudtunk megfigyelni (11. ábra)

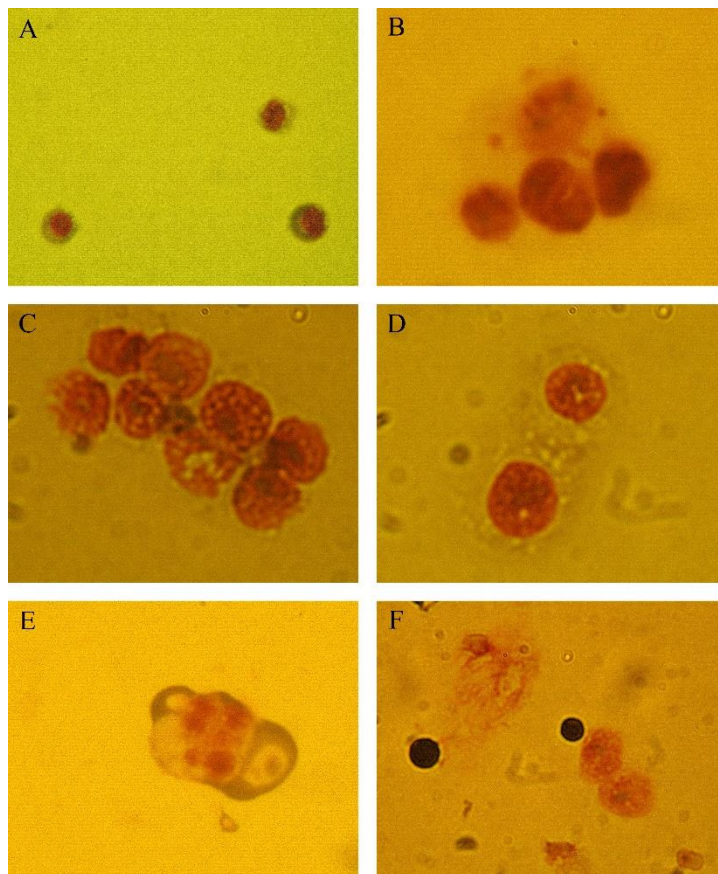




**11. ábra.** Reziduális macska immundeficiencia vírus (FIV) fertőzőképességének meghatározása Avemarral előkezelt MBM sejtekben. A: FIV Pisa-M2 (FIV-M2) fertőzés; B: FIV-Petaluma (FIV-Pet) fertőzés. A felülúszókat az 5., 7., 8. és 11. napon gyűjtöttük be és CrFK sejteken titráltuk. n=3. \*p<0,05; \*\*p<0,001 (99).

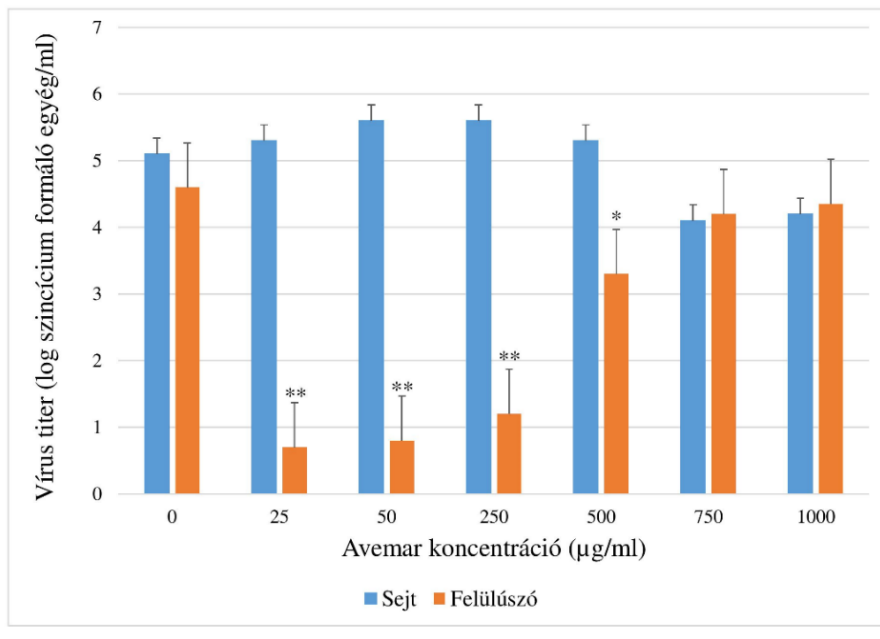
Az Avemar kezelés dózis- és időfüggő módon befolyásolta az FL-4 sejtek életképességét és morfológiáját (12. ábra). A vizsgálat kezdetén szabályos limfocita morfológiát láttunk (12. ábra, A). 25-1000 µg/ml töménységű Avemar hatására a kezelés korai stádiumában a sejtmagok megnagyobbodtak (12. ábra, B). Ezt követően a plazmában apoptotikus granulomok jelentek meg, majd citoplazma összeolvadást tapasztaltunk (12. ábra, C és D). A kezelés 9. napja után sokmagvú óriássejtek képződtek (12. ábra, E) és a 10. naptól a sejtmembrán felhólyagosodott, a sejtek elkezdtek

zsugorodni. Miután a sejtmagok szétestek, már csak a fehérjeszálakból álló sejtvázat láttuk a tápfolyadékban (12. ábra, F).



**12. ábra.** Avemar hatása a macska immundeficiencia vírus-Petaluma (FIV-Pet) vírustörzset krónikusan termelő FL-4 sejtek morfológiájára. A: szabályos limfocita morfológia, B: megnagyobbodott sejtmagok, C: apoptotikus granulumok megjelenése, D: citoplama összeolvadás, E: szincícium képződés, F: sejtzsugorodás és fehérjeszálakból álló váz. Eredeti nagyítás: 200x.

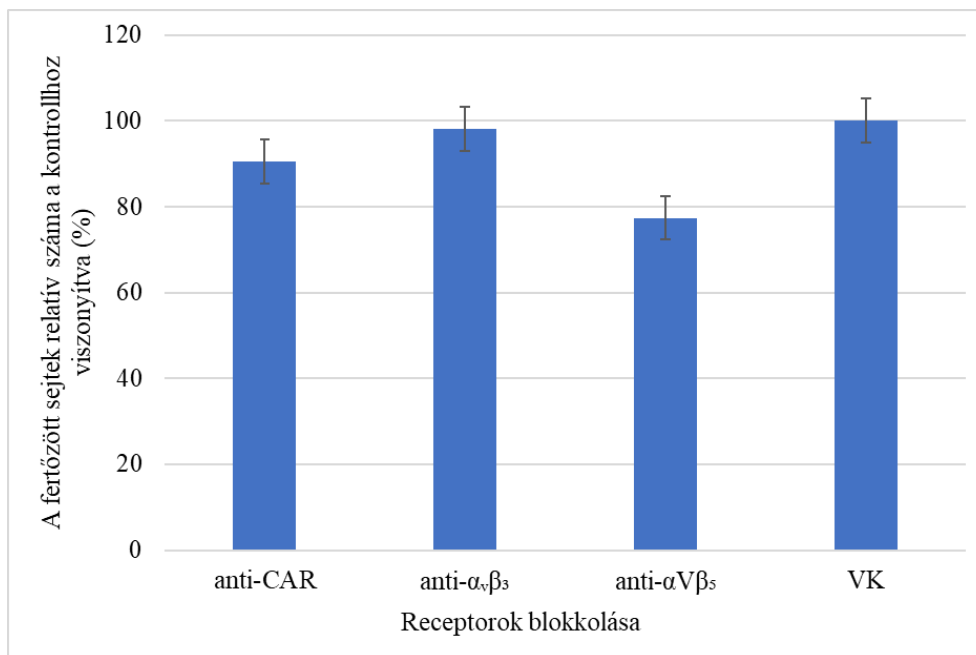
Titrlási eredményeink azt mutatták, hogy a hígabb, 25-250  $\mu\text{g/ml}$ -es Avemarral kezelt felülúszók kis mennyiségű vírust tartalmaztak. Ezzel szemben a nagyobb koncentrációjú, 500-1000  $\mu\text{g/ml}$ -es fermentált búzacsírákivonat csak kismértékben befolyásolta az FL-4 sejtek vírustartalmát. 25-250  $\mu\text{g/ml}$  közötti Avemar hígítások nem befolyásolták szignifikánsan a FIV-Pet tartalmat a sejtízátumok esetén, míg 500-1000  $\mu\text{g/ml}$ -es töménységnél tapasztaltunk víruscsökkenést (13. ábra).



**13. ábra.** A reziduális macska immundeficiencia vírus-Petaluma (FIV-Pet) fertőzőképességének mennyiségi meghatározása Avemar kezelt FL-4 sejt kultúrán. A felülúsó és a roncsolt sejt minták a kezelést követő 4. napon lettek begyűjtve. n=3. \*p<0,05; \*\*p<0,001 (99).

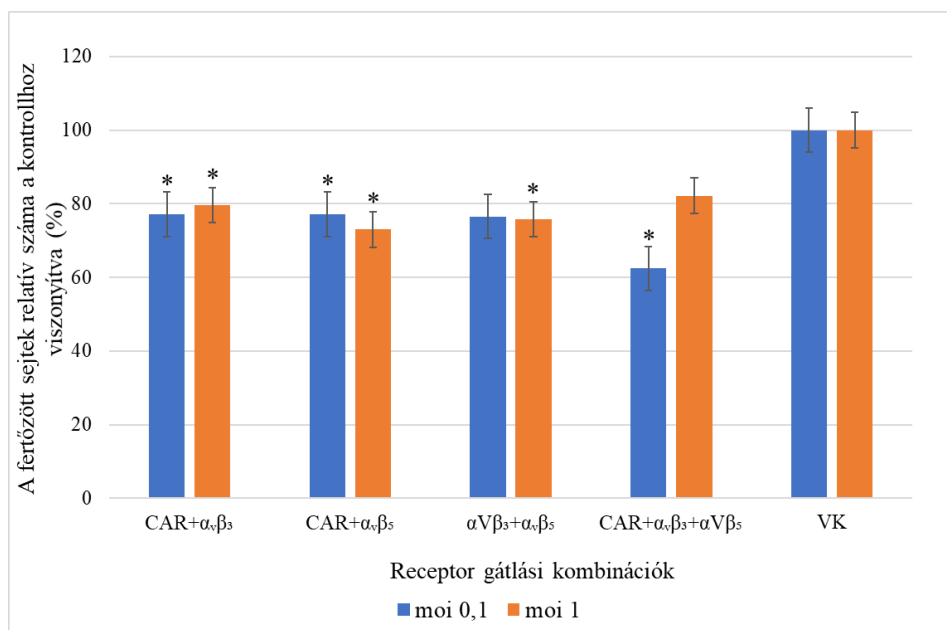
#### 4.4. Gazdasejt receptorainak és koreceptorainak gátlása

A HeLa sejteken végzett, egyes antitesteket külön-külön vizsgáló kísérlet során azt láttuk, hogy ha nem is túl nagy mértékben, de mindegyik receptor gátlása hatással volt a vírusszaporodásra. A víruskontrollhoz képest a legnagyobb eltérést (közel 23%-os csökkenést) az  $\alpha\beta_5$  koreceptor blokkolása során tapasztaltuk. Az AdV-ok szaporodásához szükséges elsődleges belépési kapu, a CAR, valamint a másik fontos integrinreceptor, az  $\alpha\beta_3$  ellenanyagokkal történő blokkolása csak kismértékű, CAR esetén közel 10%-os,  $\alpha\beta_3$ -nál pedig csak közel 2%-os változást okozott a FeAdV szaporodásában (14. ábra).



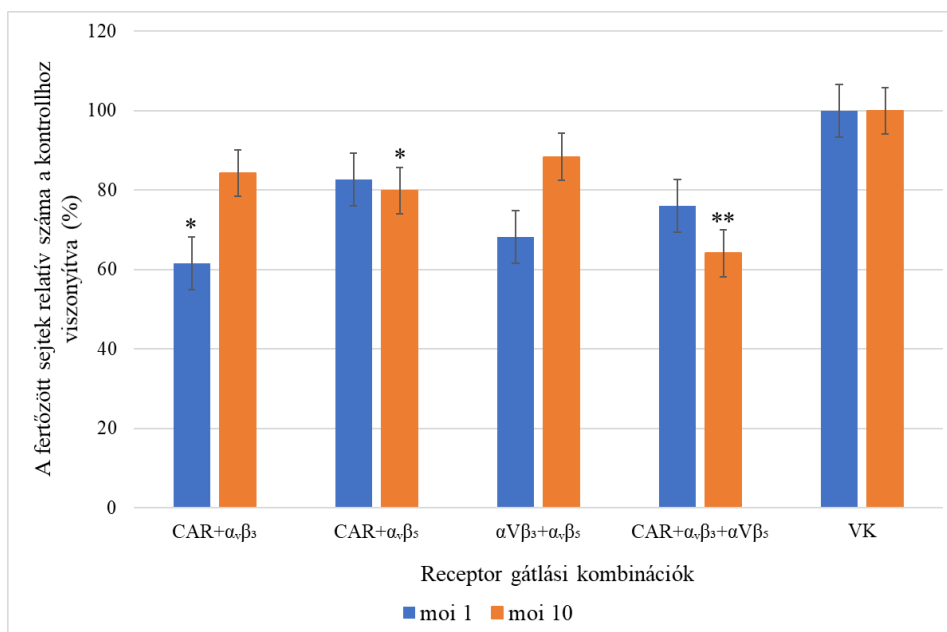
**14. ábra.** Anti-Coxsackie-adenovírus receptor (CAR), anti- $\alpha_v\beta_3$  és anti- $\alpha V\beta_5$  antitestek hatása a fertőzött sejtek relatív számára, 1 moi macska adenovírus (FeAdV) inokulummal fertőzött HeLa sejteken. VK= víruskontroll. n=3. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ .

A következő kísérleteinkben a receptorokat különböző kombinációban gátoltuk, majd a HeLa, CrFK és HEK-293 sejteket egy kisebb (0,1) és egy nagyobb moi (1 vagy 10) értékkel is fertőztük. HeLa sejteknél CAR és a koreceptorok együttes blokkolása esetén moi 0,1 arányú FeAdV-vel történő fertőzés során majdnem 40%-kal csökkent azon sejtek száma, amelyekben immunhisztokémiával AdV hexon antigént tudtunk kimutatni. Abban az esetben, ha a CAR mellett az  $\alpha_v\beta_3$  vagy az  $\alpha V\beta_5$  integrinek is gátlás alá kerültek, illetve, ha csak a koreceptorokat blokkoltuk, szinte teljesen azonos eredményt kaptunk, mindegyik esetben kb. 23%-kal kevesebb sejt fertőződött meg, mint a kontrollnál. Moi 1 arányú fertőzésnél az eredményeink kissé eltérők voltak. Kiugró változást egyik gátlási kombinációnál sem tapasztaltunk, a fertőzött sejtek számának csökkenése 18-27% között volt (15. ábra).



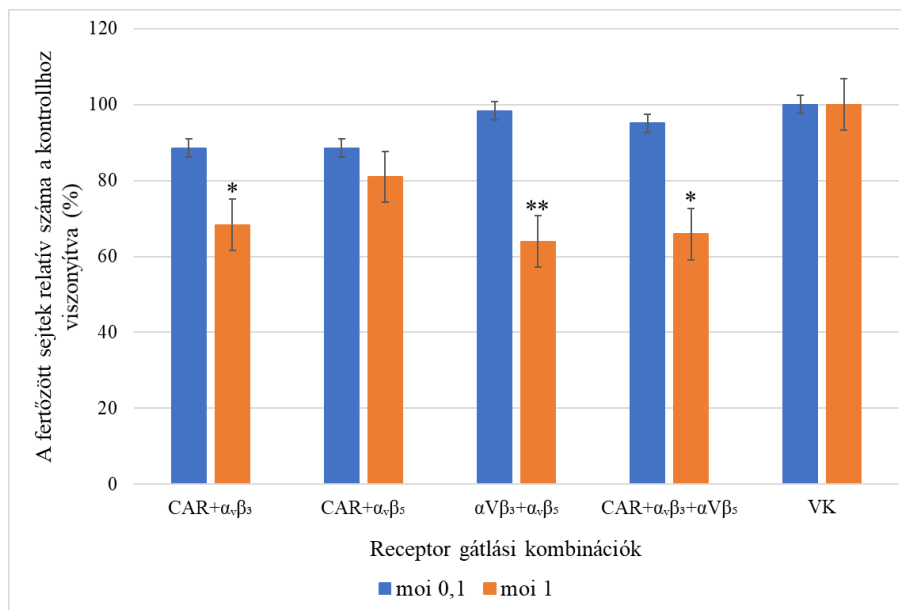
**15. ábra.** Különböző kombinációkban alkalmazott anti- Coxsackie-adenovírus receptor (CAR), anti- $\alpha_v\beta_3$  és anti- $\alpha_v\beta_5$  antitestek hatása a fertőzött sejtek relatív számára, 0,1 és 1 moi macska adenovírus (FeAdV) inokulummal fertőzött HeLa sejteken. VK= víruskontroll. n=3. \*p<0,05; \*\*p<0,001.

CrFK sejtek moi 1-gyel történő fertőzése során a CAR és az  $\alpha_v\beta_3$  gátlása esetén tapasztaltuk a legnagyobb mértékű, közel 40%-os szignifikáns csökkenést fertőzött sejtek számában. Az  $\alpha_v\beta_3$  és  $\alpha_v\beta_5$  integrin receptorok együttes blokkolása során 32%-kal kevesebb vírus volt képes belépni a sejtbe, a CAR és az  $\alpha_v\beta_5$  gátlása pedig 17%-os változást eredményezett a FeAdV szaporodóképességében. A három vizsgált receptor együttes kezelése szintén jelentős változást mutatott. A sejteket nagyobb arányú (moi 10) vírusnak kitéve a CAR,  $\alpha_v\beta_3$  és  $\alpha_v\beta_5$  receptorok egyidőben történő gátlása volt a legnagyobb hatással a fertőzött sejtek számára, de a másik három variáció mindegyike akadályozta valamennyire a vírus sejtbejutását, közel hasonló mértékben (12-20%-ban) (16. ábra).



**16. ábra.** Különböző kombinációkban alkalmazott anti- Coxsackie-adenovírus receptor (CAR), anti- $\alpha_v\beta_3$  és anti- $\alpha_v\beta_5$  antitestek hatása a fertőzött sejtek relatív számára, 1 és 10 moi macska adenovírus (FeAdV) inokulummal fertőzött Crandell-Rees macska vese eredetű (CrFK) sejteken. VK= víruskontroll. n=3. \*p<0,05; \*\*p<0,001.

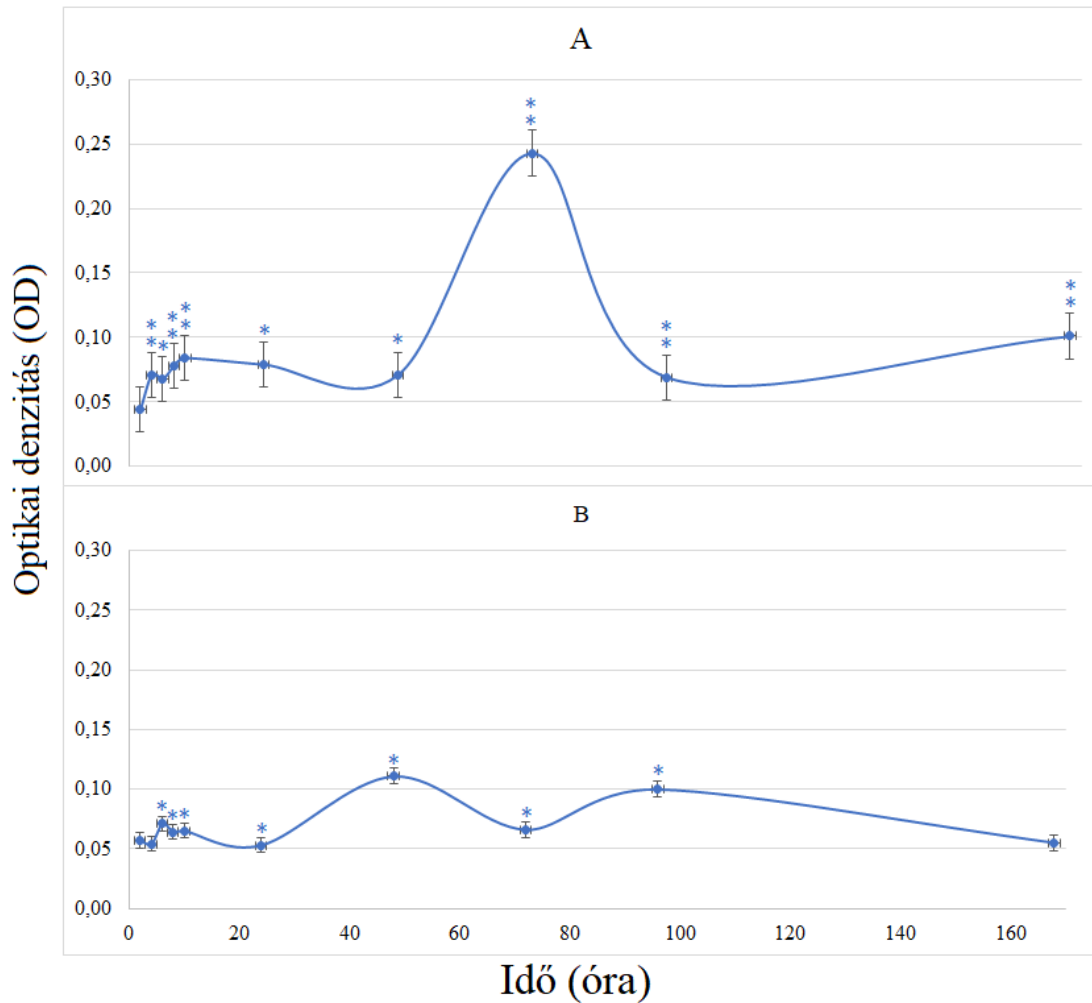
Kis mennyiségű (moi 0,1) FeAdV inokulummal fertőzött HEK-293 sejtekben 11,5%-os csökkenés volt a legnagyobb, amelyet a CAR és  $\alpha_v\beta_3$  vagy  $\alpha_v\beta_5$  receptorok együttes gátlása révén értünk el. A másik két esetben, ha csak az koreceptorokat, vagy mindhárom belépési kaput egyszerre blokkoltuk, nem tapasztaltunk érdembeli változást. Nagyobb mennyiségű (moi 1) vírusfertőzés estében azonban látványosan kevesebb fertőzött sejtet tudtunk kimutatni. Több mint 34%-kal kevesebb FeAdV volt képes belépni a sejtekbe abban az esetben, ha mindhárom receptort együttesen, vagy amikor csak az integrin receptorokat gátoltuk. A sejtek anti-CAR és anti- $\alpha_v\beta_3$  ellenanyagokkal történő kezelése során szintén nagymértékben, közel 32%-kal csökkent a fertőződés, míg anti-CAR és anti- $\alpha_v\beta_5$  antitestek alkalmazásakor a vírusok csak kevesebb, mint 20%-ának a sejtbe jutása korlátozódott (17. ábra).



**17. ábra.** Különböző kombinációkban alkalmazott anti- Cocksackie-adenovírus receptor (CAR), anti- $\alpha v\beta_3$  és anti- $\alpha v\beta_3$  antitestek hatása a fertőzött sejtek relatív számára, 0,1 és 1 moi macska adenovírus (FeAdV) inokulással fertőzött Humán embrionális vesesejteken (HEK-293). VK= víruskontroll. n=3. \*p<0,05; \*\*p<0,001.

#### 4. 5. FeAdV fertőzött HeLa sejtek citokin termelésének vizsgálata

A tanulmányozott citokinek termelése a vizsgálati időtartományon belül ingadozást mutatott fertőzött és fertőzetlen sejtek esetében is. Az IL-10 változásának nyomon követése során azt tapasztaltuk, hogy az első 24 órában nem következett be jelentős változás sem a kontroll sejtek esetén (18. ábra, A), sem pedig FeAdV hatására (18. ábra, B). A vírusfertőzött sejtek esetén a legmagasabb IL-10 értéket 48 óra után mértünk, ebben az időpontban volt a legmagasabb az IL-10 mennyisége (18. ábra, A), míg a fertőzetlen sejtek esetén a csúcsmaximumot a 72 órás mérésnél tapasztaltuk, mennyisége ráadásul a fertőzött sejtekben kapott 72 órás érték közel duplája volt. 72 óra után a sejtek interleukin termelésében érdemi változást már nem tapasztaltunk (18. ábra, B).

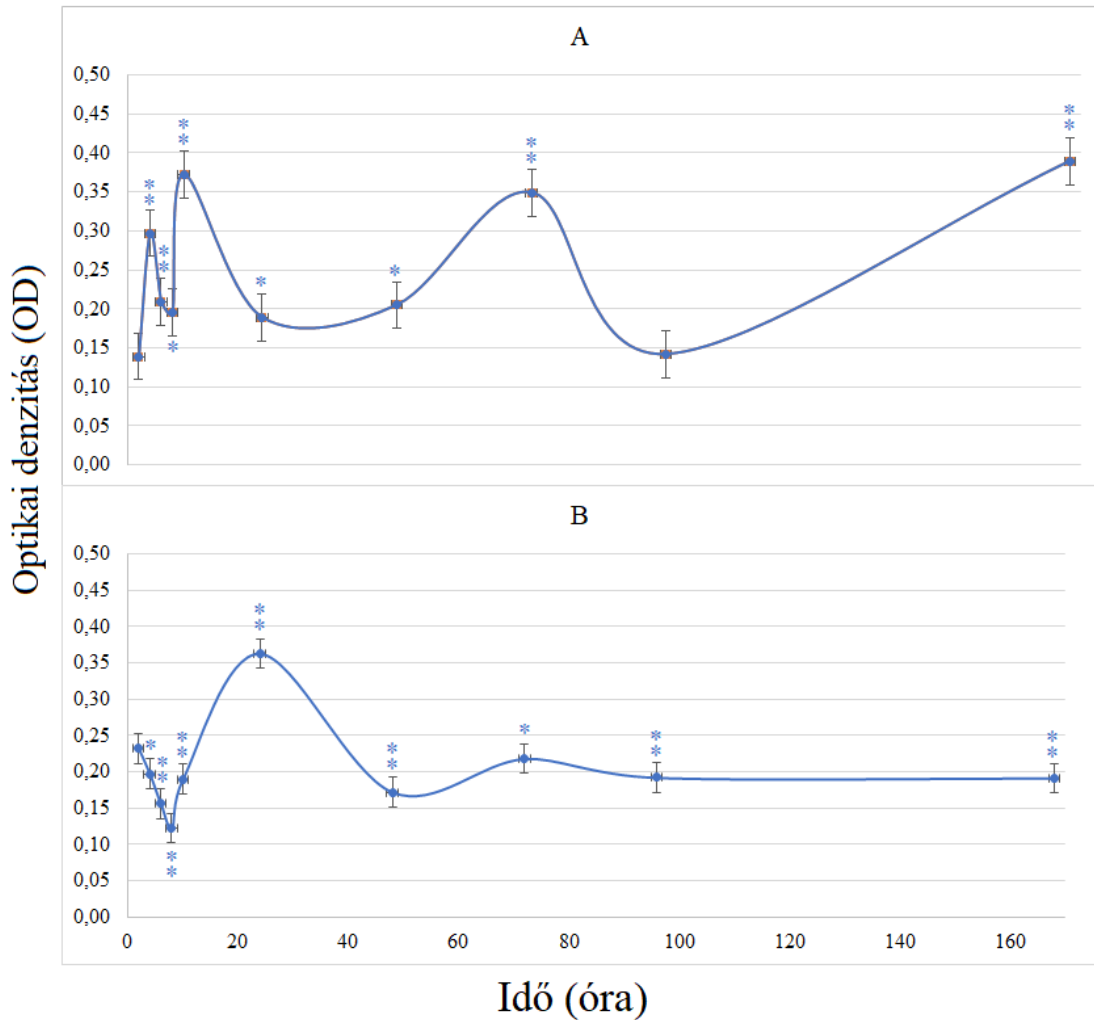


**18. ábra.** Interleukin-10 (IL-10) termelődésének változása normál és macska adenovírussal (FeAdV) fertőzött HeLa sejtekben. A: FeAdV-vel nem fertőzött HeLa sejtek. B: vírussal fertőzött HeLa sejtek. n=3. \*p<0,05; \*\*p<0,001.

A nem fertőzött HeLa sejtek TGF- $\beta$ 1 termelése az első 10 órában intenzívebb ingadozást mutatott az IL-10 termeléshez képest. 24 és 48 óra között stagnáló citokinmennyiséget, majd 72 órával a kísérlet kezdete után egy relatíve nagy, közel 50%-os ugrást, majd csökkenést tapasztaltunk. A legmagasabb TGF- $\beta$ 1 értéket a 168 órás mintavétel esetén mértük (19. ábra, A). A vírussal fertőzött sejtek esetén a TGF- $\beta$ 1 termelés az első néhány órában jelentős csökkenésnek indult, majd 8 óra után növekedni kezdett és 24 óra elteltével érte el maximumát. Ezután újabb csökkenést tapasztaltunk, 48 óra után pedig már nem volt lényeges különbség a mért mennyiségek között (19. ábra, B). FeAdV fertőzés hatására tehát mindkét vizsgált citokin termelődésének maximuma



korábban következnek be, nagyobb mennyiségben, mint a nem fertőzött sejtek esetén. Ezek az eredmények a FeAdV immunmoduláló hatására utalnak.



**19. ábra.** Transzformáló növekedési faktor béta-1 (TGF- $\beta$ 1) termelődésének változása normál és macska adenovírussal (FeAdV) fertőzött HeLa sejtekben. A: FeAdV-vel nem fertőzött HeLa sejtek. B: vírussal fertőzött HeLa sejtek. n=3. \*p<0,05; \*\*p<0,001.

## 5. Megbeszélés

Mivel jelenleg nincs célzottan FeAdV vizsgálatára alkalmas sejttenyészet, reagens, vagy egyéb diagnosztikai eszköz, kísérleteinkben a humán AdV fertőzések azonosítására kifejlesztett kiteket használtunk. A legtöbb esetben HeLa sejteket, illetve egyes vizsgálatokban CrFK és HEK-293 sejt vonalakat használtunk, mert ezek nagyfokú érzékenységet mutatnak HAdV-ok iránt, főleg azért, mert a vírus számára szükséges elsődleges CAR, valamint a koreceptoroként funkcionáló  $\alpha_V\beta_3$  és  $\alpha_V\beta_5$  integrinek egyaránt expresszálódnak a felszínükön (7, 21). A FeAdV fertőzőképességét hexon gén kimutatásán alapuló immunhisztokémiai módszerrel ellenőriztük, amely 41 különböző HAdV típust tud hatékonyan kimutatni. A FeAdV fertőzés hatására bekövetkező citokin változások nyomon követése során alkalmazott ELISA módszerben szintén humán antitesteket használtunk.

A GenBank adatbázisában elérhető HAdV-C tagjainak teljes genom analízise megerősítette, hogy ezen csoport tagjai rekombinációra hajlamosak, valamint két „hot-spot” szakaszt is azonosítottak a hexon és a fiber régióiban, így az általunk tapasztalt nukleotid eltérések a vizsgált szekvenciákban valószínűsíthetően szintén mutációk vagy rekombinációk eredményei. Mivel a HAdV-C rekombinációs típusok a jövőben potenciális egészségügyi kockázatot jelenthetnek, érdemes őket folyamatosan monitorozni (162). Ahogy a hexon és a fiber szekvenciák összehasonlítása során láttuk, a hexon génben történő nukleotid különbségek nem eredményeztek változást az aminosav szekvenciában, így feltételezhetően a fehérje funkciójában sem következett be módosulás. A FeAdV széles szövettropizmusát valószínűleg a fiber knob doménjében tapasztalt aminosav változások eredményezhetik, mivel ez a régió felelős elsősorban a CAR molekulához való kötődésért (7, 144). A négy nukleotid okozta aminosav csere érintette a fiber gén AB, CD, DE, és GH hurokait. Ezek közül az AB hurokban történt változásnak van kiemelkedő funkcionális jelentősége, hiszen a többi hurokban található meghatározott aminosav maradékok mellett ez a konzervált szakasz az elsődleges meghatározója az AdV-ok CAR specificitásának (13).

Az izolátum filogenetikai és génösszehasonlítás eredményei arra engednek következtetni, hogy a vírus fiber molekulájának rugalmassága, állati eredete, de szoros rokonsága a HAdV-1-gyel alkalmassá teszi expressziós vektorként történő felhasználásra. Az AdV-vektorok hátránya, hogy heves immunválaszt váltanak ki, ez

azonban elkerülhető, ha állati eredetű, pl. FeAdV-alapú vektorokat alkalmaznak (163). A vektorkészítéshez meg kell határozni egy vírus alapvető genetikai és biológiai tulajdonságait, kutatásaink tehát ebből a szempontból is nélkülözhetetlen információkkal bírnak.

A FeAdV fizikai vizsgálataival feltérképeztük, hogy a vírus milyen körülmények között fertőzőképes, amely fontos adatokat szolgáltat a potenciálisan szennyezett felületek, eszközök fertőtlenítéséhez, ezáltal elkerülhetővé válhatnak többek között a nosocomiális járványok, valamint megelőzhető a keresztkontamináció és a személyzet expozíciója az adenovírus-alapú vektorok gyártásával foglalkozó létesítményekben (164). A FeAdV fizikai ellenállóképességéről szóló adatok ezenkívül információt nyújthatnak arról is, hogy a vírus milyen körülmények között képes szaporodni a szervezetben belül. Az egyes vizsgálatokban kapott eredményeinket összehasonlítottuk a szakirodalomban található egyéb humán HAdV-ok tulajdonságaival.

A macska izolátum hőérzékenységre irányuló kísérleteink azt mutatták, hogy az 56°C-os hőhatás nagyon gyorsan, már 3 perc alatt elpusztította a FeAdV-t. Eredményeink korrelálnak egyéb hőhatásnak kitett HAdV-okkal történő vizsgálatokkal, amelyekben szintén nagyon hamar, több esetben 10 perc alatt elvesztették szaporodóképességüket. Az egyes HAdV-ok termikus stabilitás típusonként eltérő. HAdV-12-es, -14-es, és -18-as típusai 56°C-nak kitéve már 8 perc alatt elvesztik a fertőzőképességük 99%-át, míg az HAdV-6-os típus ugyanilyen körülmények között 10-15 percig marad stabil (165, 166). A természetben előforduló 7-es típusú adenovírus hőmérséklet érzékeny mutánsa 99%-ban inaktiválódik 9 perc alatt 50 °C-on, szemben a vad típusú HAdV-7-tel, amelynek inaktiválásához ezen a hőmérsékleten 26 percre van szükség (167). 5-ös típusú HAdV-t szintén 50°C-nak kitéve 10 perc után már nem lehetett a vírus jelenlétére utaló jeleket találni PCR-alapú aktivitási vizsgálattal (164). Abban az esetben, ha az HAdV-5 típust 56°C-nak tették ki, 5 perc után már egyáltalán nem találtak fertőzőképesre utaló jeleket szerológiai és elektronmikroszkópos vizsgálatokkal (168). AdV-1, -2, -3 és -4-es típusokat 50°C-os hőhatásnak kitéve az AdV-4 kivételével a másik három vírus 10 perc alatt elvesztette a fertőzőképessége 99,9%-át, azonban ugyanehhez az eredményhez 56°C-on már 2,5 perc is elegendő volt, 5 perc után pedig már nem volt kimutatható fertőző ágens (169). A termikus inaktiválás általánosan elfogadott módszer az HAdV-ok fertőzőképességének csökkentésére. 56°C-on és ennél magasabb hőmérsékleten a

kapszidfehérjék termikus denaturalizáción esnek át, amelynek következtében a hőérzékeny pentonbázisok szétesnek, az ezekből kiálló fiber és az ezeket körülvevő hexonmolekulák pedig felszabadulnak (164, 168, 170). A FeAdV hőérzékenysége a HAdV-1, -2, -3, -4-es típusokhoz áll a legközelebb, hiszen már 3 perc alatt elveszíti fertőzőképességét. A többi vizsgált HAdV típusnál pedig sokkal érzékenyebb a hővel való kezelésre. Elképzelhető, hogy a fiber szekvenciában található nukleotid eltérések flexibilisebbé teszik a molekulát a többi HAdV-hoz képest, így az hő hatására könnyebben leválik a nukleokapszidról, a vírus ezáltal nem lesz képes a gazdasejt receptoraihoz kötődni, tehát nem alakul ki fertőzés. Ezek az eredmények továbbá szintén azt sugallják, hogy a FeAdV és a HAdV-1-es típusa nagyon közeli rokonságban állnak egymással.

Az HAdV-ok nagyon ellenállóak a klasszikus, alacsony nyomású UV technológiának, ezért a szakirodalom számos különböző teljesítményű eszköz HAdV-ra való hatására kitér. A sugárzás gátló tulajdonságát elsősorban az ivóvízbiztonsággal összefüggésben vizsgálták, így többnyire az ott előforduló típusokról állnak rendelkezésre adatok. Gerba és munkatársai (2002) azt találták, hogy a 2-es típusú adenovírus 90%-os inaktiválásához  $40 \text{ mW/cm}^2$ , míg a 99,99%-os gátláshoz  $160 \text{ mW/cm}^2$ -es UV-sugárzás szükséges. Ezek az eredmények azt mutatták, hogy a 2-es típus jobban ellenáll az UV-sugárzásnak, mint a 40-es, 41-es típus (171). Amikor a 2-es típust molekuláris szinten vizsgálták anélkül, hogy a sejtenyészetbe vitték volna, körülbelül  $80 \text{ mJ/cm}^2$  alacsony nyomású UV és  $50 \text{ mJ/cm}^2$  közepes nyomású UV dózisokra volt szükség a vírus szinte teljes inaktiválásához. Ez alapján az HAdV-2-es típus érzékenyebb az alacsony nyomású UV-re, ami ellentétben más vizsgálatokkal, de ez feltehetően elsősorban a kísérletek eltérő kialakításával magyarázható (172). Baxter és munkatársai (2007) azonban a fent említett adatok ellenkezőjét tapasztalták, nevezetesen, hogy a 41-es típus jobban ellenáll a  $70 \text{ mJ/cm}^2$  UV-dózisnak, mint az HAdV-2-es és HAdV-5-ös típus (173). Egyes eredmények arra utalnak, hogy az HAdV-ok nagymértékű ellenállóképessége miatt az UV-fertőtlenítés hatékonyabb, ha klórral kombinálják.  $20 \text{ mJ/cm}^2$  alacsony nyomású, vagy  $10 \text{ mJ/cm}^2$  magas nyomású UV sugárzásnak és  $0,17 \text{ mg/l}$  szabad aktív klórnak együttesen kiteve az HAdV-2-es típusát, sikerült jelentős inaktivációt elérni nagyon rövid idő (kb. 1,5 perc) alatt (174). Schijven és munkatársai (2019) azt találták, hogy a 40-es és 41-es típusok esetében a  $40 \text{ mJ/cm}^2$  vagy  $73 \text{ mJ/cm}^2$

UV-dózis klór-dioxid nélkül nem elegendő a fertőtlenítéshez (175). Az HAdV-1, -2, -6 és -40 típusokkal végzett kísérletek során 99,99%-os inaktivációt értek el 137,9 mWs/cm<sup>2</sup>, 160 mWs/cm<sup>2</sup>, 153,8 mWs/cm<sup>2</sup> és 217,1 mWs/cm<sup>2</sup> UV-dózisokkal (176). A FeAdV kísérleti körülményeihez a legjobban hasonlító kutatás esetében sejtenyészeten tesztelték a HAdV-8-as típusát, amely 10 perces UV sugárzás után teljesen elvesztette fertőzőképességét (165). Ez összhangban van a saját eredményeinkkel, ahol szintén 10 perc alatt inaktiválódott a FeAdV, így azt láthatjuk, hogy az UV besugárzással szembeni érzékenysége hasonló az egyéb HAdV típusokhoz.

Eredményeink azt mutatták, hogy a FeAdV széles pH tartományon belül (pH 3- pH 12) stabil marad, amely általánosságban jellemző az adenovírusokra (154, 166). Mivel fertőzőképesek maradnak alacsony pH értékek mellett is, ezért ellenállnak a gyomor- és epeváladéknak, ezáltal magas szinten kimutatható székletből, amely elősegíti a vírus transzmisszióját (3). Az egyes vizsgált típusokat illetően kiderült, hogy például a HAdV-12, -14 és -18 is pH 6 körül a legstabilabbak, bár a 14-es és a 18-as típusal ellentétben a 12-es típus esetén kétlépcsős inaktivációt figyeltek meg. A vizsgálati idő első 5 napjában stabilitást mutatott pH 6 körül, azonban 5 és 10 nap között egy gyors és hirtelen csökkenést tapasztaltak a vírus fertőzőképességében, az inaktiváció üteme pedig csak 10 nap után kezdett újra lassulni (166). A HAdV-5 szintén 6-os pH-n mutatta a legnagyobb stabilitást, pH 5-nél pedig nagy sebességgel inaktiválódni kezdett (177). A hőstabilitási vizsgálatok kimutatták, hogy a 2-es típus fizikai stabilitása enyhén savas (pH8-pH5) körülmények között javul (170). A szakirodalom beszámolt a kutya adenovírus-1 pH érzékenységről is. A kutya adenovírus-1 egy dupla szálú DNS vírus, amely potenciálisan alkalmas lehet az emberi adenovírusok tanulmányozására. Az adatok alapján ez a vírus gyorsabban inaktiválódott pH 9-en, mint pH 7-en (178). Ginsberg (1956) korábbi kutatásai során pedig szinte teljesen azonos pH érzékenységet tapasztalt HAdV-1, -2, -3 és -4 esetén, mint mi a FeAdV kísérleteink során, ugyanis ezek a típusok is pH 6-pH 9 között bizonyultak a legstabilabbnak, pH 2 alatti és pH 11 körül pedig már elvesztették a fertőzőképességük 99,9%-át (169). Ezen adatok is a közeli rokonsági kapcsolatra utalnak.

Az adenovírusok nagyon ellenállóak különböző vegyszerekkel szemben. Felületek 85-95%-os alkoholos oldatokkal történő kezelése esetén minimum 2 perc, nátrium-hipoklorit oldat esetén pedig legalább 10 perc, vagy 0.5 µg/ml szükséges a vírus

inaktiválásához (3, 154). A szakirodalom alapján kijelenthető, hogy a humán adenovírusokat a klór viszonylag gyorsan inaktiválja. Brazília víztisztító telepeken mintáiban a rekombináns humán adenovírus 5-ös típusát 0,2 mg/l szabad klórral 20 másodperc alatt, és 0,5 mg/l szabad klórral 7 másodperc alatt inaktiválták (179). A szabad klór a 3-as típusú adenovírust is nagyon gyorsan inaktiválja (a klórkoncentrációtól, pH-tól és hőmérséklettől függően), pl. pH 7; 25 °C és 0,08-0,12 ppm szabad klór a vízmintákban lévő vírusok 99%-át kevesebb, mint 16 másodperc alatt elpusztította (180). Az HAdV-2 vizsgálatában a vizsgált tartományok közül a legrosszabb esetben (pH 10, 1 °C) 2,6 mg Cl<sub>2</sub> min/l már inaktiválta a vírust (181). Hasonló eredményt értek el Girones és munkatársai (2014), ahol 1,65 mg min/l a vírus 99,99%-át elpusztította (182). Cromeans és munkatársai (2010) az HAdV-2-t, HAdV-40-et és HAdV-41-et az ivóvíz fertőtlenítésével kapcsolatban tanulmányozták, és azt tapasztalták, hogy a 0,2 mg/l szabad klór 5 °C-on szintén hatékonyan inaktiválja ezeket a vírusokat pH 7 és pH 8 mellett (183). Az AdV-5 és AdV-41 8,5 pH-n és 5°C-on 0,22 mg min/l klórral (173), míg az AdV-40 0,24 mg min/l klórral azonos körülmények között veszíti el a fertőzőképességét (184). Mivel a FeAdV 5 g/l (0,067 mol/l) NaClO hatására 5 perc alatt elveszítette fertőzőképességét, úgy tűnik, hogy klóros fertőtlenítő hatással szemben ellenállóbb, mint más egyéb, vizsgált adenovírus típus.

A kórházi gyakorlatban használt felületfertőtlenítő szerek vizsgálatok megállapították, hogy 65% etanol 0,63% kvaterner ammóniumvegyülettel, 79,6% etanol 0,1% kvaterner ammóniumvegyülettel és 70% etanol hatékonyan elpusztítja a HAdV-1-es és 8-as típusát minimum 1 perc alatt (185). Az 5-ös típusú adenovírust a 45-95 tömegszázalékos (m/m%) etanos oldatok 30 másodperc alatt, míg 70 m/m%-os, gél alapú etanol 2 perc alatt inaktiválta. A 2-es típusú adenovírus ellenállóbbnak bizonyult, 73,6 m/m%-os etanol és 0,2 m/m%-os perecetsav kombinációja 30 másodperc alatt képes volt inaktiválni. 55 m/m% és 85 m/m% etanol pedig 2 perc alatt fejtette ki hatását a vírust. A 7-es típus esetében a 72,5–77 m/m%-os etanol bizonyult hatásosnak 1 perc alatt, érdekes módon azonban az AdV-8-as típus ellen ez a mennyiség nem okozott inaktivációt (186). Hooton és munkatársai (2018) hasonló eredményeket találtak szemfertőzéseket okozó adenovírusok esetében. Az általuk tesztelt 70 m/m%-os etanol tartalmú alkoholos kézfertőtlenítő a 3-as, 5-ös, 19-es, 37-es típusoknál 10 másodperc alatt szignifikánsan csökkentette a vírusok titerét, a 4-es és 7-es típusoknál 2 perc kellett a

hasonló eredmény eléréséhez, azonban a 8-as típus nem mutatott hasonló titercsökkenést még 5 perc után sem (187). FeAdV-vel végzett vizsgálataink során a fent említett szakirodalmak alapján, illetve az alkalmazott fertőtlenítő javaslata alapján úgy döntöttünk, hogy 5 percen határozzuk meg a fertőtlenítőszer behatási idejét. Eredményeink azt mutatták, hogy 65 mg/l (1,412 mol/l) koncentráció ennyi idő alatt már inaktíválja az összes vírust, így elmondható, hogy a FeAdV igen érzékeny a detergenssek iránt, hiszen az átlagosan alkalmazott koncentrációknál már kevesebb is hatékonyan elpusztítja a vírust rövid idő alatt.

Az egyes HAdV típusok gyógyszerérzékenysége eltérő. Mivel ribavirinre csak a C fajba tartozó típusok érzékenyek, ezért a szakirodalomban található vizsgálatok is ezekre korlátozódtak. Sejtkultúrákon történő vizsgálat során, kvantitatív, valós idejű PCR kimutatás esetén azt tapasztalták, hogy a C fajhoz tartozó adenovírus prototípusok 99%-os inaktiválásához szükséges ribavirin koncentrációk 1-es és 5-ös típus esetén 104  $\mu\text{M}$  (0,02540 mg/ml), 2-es típusnál 111  $\mu\text{M}$  (0,02711 mg/ml). A ribavirin magasabb, 229  $\mu\text{M}$  (0,05592 mg/ml) és 155  $\mu\text{M}$  (0,03785 mg/ml) koncentrációban 99%-os gátolást tudott okozni két vizsgált klinikai izolátumban (HAdV-C1 K és HAdV-C2 J) (188). Hasonló eredményeket tapasztaltak másik kutatásban is HAdV-1, -2, -5 és -6 esetén (189). A FeAdV szaporodóképességére ezzel szemben csak 0,625 mg/ml-es elő- és 25 mg/ml-es utókezelés tudott 50%-os gátló koncentrációt kifejteni, így elmondható, hogy a macska izolátum sokkal jobban ellenáll a ribavirinnek.

A cidofovir adenovírus aktivitásra vonatkozó  $\text{EC}_{50}$ -értéke általában 4,6 és 17  $\mu\text{g/ml}$  között van (190). A HAdV-1, -2, -5 és -6-os típusoknál 67  $\mu\text{M}$  (18,7  $\mu\text{g/ml}$ ); 17  $\mu\text{M}$  (4,7  $\mu\text{g/ml}$ ); 23  $\mu\text{M}$  (6,4  $\mu\text{g/ml}$ ) és 27  $\mu\text{M}$  (7,5  $\mu\text{g/ml}$ ) szer volt hatásos (93). A vad típusú HAdV-5 esetében 9,5  $\mu\text{g/ml}$ , a HAdV-8 és -14 esetében pedig 4,7  $\mu\text{g/ml}$  és 5,4  $\mu\text{g/ml}$  cidofovir gátolta átlagosan a vírusok 50%-át (191). Az adenovírusok szélesebb körű vizsgálata során, HAdV-3, -5, -7, -8 és -31-es típus esetében az 50%-os gátlást 0,5-2,0 mmol/l (0,1-6  $\mu\text{g/ml}$ ) cidofovir koncentrációk között tapasztalták (192). A ribavirinhez hasonló eredményeket tapasztaltunk FeAdV cidofoviral szembeni érzékenységét vizsgálva. A 0,625 mg/ml-es elő- és 1,25 mg/ml-es utókezelés során tapasztalt  $\text{IC}_{50}$  értékek azt mutatják, hogy a vírus cidofoviral szemben is sokkal ellenállóbb, mint a fent említett HAdV típusok.

Vizsgálataink során a FeAdV stavudinnal szemben mutatkozott a legérzékenyebbnek, 0,3125 mg/ml-es elő- és 0,625 mg/ml-es utókezelés már 50%-kal csökkentette a vírusfertőzött sejtek számát. A szakirodalomban ezzel szemben már kisebb mennyiségű szer is 50% gátlást eredményezett. HAdV-3 esetén 0,50 µg/ml, HAdV-4 esetén 0,091 µg/ml, HAdV-8 esetén 0,99 µg/ml; HAdV-19 esetén 5,7 µg/ml, HAdV-37 esetén pedig 5,3 µg/ml, HAdV-5 esetén 0,12 mM (26.9 µg/ml) stavudin koncentrációkra volt szükség az EC<sub>50</sub> érték eléréséhez (92, 193). Eredményeink alapján tehát elmondható, hogy a FeAdV a stavudinnal szemben is ellenállóbbnak bizonyult, mint egyéb adenovírusok. A vírus gyógyszerérzékenységének feltárása a leghatékonyabb terápia megtalálásán kívül azért is fontos, mert ezen adatok ismeretében, ha génterápiás vektorként alkalmaznák a jövőben a FeAdV-t, akkor ezen adatok ismeretében gyorsan eliminálható lehetne a szervezetből, ha netán komplikációk lépnének fel a használata során.

Az Avemarral történő vizsgálataink során láthattuk, hogy a szer nem csak a tumorelles, gyulladásos és immunszuppresszióval járó kezelések természetes kiegészítője lehet, de eredményeink alapján *in vitro* képes a FeAdV és a FIV szaporodását gátolni.

FeAdV-vel történő infekció esetén az Avemar hatása a fertőzött sejtek típusától függött. HeLa sejtekben csak nagyon kis mennyiségű gátlást tapasztaltunk, valószínűleg azért, mert a HeLa sejtekbe integrálódott humán papillomavírus (HPV) E6 és E7 géntermékei megakadályozzák a sejtek apoptózisát és transzaktiválják az adenovírust, így ellensúlyozzák az Avemar FeAdV ellenes hatását (194, 195). CrFK sejteken ezzel szemben nagymértékű gátló hatást tapasztaltunk a fertőzés előtti és a fertőzés utáni kezelés esetében is. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy az Avemar a HAdV fertőzés eliminációjában is jelentős szerepet játszhat. Mivel az adenovírusok képesek transzaktiválni a HIV-et, ezzel pedig halálos fertőzéseket okozhatnak, ezért a retrovírus fertőzésekben is érdemes lehet kiegészítő terápiaként alkalmazni.

Magyarországon 2022-ben 4685 magyar HIV fertőzöttet regisztráltak, míg a World Health Organization (WHO) 2021-es adatai szerint 38,4 millió HIV fertőzött él világszerte (196, 197). Az elmúlt években a HIV kezelés sokat fejlődött, azonban kuratív terápia még mindig nem létezik, a gyógyszerrezisztencia, a mellékhatások és páciensekben kialakult antiretrovirális terápiával kapcsolatos ellenérzések pedig továbbra



is problémákat okoznak (198, 199). A gyógyszeres kezelés hátrányait ellensúlyozhatják az olyan természetes alapú készítmények, amelyek immunrendszer-aktiváló és helyreállító tulajdonságokkal rendelkeznek, mint például az Avemar elnevezésű speciális élelmiszer.

Kísérleteinkben MBM sejtek segítségével az akut, FL-4 sejtek felhasználásával pedig a krónikus FIV fertőzés *in vitro* modellezése során tudunk megvizsgálni az Avemar hatását két FIV izolátumra. Azt tapasztaltuk, hogy már egyetlen Avemar dózis is csökkentette az MBM sejtfejlődés vírussterhelését azáltal, hogy gátolta a sejtek citopátiás hatását (99). A két vírus közül a FIV-M2 valamivel érzékenyebbnek bizonyult. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy FIV-M2 fertőzés hatására az MBM sejtek szincíciumképződés nélkül szétesnek (149). A FIV vírus nagyon korán integrálódik az MBM sejtek genomjába, ezenkívül apoptózist képes kiváltani a sejtekben, amely nagyon hasonló tulajdonság a HIV által indukált programozott sejthalálhoz (200). Akut és krónikus FIV fertőzés *in vitro* tanulmányozása során láttuk, hogy az Avemar nagymértékben képes csökkenteni a vírus replikációját, így a szer azáltal, hogy a fertőzött sejtek elpusztításával megszünteti a vírusstermelést, akár a teljes eliminációhoz is hozzájárulhat.

FL-4 sejteken a kisebb koncentrációjú Avemar nagyon erősen gátolta a FIV kiszabadulását a sejtekből, azonban töményebb dózis alkalmazásakor a fertőzött sejtek szétestek és a vírusrészecskék kiszabadultak. Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy az Avemar használatával a vírust lappangva hordozó sejtekben a víruszaporodás gátlása megszűnik. A sejtek elpusztulásával az MBM sejtekhez hasonlóan, ebben az esetben is megszűnhet a szervezet vírussterhelése. Az Avemar kezelés tehát az akut és a krónikus FIV-modellekben is elősegíti a sejthalált, a tapasztalt morfológiai változások pedig apoptózisra utalhatnak. Mivel a búzacsíra fermentációs terméke nem tartalmaz fitinsavat (csak annak töredékeit), amelyről kimutatták, hogy a HIV-1 virion bimbózásához szükséges, ezért az Avemar az MBM és FL-4 sejtek esetében is megzavarja a bimbózási folyamatot (99, 201). Munkacsoportunk elsőként vizsgálta az Avemar antivirális hatásait, eredményeink pedig azt mutatják, hogy a jövőben vírusfertőzések kezelésében és megelőzésében is potenciálisan alkalmas táplálékkiegészítő lehet. Sajnos, *in vitro* kísérleteink hátránya, hogy a sejtek élettartama rövid, így csak egy dózissal tudtuk a kezelést elvégezni, azonban a kisállatmodellek

lehetőséget nyújtanak a krónikus fertőzések modellezésére mind a preventív, mind a terápiás Avemar kezelés hatására.

A HeLa, CrFK és HEK-293 sejtek AdV-kötő receptorainak blokkolása során azt tapasztaltuk, hogy az egyes sejtvonalak FeAdV-vel szembeni permisszivitása eltérő. A FeAdV és a HAdV-1 filogenetikai rokonsága arra utalt, hogy a HAdV-hoz hasonlóan a FeAdV receptora is a CAR, koreceptorai pedig az  $\alpha\beta_3$  illetve  $\alpha\beta_5$  integrinek. Korábbi adatok alátámasztották, hogy a FeAdV CAR expresszió hiányában nem volt képes megfertőzni egér és hörcsög eredetű sejteket, egy vizsgált melanoma sejtvonal, amely felszínén csak kis mennyiségben fejeződnek ki integrin molekulák, pedig szemipermisszívnek bizonyult (144). A vizsgált HeLa, CrFK és HEK-293 sejtvonalak mindegyike expresszálja ezeket a receptorokat, azonban együttes gátlásuk sem akadályozta meg teljesen a vírus sejtbe jutását. Eredményeink arra utalnak, hogy a FeAdV a CAR és az integrin receptorok mellett alternatív úton is bejuthat a sejtekbe. A jelenség ismerete adenovírus vektorok tervezésében kiemelten fontos tényező.

Az adenovírus fertőzés, illetve a vírus reaktiválódása során akár káros citokin vihar is keletkezhet. Ennek minél jobb megértése nem csak a betegség leküzdésében, de az AdV alapú expressziós vektorok alkalmazása esetén is fontos. Kísérleteinkben két fontos citokin mennyiségének időbeli változását figyeltük meg FeAdV fertőzés esetén. Az IL-10-et sokféle immunsejt, köztük a makrofágok, dendritikus sejtek, NK sejtek, T- és B-limfociták expresszálják. Az MHC II molekulák downregulációja révén gátolja a monociták antigénprezentáló képességét, így megakadályozza a humán T-sejtek antigén-specifikus proliferációját. Segítségével a vírusok képesek elkerülni az immunválaszt, ugyanis szerepet játszik az intracelluláris patogének elpusztításának gátlásában (157, 202). Gyulladáscsökkentő hatása mellett a szervátültetések során esetlegesen fellépő graft elégtelenség megakadályozásában is részt vesz (203). A TGF- $\beta$ 1 a pleiotróp citokinek csoportjába tartozik, hatással van többféle sejttípus aktiválására, proliferációjára, differenciációjára, a TGF- $\beta$  jelátvitelnek pedig kiemelkedő szerepe van olyan biológiai folyamatokban, mint például a daganatellenes és pro-onkogén hatások. Az AdV-ok befolyásolják a TGF- $\beta$  jelátvitelt, például az E1A fehérje gátolja a TGF- $\beta$  által kiváltott sejtnövekedés leállítását, hosszútávon pedig a fertőzött sejtek érzéketlenek lesznek a TGF- $\beta$  által indukált apoptózisra (158, 204).

Az IL-10 és a TGF- $\beta$ 1 egészséges sejtekben is keletkezik, de vírusfertőzés hatására megváltozik a termelődésük. Mivel az IL-10 szabályozza a citokinek túlzott termelődését, tehát gyulladásgátló tulajdonságokkal rendelkezik (157), ezért csökkenése a fertőzést követő 96 óra elteltével azt jelenti, hogy a FeAdV lecsökkentve a gyulladásgátló citokin szabályozást, lehetővé teszi gyulladáskeltő citokinek termelését. A TGF- $\beta$ 1 fontos szerepet játszik az immunsejtek aktiválásában (204). Fertőzetlen HeLa sejtek spontán TGF- $\beta$ 1 termelése hullámzó, trifázisos volt, 4 és 10, illetve 72 és 168 óra körüli maximumokkal. FeAdV hatására a hullámzás gyakorlatilag eltűnik, csupán 24 órával a fertőzést követően volt mérhető egy maximális fehérje kibocsátás. Ez a fehérvérsejtek aktiválásának és aktivitásának gátlására utal, amely rendkívül fontos tényező adenovírusok nagymértékű szaporodásában, illetve eliminálásuk elhúzódásában. Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a FeAdV jelentős immunmoduláló hatással rendelkezik, amely tulajdonságát figyelembe kell venni génterápiás vektorként való felhasználása esetén. Vizsgálataink e téren úttörő jellegűek.

## 6. Következtetések

Eredményeink tovább erősítik azt a feltételezést, miszerint szoros rokonsági kapcsolat van a HAdV-1 és a macskából izolált FeAdV között. A korábban végzett szerológiai, antigénszerkezeti, különböző sejtvonalakban történő tenyésztési és szekvenálási vizsgálatok mellett (144), kutatásaink további eredményeket szolgáltatnak a FeAdV karakterizálását illetően.

A FeAdV-vel végzett korábbi kísérletek, valamint a filogenetikai és génösszehasonlítási eredményeink azt sugallják, hogy a FeAdV egy önálló biológiai egység. Az állati és az emberi adenovírusok egyaránt okozhatnak opportunistá fertőzéseket immunhiányos egyedekben (144). Lakatos és munkatársai (2017) nemrég sikeresen kimutattak egy disszeminált adenovírus fertőzéstől szenvedő macska formalinnal fixált, parafinba ágyazott szövetmintájából adenovírus nukleinsavat, a hexon gén jelenlétét pedig szekvenálással is megerősítették, amely szintén bizonyító erővel hat a macska adenovírusok létezésére, bár sajnos csak egy rövid szakasz került megszekvenálásra (60). Nem szabad figyelmen kívül hagyni a tényt, miszerint az adenovírusok fajok közötti átvitelre és rekombinációra képesek (52). A FeAdV HAdV-1-hez közeli rokonsági kapcsolata felveti a zoonózis, vagy a reverz zoonózis kérdését. Mivel a HAdV-1 az egész világon elterjedt, ezért nem kizárható, hogy a FeAdV egy macskákhoz adaptálódott természetes változata a humán típusnak (144). Japánban egy akut gastroenteritisben szenvedő 1 éves kislány székletmintájából sikerült egy olyan adenovírust kimutatni, amely hexon és fiber génjei 100 és 97%-ban egyeztek a FeAdV hexon és fiber szekvenciáival. A filogenetikai fa, amely számos emberi, emlős és madár adenovírus szekvencia felhasználásával készült, pedig a saját eredményeinkhez hasonlóan szintén a HAdV-1-gyel (Adenoid 71 prototípus) való szoros rokonságot támasztotta alá. Phan és munkatársai (2006) arra a következtetésre jutottak, hogy a kapott adatok a macskáról emberre történő átvitelt bizonyítják (205). Nem ez az egyetlen publikáció, amely ezt sugallja. Brazíliában 468 akut légúti megbetegedésben szenvedő gyermek orr-garatváladékmintájából összesen 33 bizonyult pozitívnak valamilyen HAdV típusra és 1 vizsgált minta 100%-ban azonos volt a FeAdV hexon szekvenciájával (206). Az általunk készített filogenetikai fa, illetve a fent említett publikációk arra engednek következtetni, hogy a FeAdV az egész világon elterjedt és potenciálisan megfertőzheti az embert. A fertőzések kockázatának a macskatenyésztők, esetleg a nagymacskákkal

foglalkozó egyének, de főleg az immunhiányos gazdaszervezetek például a HIV-fertőzött macskatartók lehetnek kitéve (141, 144). Az adenovírusok, így a FeAdV is képes lehet transzaktiválni a HIV-et, emiatt kiemelt szerepet játszhat az AIDS-kutatásokban, már csak azért is, mert jelenleg a macska-AIDS modell az egyetlen kisállatmodell a humán AIDS tanulmányozására (140). Munkacsoportunk elsőként vizsgálta az Avemar gyógyhatású készítmény antivirális tulajdonságait, amely nem csak a daganatok és a HIV fertőzés esetén lehet hasznos táplálékkiegészítő, hanem a FeAdV szaporodóképességét is gátolni tudja *in vitro* (99).

Kutatásunk során a FeAdV karakterizálásához nélkülözhetetlen információkat kaptunk. Fiziko-kémiai vizsgálataink segítségével feltártuk azokat a körülményeket, amelyek gátolják a FeAdV szaporodását, vagy teljesen elpusztítják a vírust, így már rendelkezésünkre állnak azok a módszerek, amelyekkel sikeresen eliminálhatjuk a FeAdV-t a környezetből, megakadályozva ezzel a fertőzés terjedését. Meghatároztuk az izolátum antivirális gyógyszerekkel szembeni érzékenységét, adatokat szolgáltatva ezzel a legmegfelelőbb gyógymód eléréséhez (207). Receptor és koreceptor blokkolási eredményeink segítségével feltártuk, hogy a FeAdV alternatív útvonalakon is képes lehet a sejtbe jutni és fertőzést indukálni, ezeknek a pontos meghatározása azonban további kutatásokat igényel. Nyomon követtük két fontos, pleiotróp hatású citokin termelődésének változását FeAdV hatására, így világossá vált, hogy a vírus feltételezhetően erős immunmoduláló tulajdonságokkal rendelkezik. A FeAdV ilyen mértékű jellemzése alapvető információkat ad az izolátum génterápiás vektorként való alkalmazhatóságáról is. Az Avemar antivirális hatásának tanulmányozása során láthattuk, hogy képes csökkenteni a FIV és a FeAdV mennyiségét különböző sejtekben, érdemes tehát megfontolni HIV fertőzés során kiegészítő kezelésként történő alkalmazását, főleg azért, mert a HIV fertőzöttek közel 30%-ánál fordul elő AdV fertőzés is, eredményeink alapján pedig az Avemar potenciálisan alkalmas lehet mindkét vírus ellen, mint speciális gyógyászati célú táplálékkiegészítő.

A FeAdV-vel végzett korábbi vizsgálatok és jelenlegi eredményeink együttesen azt támasztják alá, hogy a macskák képesek lehetnek adenovírussal fertőződni, ráadásul potenciálisan átadhatják azt az arra fogékony embereknek is. A jövőben további szerológiai, molekuláris biológiai és összehasonlító vizsgálatokra van szükség, hogy a FeAdV patomechanizmusát a lehető legjobban feltárjuk és megértsük macskákban és

emberekben egyaránt, valamint indokolt lenne specifikus diagnosztikai módszerek, eszközök kidolgozása is.

## 7. Összefoglalás

Az adenovírusok (AdV) széles körben előfordulnak gerincesekben, így az emberben is, általában enyhe vagy súlyos tüneteket okoznak. Élethosszig lappanghatnak az immunsejtekben, különböző hatásokra pedig aktiválódhatnak és akár halált is okozhatnak. Korai géntermékeik képesek transzaktiválni a humán immundeficiencia vírust (HIV), serkentve ezáltal a szerzett immunhiányos tünetegyüttes (AIDS) progresszióját. Specifikus, AdV elleni terápia nem áll rendelkezésre. Az AdV-ok kimutatása a fő kapszidfehérjék, a hexon és a fiber alapján történik hagyományos, vagy molekuláris technológiák segítségével. Előnyös tulajdonságaik miatt gyakran használják őket génterápiás vektorként. Az AdV-okról több esetben bebizonyosodott, hogy nem csak fajon belül, hanem fajok közötti rekombinációra és adaptációra is képesek. Ezt támasztja alá a macska adenovírus (FeAdV) izolátum is, amelyről korábbi vizsgálatok bebizonyították, hogy sejtropizmusa széles, valamint feltételezhetően közeli rokonságban áll az 1-es típusú humán adenovírussal (HAdV-1).

Kutatásunk célja a FeAdV részletesebb karakterizálása, valamint a HAdV-1-gyel való rokonság további bizonyítása volt. Mivel eddig nem írtak le FeAdV vizsgálatára alkalmas módszert, ezért HAdV-ekkel kapcsolatos technikákat alkalmaztunk.

A vírust különböző fiziko-kémiai és környezeti hatásnak kitéve feltártuk azokat a körülményeket, amelyek gátolják a FeAdV szaporodását, vagy teljesen elpusztítják a vírust. Meghatároztuk az izolátum antivirális gyógyszerekkel és a daganatellenes terápiában étrendkiegészítőként alkalmazható Avemarral szembeni érzékenységét. Receptor és koreceptor blokkolási vizsgálataink segítségével feltártuk, hogy a FeAdV milyen útvonalakon képes a sejtbe jutni, két pleiotróp citokin nyomonkövetésével pedig a vírus immunmoduláló hatásáról kaptunk információt. Ezen eredmények alapján a FeAdV akár génterápiás vektorként is alkalmazható. Adataink összehasonlítása a szakirodalommal, a szekvenciaelemzés és a filogenetikai fa a HAdV-1-gyel való szoros rokonságot támasztották alá.

A korábbi és a mostani FeAdV kutatások arra engednek következtetni, hogy a macskák nem csak megfertőződhetnek adenovírussal, de akár át is adhatják azt az arra fogékony embereknek. A FeAdV patomechanizmusának jobb megértéséhez a jövőben állatorvosok bevonásával további kutatások, klinikai-epidemiológiai vizsgálatok, és diagnosztikus készítmények kifejlesztése szükségesek.

## 8. Summary

Adenoviruses (AdV) occur widely in vertebrates, including humans and usually cause mild to severe symptoms. They can lurk in the immune cells for a lifetime, and can be activated for different effects and even cause death. Their early gene products are able to transactivate the human immunodeficiency virus (HIV), thereby stimulating the progression of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). There is no specific therapy against AdV. AdV detection is based on the main capsid proteins, hexon and fiber, using conventional or molecular techniques. Due to their advantageous properties, they are often used as gene therapy vectors. AdVs have been shown to be capable of recombination and adaptation not only within species, but also between species. This is also supported by the feline adenovirus (FeAdV) isolate, which previous studies have shown to have a broad cell tropism and which is presumably closely related to human adenovirus type 1 (HAdV-1).

The aim of our research was to characterise FeAdV in more details and to further demonstrate its relationship with HAdV-1. Since no suitable method for testing FeAdV has been described so far, we used techniques related to HAdVs.

By exposing the virus to various physico-chemical and environmental effects, we discovered the conditions that inhibit the reproduction of FeAdV or completely destroy the virus. We determined the sensitivity of the isolate to antiviral drugs and Avemar, which can be used as a dietary supplement in antitumour therapy. With the help of our receptor and co-receptor blocking studies, we revealed the pathways by which FeAdV is able to enter the cells, and by monitoring two pleiotropic cytokines, we obtained information about the immunomodulatory effect of the virus. Based on these results, FeAdV could be used as a gene therapy vector. Comparison of our data with the literature, sequence analysis and phylogenetic tree supported a close relationship with HAdV-1.

Previous and current FeAdV research suggests that cats may not only become infected with adenovirus, but may also transmit it to susceptible humans. For a better understanding of the pathomechanism of FeAdV, further research, clinical-epidemiological studies, and the development of diagnostic preparations are necessary in the future with the involvement of veterinarians.



## 9. Irodalomjegyzék

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Current ICTV Taxonomy Release [Internet]. 2023 [cited 2023 July 19] Available from <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
2. Greber UF. Adenoviruses–Infection, pathogenesis and therapy. *FEBS Lett.* 2020 Jun;594(12):1818-27.
3. Lion T. Adenovirus Infections in Immunocompetent and Immunocompromised Patients. *Clin Microbiol Rev.* 2014 Jul;27(3):441-62.
4. Human Adenovirus Working Group [Internet]. (2023). [updated 2022 March; cited 2023 July 10] Available from <http://hadvwg.gmu.edu/>
5. Lynch JP 3rd, Kajon AE. Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Semin Respir Crit Care Med.* 2016 Aug;37(4):586-602.
6. Tarcsai KR, Corolciuc O, Kövesdi V, Ongrádi J. (2022). Adenoviridae. In: Takács M, editor. *Orvosi virológia.* Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt; 2022. p. 129-36.
7. Nemerow G, Pache L, Reddy V, Stewart P. Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. *Virology.* 2009 Feb;384(2):380-8.
8. Greber UF, Flatt JW. Adenovirus Entry: From Infection to Immunity. *Annu Rev Virol.* 2019 Sep 29;6(1):177-97.
9. Shieh W. Human adenovirus infections in pediatric population - An update on clinico–pathologic correlation. *Biomed J.* 2022 Feb;45(1):38-49.
10. Kulanayake S, Tikoo S. Adenovirus Core Proteins: Structure and Function. *Viruses.* 2021 Feb 28;13(3):388.
11. Wehbi A, Kremer EJ, Dopeso-Reyes IG. Location of the Cell Adhesion Molecule "Coxsackievirus and Adenovirus Receptor" in the Adult Mouse Brain. *Front Neuroanat.* 2020 Jun 4;14:28.

12. Matthaues C, Jüttner R, Gotthardt M, Rathjen FG. The IgCAM CAR Regulates Gap Junction-Mediated Coupling on Embryonic Cardiomyocytes and Affects Their Beating Frequency. *Life*. 2022 Dec 21;13(1):14.
13. Bewley MC, Springer K, Zhang YB, Freimuth P, Flanagan JM. Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR. *Science*. 1999 Nov 19;286(5444):1579-83.
14. Law LK, Davidson BL. What Does It Take to Bind CAR?. *Mol Ther*. 2005 Oct;12(4):599-609.
15. Walters RW, Freimuth P, Moninger TO, Ganske I, Zabner J, Welsh MJ. Adenovirus Fiber Disrupts CAR-Mediated Intercellular Adhesion Allowing Virus Escape. *Cell*. 2002 Sep;110(6):789-99.
16. Gaggar A, Shayakhmetov DM, Lieber A. CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med*. 2003 Nov;9(11):1408-12.
17. Wu E, Trauger SA, Pache L, Mullen TM, von Seggern DJ, Siuzdak G, Nemerow GR. Membrane cofactor protein is a receptor for adenoviruses associated with epidemic keratoconjunctivitis. *J Virol*. 2004 Apr;78(8):3897-905.
18. Ni Choileain S, Astier AL. CD46 processing: a means of expression. *Immunobiology*. 2012 Feb;217(2):169-75.
19. Wang H, Li ZY, Liu Y, Persson J, Beyer I, Möller T, Koyuncu D, Drescher MR, Strauss R, Zhang XB, Wahl JK 3rd, Urban N, Drescher C, Hemminki A, Fender P, Lieber A. Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14. *Nat Med*. 2011 Jan;17(1):96-104.
20. Arnberg N, Edlund K, Kidd AH, Wadell G. Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor. *J Virol*. 2000 Jan;74(1):42-8.
21. Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow GR. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*. 1993 Apr 23;73(2):309-19.
22. Stewart PL, Nemerow GR. Cell integrins: commonly used receptors for diverse viral pathogens. *Trends Microbiol*. 2007 Nov;15(11):500-7.

23. Wiethoff CM, Wodrich H, Gerace L, Nemerow GR. Adenovirus Protein VI Mediates Membrane Disruption following Capsid Disassembly. *J Virol*. 2005 Feb 15;79(4):1992-2000.
24. Wodrich H, Guan T, Cingolani G, Von Seggern D, Nemerow G, Gerace L. Switch from capsid protein import to adenovirus assembly by cleavage of nuclear transport signals. *EMBO J*. 2003 Dec 1;22(23):6245-55.
25. Nestić D, Božinović K, Pehar I, Wallace R, Parker AL, Majhen D. The Revolving Door of Adenovirus Cell Entry: Not All Pathways Are Equal. *Pharmaceutics*. 2021 Sep 29;13(10):1585.
26. Chinnadurai G. Opposing oncogenic activities of small DNA tumor virus transforming proteins. *Trends Microbiol*. 2011 Apr;19(4):174-83.
27. Pied N, Wodrich H. Imaging the adenovirus infection cycle. *FEBS Lett*. 2019 Dec;593(24):3419-48.
28. Zhao H, Granberg F, Pettersson U. How adenovirus strives to control cellular gene expression. *Virology*. 2007 Jul;363(2):357-75.
29. Berk AJ. Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. *Oncogene*. 2005 Nov 21;24(52):7673-85.
30. Carnero E, Sutherland JD, Fortes P. Adenovirus and miRNAs. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Nov-Dec;1809(11-12):660-7.
31. Hidalgo P, Ip WH, Dobner T, Gonzalez RA. The biology of the adenovirus E1B 55K protein. *FEBS Lett*. 2019 Dec;593(24):3504-17.
32. Lichtenstein DL, Toth K, Doronin K, Tollefson AE, Wold WSM. Functions and mechanisms of action of the adenovirus E3 proteins. *Int Rev Immunol*. 2004 Jan;23(1-2):75-111.
33. Weitzman MD. Functions of the adenovirus E4 proteins and their impact on viral vectors. *Front Biosci*. 2005;10(1-3):1106.
34. Hendrickx R, Stichling N, Koelen J, Kuryk L, Lipiec A, Greber UF. Innate Immunity to Adenovirus. *Hum Gene Ther*. 2014 Apr;25(4):265-84.

35. Gregory SM, Nazir SA, Metcalf JP. Implications of the innate immune response to adenovirus and adenoviral vectors. *Future Virol.* 2011 Mar;6(3):357-74.
36. Schagen FH, Ossevoort M, Toes RE, Hoeben RC. Immune responses against adenoviral vectors and their transgene products: a review of strategies for evasion. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004 Apr;50(1):51-70.
37. Nazir SA, Metcalf JP. Innate Immune Response to Adenovirus. *J Investig Med.* 2005 Sep;53(6):292-304.
38. Smith JG, Silvestry M, Lindert S, Lu W, Nemerow GR, Stewart PL. Insight into the Mechanisms of Adenovirus Capsid Disassembly from Studies of Defensin Neutralization. *PLoS Pathog.* 2010 Jun 24;6(6):e1000959.
39. Cotter MJ, Zaiss AK, Muruve DA. Neutrophils interact with adenovirus vectors via Fc receptors and complement receptor 1. *J Virol.* 2005 Dec;79(23):14622-31.
40. Atasheva S, Shayakhmetov DM. Cytokine Responses to Adenovirus and Adenovirus Vectors. *Viruses.* 2022 Apr 24;14(5):888.
41. Li J, Wei J, Xu Z, Jiang C, Li M, Chen J, Li Y, Yang M, Gu Y, Wang F, Shu Y, Yang Y, Sun L, Liu Y. Cytokine/Chemokine Expression Is Closely Associated Disease Severity of Human Adenovirus Infections in Immunocompetent Adults and Predicts Disease Progression. *Front Immunol.* 2021 Jun 7;12:691879.
42. Mistchenko AS, Diez RA, Mariani AL, Robaldo J, Maffey AF, Bayley-Bustamante G, Grinstein S. Cytokines in adenoviral disease in children: association of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor alpha levels with clinical outcome. *J Pediatr.* 1994 May;124(5 Pt 1):714-20.
43. Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic Control of Viral Infections by the Innate and Adaptive Immune Response. *Annu Rev Immunol.* 2001 Apr;19(1):65-91.
44. Leen AM, Rooney CM. Adenovirus as an emerging pathogen in immunocompromised patients. *Br J Haematol.* 2005 Jan;128(2):135-44.
45. Horwitz, MS. Adenoviruses. In: Knipe DM, & Howley PM, editor. *Fields Virology.* Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2001. p. 2301–26.

46. Heemskerk B, van Vreeswijk T, Veltrop-Duits LA, Sombroek CC, Franken K, Verhoosel RM, Hiemstra PS, van Leeuwen D, Rensing ME, Toes RE, van Tol MJ, Schilham MW. Adenovirus-specific CD4<sup>+</sup> T cell clones recognizing endogenous antigen inhibit viral replication in vitro through cognate interaction. *J Immunol*. 2006 Dec 15;177(12):8851-9.
47. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annu Rev Immunol*. 1989 Apr;7(1):145-73.
48. Lam JH, Smith FL, Baumgarth N. B Cell Activation and Response Regulation During Viral Infections. *Viral Immunol*. 2020 May 1;33(4):294-306.
49. Oliveira ERA, Bouvier M. Immune evasion by adenoviruses: a window into host-virus adaptation. *FEBS Lett*. 2019 Dec;593(24):3496-503.
50. Vasavada R, Eager KB, Barbanti-Brodano G, Caputo A, Ricciardi RP. Adenovirus type 12 early region 1A proteins repress class I HLA expression in transformed human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986 Jul;83(14):5257-61.
51. Mahr JA, Gooding LR. Immune evasion by adenoviruses. *Immunol Rev*. 1999 Apr;168(1):121-30.
52. Borkenhagen LK, Fieldhouse JK, Seto D, Gray GC. Are adenoviruses zoonotic? A systematic review of the evidence. *Emerg Microbes Infect*. 2019;8(1):1679-1687.
53. Chen EC, Yagi S, Kelly KR, Mendoza SP, Tarara RP, Canfield DR, Maninger N, Rosenthal A, Spinner A, Bales KL, Schnurr DP, Lerche NW, Chiu CY. Cross-species transmission of a novel adenovirus associated with a fulminant pneumonia outbreak in a new world monkey colony. *PLoS Pathog*. 2011 Jul;7(7):e1002155.
54. Chiappetta CM, Cibulski SP, Lima FES, Varela APM, Amorim DB, Tavares M, Roehe PM. Molecular Detection of Circovirus and Adenovirus in Feces of Fur Seals (*Arctocephalus* spp.). *Ecohealth*. 2017 Mar;14(1):69-77.
55. Walker D, Gregory WF, Turnbull D, Rocchi M, Meredith AL, Philbey AW, Sharp CP. Novel adenoviruses detected in British mustelids, including a unique

- Aviadenovirus in the tissues of pine martens (*Martes martes*). *J Med Microbiol*. 2017 Aug;66(8):1177-1182.
56. Park NY, Lee MC, Kurkure NV, Cho HS. Canine Adenovirus Type 1 Infection of a Eurasian River Otter (*Lutra lutra*). *Vet Pathol*. 2007 Jul;44(4):536-9.
  57. Monteiro GS, Fleck JD, Kluge M, Rech NK, Soliman MC, Staggemeier R, Rodrigues MT, Barros MP, Heinzelmann LS, Spilki FR. Adenoviruses of canine and human origins in stool samples from free-living pampas foxes (*Lycalopex gymnocercus*) and crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) in São Francisco de Paula, Rio dos Sinos basin. *Braz J Biol*. 2015 May;75(2 Suppl):11-6.
  58. Gupta PP. Inclusion Body Hepatitis in a Black Panther (*Panthera pardus pardus*). *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*. 2010 May 13;25(10):858-60.
  59. Kennedy FA, Mullaney TP. Disseminated Adenovirus Infection in a Cat. *J VET Diagn Invest*. 1993 Apr;5(2):273-6.
  60. Lakatos B, Hornyák Á, Demeter Z, Forgách P, Kennedy F, Rusvai M. Detection of a putative novel adenovirus by PCR amplification, sequencing and phylogenetic characterisation of two gene fragments from formalin-fixed paraffin-embedded tissues of a cat diagnosed with disseminated adenovirus disease. *Acta Vet Hung*. 2017 Dec;65(4):574-84.
  61. Echavarría M. Adenoviruses in immunocompromised hosts. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Oct;21(4):704-15.
  62. Tebruegge M, Curtis N. Adenovirus infection in the immunocompromised host. *Adv Exp Med Biol*. 2010;659:153-74.
  63. Lion T. Adenovirus persistence, reactivation, and clinical management. *FEBS Lett*. 2019 Dec;593(24):3571-82.
  64. Zhang L, Hedjran F, Larson C, Perez GL, Reid T. A novel immunocompetent murine model for replicating oncolytic adenoviral therapy. *Cancer Gene Ther*. 2015 Jan;22(1):17-22.
  65. Stercz B, Tarcsai KR, Ongrádi, J. Adenovírus-fertőzések újonnan felismert vonatkozásai. *Orvostovábbk. Szle*. 2017;24(11): 44-47.

66. Louie JK, Kajon AE, Holodniy M, Guardia-LaBar L, Lee B, Petru AM, Hacker JK, Schnurr DP. Severe pneumonia due to adenovirus serotype 14: a new respiratory threat? *Clin Infect Dis*. 2008 Feb 1;46(3):421-5.
67. Edwards KM, Thompson J, Paolini J, Wright PF. Adenovirus infections in young children. *Pediatrics*. 1985 Sep;76(3):420-4.
68. Cook J, Radke J. Mechanisms of pathogenesis of emerging adenoviruses. *F1000Res*. 2017 Jan 30;6:90.
69. Ishiko H, Shimada Y, Konno T, Hayashi A, Ohguchi T, Tagawa Y, Aoki K, Ohno S, Yamazaki S. Novel human adenovirus causing nosocomial epidemic keratoconjunctivitis. *J Clin Microbiol*. 2008 Jun;46(6):2002-8.
70. Pleyer U, Birnbaum F. Adenovirus-Keratokonjunktivitis. *Ophthalmologe*. 2015 May;112(5):459-71.
71. Allen CW, Alexander SI. Adenovirus associated haematuria. *Arch Dis Child*. 2005 Mar;90(3):305-6.
72. Hanaoka N, Ito S, Konagaya M, Nojiri N, Yasuda M, Fujimoto T, Deguchi T. Infectious human adenoviruses are shed in urine even after disappearance of urethral symptoms. *PLoS One*. 2019 Mar 6;14(3):e0212434.
73. Kocazeybek B, Dinc HO, Ergin S, Saribas S, Ozcabi BT, Cizmecigil U, Altan E, Atalik K, Yüksel P, Taner Z, Karakullukcu A, Sirekbasan S, Turan N, Cagatay P, Imamova N, Evliyaoglu O, Yilmaz H. Evaluation of Adenovirus-36 (Ad-36) antibody seropositivity and adipokine levels in obese children. *Microb Pathog*. 2017 Jul;108:27-31.
74. Hierholzer JC. Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin Microbiol Rev*. 1992 Jul;5(3):262-274.
75. Stercz B, Nagy K, Ongrádi J. Adenovírus-fertőzések immunszuppresszált betegekben. *Orv. Hetil*. 2012 Dec;153(48):1896-904.
76. Van den Veyver IB, Ni J, Bowles N, Carpenter RJ Jr, Weiner CP, Yankowitz J, Moise KJ Jr, Henderson J, Towbin JA. Detection of intrauterine viral infection using the polymerase chain reaction. *Mol Genet Metab*. 1998 Feb;63(2):85-95.

77. Cesaro S, Porta F. Adenovirus Infection in Pediatric Hematopoietic Cell Transplantation: A Challenge Still Open for Survival. *J Clin Med*. 2022 Aug 18;11(16):4827.
78. Florescu DF, Stohs EJ. Approach to infection and disease due to adenoviruses in solid organ transplantation. *Curr Opin Infect Dis*. 2019 Aug;32(4):300-6.
79. Florescu DF, Islam MK, Mercer DF, Grant W, Langnas AN, Freifeld AG, Sudan D, Basappa R, Dimaio D, Kalil AC. Adenovirus infections in pediatric small bowel transplant recipients. *Transplantation*. 2010 Jul 27;90(2):198-204.
80. Kolawole OM, Oladosu TO, Abdulkarim AA, Okoh AI. Prevalence of adenovirus respiratory tract and hiv co-infections in patients attending the University of Ilorin, teaching hospital, Ilorin, Nigeria. *BMC Res Notes*. 2014 Dec 3;7:870.
81. Tarcsai KR, Kapran I, Hidvégi M, Stercz B, Nagy K, Ongrádi J. (2020). Fermentált búzacsíra-kivonat(Avemar) antivirális hatásának vizsgálata macska AIDS modellben. *Magy. állatorv. L*. 2020;142(12), 731-741.
82. De Jong JC, Wermenbol AG, Verweij-Uijterwaal MW, Slaterus KW, Wertheim-Van Dillen P, Van Doornum GJ, Khoo SH, Hierholzer JC. Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *J Clin Microbiol*. 1999 Dec;37(12):3940-5.
83. Klierer S, Garcia J, Pearson L, Soultanakis E, Dasgupta A, Gaynor R. Multiple transcriptional regulatory domains in the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat are involved in basal and E1A/E1B-induced promoter activity. *J Virol*. 1989 Nov;63(11):4616-25.
84. Kojaoghlanian T, Flomenberg P, Horwitz MS. The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Rev Med Virol*. 2003 May;13(3):155-71.
85. Kosulin K, Rauch M, Ambros PF, Pötschger U, Chott A, Jäger U, Drach J, Nader A, Lion T. Screening for adenoviruses in haematological neoplasia: High prevalence in mantle cell lymphoma. *Eur J Cancer*. 2014 Feb;50(3):622-7.



86. Ongrádi J, Csata S, Farkas J, Nász I, Bendinelli M. Transfected lymphocyte extracts of patients with urological tumours: Complement temperature-sensitive adenovirus mutants in vitro. *Int Urol Nephrol*. 1994 Dec;26(4):361-73.
87. Mahafzah AM, Landry ML. Evaluation of immunofluorescent reagents, centrifugation, and conventional cultures for the diagnosis of adenovirus infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1989 Sep;12(5):407-11.
88. Hierholzer JC, Johansson KH, Anderson LJ, Tsou CJ, Halonen PE. Comparison of monoclonal time-resolved fluoroimmunoassay with monoclonal capture-biotinylated detector enzyme immunoassay for adenovirus antigen detection. *J Clin Microbiol*. 1987 Sep;25(9):1662-7.
89. Flomenberg P. Adenovirus infections. *Medicine*. 2009 Dec;37(12):676-8.
90. Wong SSY, Yip CCY, Sridhar S, Leung KH, Cheng AKW, Fung AMY, Lam HY, Chan KH, Chan JFW, Cheng VCC, Tang BSF, Yuen KY. Comparative evaluation of a laboratory-developed real-time PCR assay and RealStar® Adenovirus PCR Kit for quantitative detection of human adenovirus. *Virology*. 2018 Sep 27;15(1):149.
91. Zhao S, Guan W, Ma K, Yan Y, Ou J, Zhang J, Yu Z, Wu J, Zhang Q. Development and Application of a Fast Method to Acquire the Accurate Whole-Genome Sequences of Human Adenoviruses. *Front Microbiol*. 2021 May 14;12:661382.
92. Uchio E, Fuchigami A, Kadonosono K, Hayashi A, Ishiko H, Aoki K, Ohno S. Anti-adenoviral effect of anti-HIV agents in vitro in serotypes inducing keratoconjunctivitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2007 Sep;245(9):1319-25.
93. Morfin F, Dupuis-Girod S, Mundweiler S, Falcon D, Carrington D, Sedlacek P, Bierings M, Cetkovsky P, Kroes AC, van Tol MJ, Thouvenot D. In vitro susceptibility of adenovirus to antiviral drugs is species-dependent. *Antivir Ther*. 2005;10(2):225-9.
94. Waye MMY, Sing CW. Anti-Viral Drugs for Human Adenoviruses. *Pharmaceuticals*. 2010 Oct 25;3(10):3343-54.

95. Bruno B, Gooley T, Hackman RC, Davis C, Corey L, Boeckh M. Adenovirus infection in hematopoietic stem cell transplantation: effect of ganciclovir and impact on survival. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2003 May;9(5):341-52.
96. Neofytos D, Ojha A, Mookerjee B, Wagner J, Filicko J, Ferber A, Dessain S, Grosso D, Brunner J, Flomenberg N, Flomenberg P. Treatment of adenovirus disease in stem cell transplant recipients with cidofovir. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007 Jan;13(1):74-81.
97. Saquib R, Melton LB, Chandrakantan A, Rice KM, Spak CW, Saad RD, Fenves AZ, Barri YM. Disseminated adenovirus infection in renal transplant recipients: the role of cidofovir and intravenous immunoglobulin. *Transpl Infect Dis.* 2010 Feb;12(1):77-83.
98. Ryan MAK, Gray GC, Smith B, McKeehan JA, Hawksworth AW, Malasig MD. Large Epidemic of Respiratory Illness Due to Adenovirus Types 7 and 3 in Healthy Young Adults. *Clin Infect Dis.* 2002 Mar 1;34(5):577-82.
99. Tarcsai KR, Hidvégi M, Corolciuc O, Nagy K, Abbas AA, Ablashi DV, Kövesdi V, Ongrádi J. The effects of Avemar treatment on feline immunodeficiency virus infected cell cultures. *Vet Med Sci.* 2023 Jul;9(4):1446-55.
100. Avemar. Az Avemar granulátum összetevői [Internet]. 2023 [cited 2023 July 15]. Available from: <http://www.avemar.hu>
101. Barabás J, Németh Z. A Magyar Arc-, Állcsont- és Szájsebészeti Társaság állásfoglalása szájüregi daganatos betegek Avemarral történő szupportív kezelésének indokoltságáról. *Orv Hetil.* 2006 Sep 3;147(35):1709-11.
102. Telekes A, Hidvégi, M. (2000). Az Avemar hatásmechanizmusa - rákellenes hatások laboratóriumi állatokban és daganatos betegekben. *Nőgyógyászati Onkológia*, 2000; 5: 188-189.
103. Rafai P, Papp Z, Jakab L, Tuboly T, Jurkovich V, Brydl E, Ózsvári L, Kósa E. The effect of fermented wheat germ extract on production parameters and immune status of growing pigs. *J Anim Feed Sci.* 2011 Mar 12;20(1):36-46.

104. Hidvégi M, Ráso E, Tömösközi-Farkas R, Paku S, Lapis K, Szende B. Effect of Avemar and Avemar + vitamin C on tumor growth and metastasis in experimental animals. *Anticancer Res.* 1998 Jul-Aug;18(4A):2353-8.
105. Heimbach JT, Sebestyén G, Semjen G, Kennepohl E. Safety studies regarding a standardized extract of fermented wheat germ. *Int J Toxicol.* 2007 May-Jun;26(3):253-9.
106. Boros LG, Lapis K, Szende B, Tömösközi-Farkas R, Balogh A, Boren J, Marin S, Cascante M, Hidvégi M. Wheat germ extract decreases glucose uptake and RNA ribose formation but increases fatty acid synthesis in MIA pancreatic adenocarcinoma cells. *Pancreas.* 2001 Aug;23(2):141-7.
107. Patel S. Fermented wheat germ extract: a dietary supplement with anticancer efficacy. *NTM.* 2014;32(2):61-7.
108. Mueller T, Voigt W. Fermented wheat germ extract--nutritional supplement or anticancer drug? *Nutr J.* 2011 Sep 5;10:89.
109. Comin-Anduix B, Boros LG, Marin S, Boren J, Callol-Massot C, Centelles JJ, Torres JL, Agell N, Bassilian S, Cascante M. Fermented wheat germ extract inhibits glycolysis/pentose cycle enzymes and induces apoptosis through poly(ADP-ribose) polymerase activation in Jurkat T-cell leukemia tumor cells. *J Biol Chem.* 2002 Nov 29;277(48):46408-14.
110. Fajka-Boja R, Hidvégi M, Shoenfeld Y, Ion G, Demydenko D, Tömösközi-Farkas R, Vizler C, Telekes A, Resetar A, Monostori E. Fermented wheat germ extract induces apoptosis and downregulation of major histocompatibility complex class I proteins in tumor T and B cell lines. *Int J Oncol.* 2002 Mar;20(3):563-70.
111. Saiko P, Ozsvár-Kozma M, Madlener S, Bernhaus A, Lackner A, Grusch M, Horvath Z, Krupitza G, Jaeger W, Ammer K, Fritzer-Szekeres M, Szekeres T. Avemar, a nontoxic fermented wheat germ extract, induces apoptosis and inhibits ribonucleotide reductase in human HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Cancer Lett.* 2007 Jun 8;250(2):323-8.
112. Telekes A, Kiss-Tóth E, Nagy T, Qwarnstrom EE, Kúsz E, Polgár T, Resetar A, Dower SK, Duda E. Synergistic effect of Avemar on proinflammatory cytokine

- production and Ras-mediated cell activation. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Jun;1051:515-28.
113. Illmer C, Madlener S, Horvath Z, Saiko P, Losert A, Herbacek I, Grusch M, Krupitza G, Fritzer-Szekeres M, Szekeres T. Immunologic and biochemical effects of the fermented wheat germ extract Avemar. *Exp Biol Med (Maywood).* 2005 Feb;230(2):144-9.
  114. Kósa E, Jakab L, Nagy G. (2007). Effect of a prebioticum „IMMUNOVET-HBM™" on the health status and production of Hungarian turkey flocks. In: Hafez HM, editor. *Turkey Production: Current challenges.* Berlin: Mensch-Buch-Verlag; 2007. p. 174-82.
  115. Immunovet. Immunovet előnyök [Internet]. 2023 [cited 2023 July 15]. Available from <https://www.immunovet.hu>
  116. Kim MH, Jo SH, Ha KS, Song JH, Jang HD, Kwon YI. Antimicrobial activities of 1,4-benzoquinones and wheat germ extract. *J Microbiol Biotechnol.* 2010 Aug;20(8):1204-9.
  117. Rizzello CG, Nionelli L, Coda R, De Angelis M, Gobbetti M. Effect of sourdough fermentation on stabilisation, and chemical and nutritional characteristics of wheat germ. *Food Chem.* 2010 Apr 1;119(3):1079-89.
  118. Rizzello CG, Cassone A, Coda R, Gobbetti M. Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an ingredient for bread making. *Food Chem.* 2011 Aug;127(3):952-9.
  119. Yusuf OK, Bewaji CO, Ekanem JT. Biochemical evaluation of fermented wheat germ extract on *Trypanosoma brucei*-infected rats. *Afr J Biomed Res.* 2010; 13(3), 219-224.
  120. Stercz B, Nagy K, Pistello M, Ongrádi J. A fermented wheat germ extract (Avemar) inhibits the feline immunodeficiency virus and the feline adenovirus. 11th Feline Retrovirus Research Symposium. 2012; 26-28 August, Leipzig, Germany.

121. Zhurakivska K, Troiano G, Caponio V, Dioguardi M, Arena C, Lo Muzio L. The Effects of Adjuvant Fermented Wheat Germ Extract on Cancer Cell Lines: A Systematic Review. *Nutrients*. 2018 Oct 19;10(10):1546.
122. Dhingra A, Hage E, Ganzenmueller T, Böttcher S, Hofmann J, Hamprecht K, Obermeier P, Rath B, Hausmann F, Dobner T, Heim A. Molecular Evolution of Human Adenovirus (HAdV) Species C. *Sci Rep*. 2019 Jan 31;9(1):1039.
123. Dehghan S, Seto J, Liu EB, Walsh MP, Dyer DW, Chodosh J, Seto D. Computational analysis of four human adenovirus type 4 genomes reveals molecular evolution through two interspecies recombination events. *Virology*. 2013 Sep 1;443(2):197-207.
124. Watanabe M, Nishikawaji Y, Kawakami H, Kosai K. Adenovirus Biology, Recombinant Adenovirus, and Adenovirus Usage in Gene Therapy. *Viruses*. 2021 Dec 14;13(12):2502.
125. Barry MA, Rubin JD, Lu SC. Retargeting adenoviruses for therapeutic applications and vaccines. *FEBS Lett*. 2020 Jun;594(12):1918-1946.
126. Syyam A, Nawaz A, Ijaz A, Sajjad U, Fazil A, Irfan S, Muzaffar A, Shahid M, Idrees M, Malik K, Afzal S. Adenovirus vector system: construction, history and therapeutic applications. *Biotechniques*. 2022 Dec;73(6):297-305.
127. Horváth JCS, Ongrádi J, Tarcsai KR, Sinkovics JG. Onkolitikus vírusterápia. In: Ongrádi J, Tordai A, editor. *Orvosi biotechnológia*. Budapest: Semmelweis Kiadó; 2022. p. 129-44.
128. Stercz B, Perlstadt H, Nagy K, Ongrádi J. Immunochemistry of adenoviruses: Limitations and new horizons of gene therapy. *Acta microbial Immunol. Hung*. 2013 Dec;60(4):447-59.
129. Nacsa J, Barabás É, Tarcsai KR, Ongrádi J. Géntechnológiával előállított vakcinák. In: Ongrádi J, Tordai A. editor. *Orvosi biotechnológia*. Budapest: Semmelweis Kiadó; 2022; p.129-44.
130. Tregoning JS, Brown ES, Cheeseman HM, Flight KE, Higham SL, Lemm NM, Pierce BF, Stirling DC, Wang Z, Pollock KM. Vaccines for COVID-19. *Clin Exp Immunol*. 2020 Nov;202(2):162-192.

131. Wold W, Toth K. Adenovirus Vectors for Gene Therapy, Vaccination and Cancer Gene Therapy. *CGT*. 2014 Jan 31;13(6):421-33.
132. Weaver EA, Nehete PN, Buchl SS, Senac JS, Palmer D, Ng P, Sastry KJ, Barry MA. Comparison of replication-competent, first generation, and helper-dependent adenoviral vaccines. *PLoS One*. 2009;4(3):e5059.
133. Barry M. Single-cycle adenovirus vectors in the current vaccine landscape. *Expert Rev Vaccines*. 2018 Feb;17(2):163-173.
134. Hemmi S, Spindler KR. Murine adenoviruses: tools for studying adenovirus pathogenesis in a natural host. *FEBS Lett*. 2019 Dec;593(24):3649-59.
135. Wold WSM, Tollefson AE, Ying B, Spencer JF, Toth K. Drug development against human adenoviruses and its advancement by Syrian hamster models. *FEMS Microbiol Rev*. 2019 Jul 1;43(4):380-8.
136. Teixeira BM, Taniwaki SA, Menezes PMM, Rodrigues AKPP, Mouta AN, Arcebispo TLM, Braz GF, da Cruz JCM, Brandão PE, Heinemann MB, Silva MX, Hosie MJ. Feline immunodeficiency virus in Northern Ceará, Brazil. *JFMS Open Rep*. 2019 Jul 8;5(2):2055116919859112.
137. de Mello LS, Ribeiro PR, de Almeida BA, Bandinelli MB, Sonne L, Driemeier D, Pavarini SP. Diseases associated with feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection: A retrospective study of 1470 necropsied cats (2010-2020). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2023 Apr;95:101963.
138. Miller C, Abdo Z, Ericsson A, Elder J, VandeWoude S. Applications of the FIV Model to Study HIV Pathogenesis. *Viruses*. 2018 Apr 20;10(4):206.
139. Ongrádi J, Stercz B, Kövesdi V, Nagy K, Mauro P. (2013). Interaction of FIV with heterologous microbes in the feline AIDS model. In: Saxena SK, editor. *Current perspectives in HIV infection*. Rijeka: InTech; 2013. p. 447-69.
140. Elder JH, Lin YC, Fink E, Grant CK. Feline immunodeficiency virus (FIV) as a model for study of lentivirus infections: parallels with HIV. *Curr HIV Res*. 2010 Jan;8(1):73-80.

141. Lakatos B, Farkas J, Adám E, Dobay O, Jeney C, Nász I, Ongrádi J. Serological evidence of adenovirus infection in cats. *Arch Virol.* 2000;145(5):1029-33.
142. Lakatos B, Farkas J, Egberink HF, Vennema H, Horzinek MC, Benkó M. Detection of adenovirus hexon sequence in a cat by polymerase chain reaction (short communication). *Acta Vet Hung.* 1999;47(4):493-7.
143. Ongrádi J. Identification of a feline adenovirus isolate that replicates in monkey and human cells in vitro. *Am J Vet Res.* 1999 Dec;60(12):1463.
144. Ongrádi J, Chatlynne LG, Tarcsai KR, Stercz B, Lakatos B, Pring-Åkerblom P, Gooss D Sr, Nagy K, Ablashi DV. Adenovirus Isolated From a Cat Is Related to Human Adenovirus 1. *Front Microbiol.* 2019 Jun 25;10:1430.
145. Lauer KP, Llorente I, Blair E, Seto J, Krasnov V, Purkayastha A, Ditty SE, Hadfield TL, Buck C, Tibbetts C, Seto D. Natural variation among human adenoviruses: genome sequence and annotation of human adenovirus serotype 1. *J Gen Virol.* 2004 Sep;85(Pt 9):2615-2625.
146. Lucey BP, Nelson-Rees WA, Hutchins GM. Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination. *Arch Pathol Lab Med.* 2009 Sep 1;133(9):1463-7.
147. Tozzini F, Matteucci D, Bandecchi P, Baldinotti F, Poli A, Pistello M, Siebelink KH, Ceccherini-Nelli L, Bendinelli M. Simple in vitro methods for titrating feline immunodeficiency virus (FIV) and FIV neutralizing antibodies. *J Virol Methods.* 1992 Jun;37(3):241-52.
148. Xie L, Miao J, Li X, Yi X, Chu J. Regulation of the pyruvate metabolism node by monogene and polygene engineering of HEK-293 cells. *RSC Adv.* 2019 Nov 7;9(61):35760-35770.
149. Matteucci D, Mazzetti P, Baldinotti F, Zaccaro L, Bendinelli M. The feline lymphoid cell line MBM and its use for feline immunodeficiency virus isolation and quantitation. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995 May;46(1-2):71-82.
150. Yamamoto JK, Ackley CD, Zochlinski H, Louie H, Pembroke E, Torten M, Hansen H, Munn R, Okuda T. Development of IL-2-independent feline lymphoid cell lines chronically infected with feline immunodeficiency virus: importance for diagnostic reagents and vaccines. *Intervirology.* 1991;32(6):361-75.

151. Strobel B, Miller FD, Rist W, Lamla T. Comparative Analysis of Cesium Chloride- and Iodixanol-Based Purification of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors for Preclinical Applications. *Hum Gene Ther Methods*. 2015 Aug;26(4):147-57.
152. Adrian T, Sassinek J, Wigand R. Genome type analysis of 480 isolates of adenovirus types 1, 2, and 5. *Arch Virol*. 1990;112(3-4):235-48.
153. Pring-Akerblom P, Trijssenaar FE, Adrian T, Hoyer H. Multiplex polymerase chain reaction for subgenus-specific detection of human adenoviruses in clinical samples. *J Med Virol*. 1999 May;58(1):87-92.
154. Gray GC, Erdman DD. Adenovirus Vaccines. *Plotkin's Vaccines*. 2018:121–133.e8.
155. Yang J, Wu U, Tai H, Sheng W. Effectiveness of an ultraviolet-C disinfection system for reduction of healthcare-associated pathogens. *J Microbiol Immunol Infect*. 2019 Jun;52(3):487-93.
156. Reed L, Muench H. A Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Endpoints. *Am J Epidemiol*. 1938 May;27(3):493-7.
157. Saraiva M, Vieira P, O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med*. 2020 Jan 6;217(1):e20190418.
158. Mirzaei H, Faghihloo E. Viruses as key modulators of the TGF- $\beta$  pathway; a double-edged sword involved in cancer. *Rev Med Virol*. 2018 Mar;28(2):e1967.
159. Cassir N, Hraiech S, Nougairède A, Zandotti C, Fournier PE, Papazian L. Outbreak of adenovirus type 1 severe pneumonia in a French intensive care unit, September-October 2012. *Euro Surveill*. 2014 Oct 2;19(39):20914.
160. Adhikary AK, Banik U, Numaga J, Suzuki E, Inada T, Okabe N. Heterogeneity of the fibre sequence in subgenus C adenoviruses. *J Clin Pathol*. 2004 Jun;57(6):612-7.
161. Adhikary AK, Inada T, Banik U, Numaga J, Okabe N. Identification of subgenus C adenoviruses by fiber-based multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2004 Feb;42(2):670-3.



162. Rivaille P, Mao N, Zhu Z, Xu W. Recombination analysis of Human mastadenovirus C whole genomes. *Sci Rep*. 2019 Feb 18;9(1):2182.
163. Alhashimi M, Elkashif A, Sayedahmed EE, Mittal SK. Nonhuman Adenoviral Vector-Based Platforms and Their Utility in Designing Next Generation of Vaccines for Infectious Diseases. *Viruses*. 2021 Jul 29;13(8):1493.
164. Maheshwari G, Jannat R, McCormick L, Hsu D. Thermal inactivation of adenovirus type 5. *J Virol Methods*. 2004 Jun;118(2):141-6.
165. Béládi I, Mucsi I, Bakay M, Pusztai R. Rescue of heat-inactivated adenovirus type 1 and 6 by ultraviolet-irradiated adenovirus type 8. *J Gen Virol*. 1970;7(2):153-8.
166. Rafajko RR, Young JC. Thermal and pH Stability of Adenovirus Types 12, 14 and 18. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1964 Jul 1;116(3):683-5.
167. Estes MK, Butel JS. Characterization of a temperature-sensitive mutant of human adenovirus type 7. *J Virol*. 1977 Mar;21(3):1159-69.
168. Russell WC, Pereira HG, Valentine RC. The Effect of Heat on the Anatomy of the Adenovirus. *J Gen Virol*. 1967 Oct 1;1(4):509-22.
169. Ginsberg HS. Characteristics of the New Respiratory Viruses (Adenoviruses) II. Stability to Temperature and pH Alterations. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1956 Oct 1;93(1):48-52.
170. Rexroad J, Martin TT, McNeilly D, Godwin S, Russell Middaugh C. Thermal Stability of Adenovirus type 2 as a Function of pH. *J Pharm Sci*. 2006 Jul;95(7):1469-79.
171. Gerba CP, Gramos DM, Nwachuku N. Comparative Inactivation of Enteroviruses and Adenovirus 2 by UV Light. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Oct;68(10):5167-9.
172. Eischeid AC, Meyer JN, Linden KG. UV disinfection of adenoviruses: molecular indications of DNA damage efficiency. *Appl Environ Microbiol*. 2009 Jan;75(1):23-8.
173. Baxter CS, Hofmann R, Templeton MR, Brown M, Andrews RC. Inactivation of Adenovirus Types 2, 5, and 41 in Drinking Water by UV Light, Free Chlorine,

- and Monochloramine [Internet]. Vol. 133, J Environ Eng.American Society of Civil Engineers (ASCE); 2007. p. 95–103.
174. Lee J, Shin G. Inactivation of human adenovirus by sequential disinfection with an alternative UV technology and free chlorine. *J Water Health*. 2011 Mar 1;9(1):53-8.
  175. Schijven J, Teunis P, Suylen T, Ketelaars H, Hornstra L, Rutjes S. QMRA of adenovirus in drinking water at a drinking water treatment plant using UV and chlorine dioxide disinfection. *Water Res*. 2019 Jul;158:34-45.
  176. Nwachuku N, Gerba CP, Oswald A, Mashadi FD. Comparative Inactivation of Adenovirus Serotypes by UV Light Disinfection. *Appl Environ Microbiol*. 2005 Sep;71(9):5633-6.
  177. Rexroad J, Wiethoff CM, Green AP, Kierstead TD, Scott MO, Middaugh C. Structural Stability of Adenovirus Type 5. *J Pharm Sci*. 2003 Mar;92(3):665-78.
  178. Magri ME, Fidjeland J, Jönsson H, Albiñ A, Vinnerås B. Inactivation of adenovirus, reovirus and bacteriophages in fecal sludge by pH and ammonia. *Sci Total Environ*. 2015 Jul;520:213-21.
  179. Nascimento, M. A., Magri, M. E., Schissi, C. D., & Barardi, C. R. (2015). Recombinant adenovirus as a model to evaluate the efficiency of free chlorine disinfection in filtered water samples. *Virology Journal*, 12, 30. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0259-7>
  180. Clarke NA, Kabler PW, Stevenson RE. The inactivation of purified type 3 adenovirus in water by chlorine. *Am J Hyg*. 1956 Nov;64(3):314-9.
  181. Page MA, Shisler JL, Mariñas BJ. Kinetics of adenovirus type 2 inactivation with free chlorine. *Water Res*. 2009 Jun;43(11):2916-26.
  182. Girones R, Carratalà A, Calgua B, Calvo M, Rodriguez-Manzano J, Emerson S. Chlorine inactivation of hepatitis E virus and human adenovirus 2 in water. *J Water Health*. 2014 Sep 1;12(3):436-42.

183. Cromeans TL, Kahler AM, Hill VR. Inactivation of adenoviruses, enteroviruses, and murine norovirus in water by free chlorine and monochloramine. *Appl Environ Microbiol.* 2010 Feb;76(4):1028-33.
184. Thurston-Enriquez JA, Haas CN, Jacangelo J, Gerba CP. Chlorine Inactivation of Adenovirus Type 40 and Feline Calicivirus. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Jul;69(7):3979-85.
185. Rutala WA, Peacock JE, Gergen MF, Sobsey MD, Weber DJ. Efficacy of Hospital Germicides against Adenovirus 8, a Common Cause of Epidemic Keratoconjunctivitis in Health Care Facilities. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Apr;50(4):1419-24.
186. Kampf G. Efficacy of ethanol against viruses in hand disinfection. *J Hosp Infect.* 2018 Apr;98(4):331-8.
187. Hooton JG, Yates KA, Romanowski EG, Kowalski RP. Virucidal Activity of Hand Sanitizer against Ocular Isolates of Adenovirus. *Int J Ophthal Vision Res.* 2018;2(1): 011-013.
188. Stock R, Harste G, Madisch I, Heim A. A rapid quantitative PCR-based assay for testing antiviral agents against human adenoviruses demonstrates type specific differences in ribavirin activity. *Antiviral Res.* 2006 Oct;72(1):34-41.
189. Morfin F, Dupuis-Girod S, Frobert E, Mundweiler S, Carrington D, Sedlacek P, Bierings M, Cetkovsky P, Kroes AC, van Tol MJ, Thouvenot D. Differential susceptibility of adenovirus clinical isolates to cidofovir and ribavirin is not related to species alone. *Antivir Ther.* 2009;14(1):55-61.
190. Lenaerts L, Naesens L. Antiviral therapy for adenovirus infections. *Antiviral Res.* 2006 Sep;71(2-3):172-80.
191. de Oliveira CB, Stevenson D, LaBree L, McDonnell PJ, Trousdale MD. Evaluation of Cidofovir (HPMPC, GS-504) against adenovirus type 5 infection in vitro and in a New Zealand rabbit ocular model. *Antiviral Res.* 1996 Jul;31(3):165-72.

192. Hartline CB, Gustin KM, Wan WB, Ciesla SL, Beadle JR, Hostetler KY, Kern ER. Ether lipid-ester prodrugs of acyclic nucleoside phosphonates: activity against adenovirus replication in vitro. *J Infect Dis.* 2005 Feb 1;191(3):396-9.
193. Gainotti R, Ricarte C, Ebekian B, Videla C, Carballal G, Damonte EB, Echavarría M. Real time PCR for rapid determination of susceptibility of adenovirus to antiviral drugs. *J Virol Methods.* 2010 Mar;164(1-2):30-4.
194. Howley PM, Münger K, Werness BA, Phelps WC, Schlegel R. Molecular mechanisms of transformation by the human papillomaviruses. *Princess Takamatsu Symp.* 1989;20:199-206.
195. Tan S, G.E. de Vries E, G.J. van der Zee A, de Jong S. Anticancer Drugs Aimed at E6 and E7 Activity in HPV-Positive Cervical Cancer. *CCDT.* 2012 Feb 1;12(2):170-84.
196. Nemzeti Népegészségügyi Központ. HIV/AIDS – MAGYARORSZÁG, 2022. december 31. A regisztrált HIV-fertőzött személyek nemenkénti megoszlása a verifikálás éve szerint [Internet]. 2023 [cited 2023 July 17]. Available from [https://www.antsz.hu/felso\\_menu/temaink/jarvany/hivaid/HIV\\_adatok/HIV\\_2022\\_eves](https://www.antsz.hu/felso_menu/temaink/jarvany/hivaid/HIV_adatok/HIV_2022_eves)
197. World Health Organization. HIV [Internet]. 2021 [cited 2023 July 15] Available from <https://www.who.int/data/gho/data/themes/hiv-aids>
198. Dionne B. Key Principles of Antiretroviral Pharmacology. *Infect Dis Clin North Am.* 2019 Sep;33(3):787-805.
199. Horne R, Chapman S, Glendinning E, Date HL, Guitart J, Cooper V. Mind Matters: Treatment Concerns Predict the Emergence of Antiretroviral Therapy Side Effects in People with HIV. *AIDS Behav.* 2019 Feb;23(2):489-98.
200. Tarcsai KR, Kövesdi V, Pistello M, Corolciuc O, Ongrádi J. (2021). Studies on MBM cells as a model for acute feline immunodeficiency virus. *Acta microbial Immunol. Hung.* 68(Suppl. 1.): 43.
201. Pak AJ, Gupta M, Yeager M, Voth GA. Inositol Hexakisphosphate (IP6) Accelerates Immature HIV-1 Gag Protein Assembly toward Kinetically Trapped Morphologies. *J Am Chem Soc.* 2022 Jun 15;144(23):10417-28.

202. Wang X, Wong K, Ouyang W, Rutz S. Targeting IL-10 Family Cytokines for the Treatment of Human Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2019 Feb;11(2):a028548.
203. Kong G, Chen Y, Liu Z, Wang Y, Li H, Guo C. Adenovirus-IL-10 relieves chronic rejection after mouse heart transplantation by inhibiting miR-155 and activating SOCS5. *Int J Med Sci.* 2023;20(2):172-85.
204. Dickinson M, Kliszczak AE, Giannoulatou E, Peppas D, Pellegrino P, Williams I, Drakesmith H, Borrow P. Dynamics of Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$  Superfamily Cytokine Induction During HIV-1 Infection Are Distinct From Other Innate Cytokines. *Front Immunol.* 2020 Nov 24;11:596841.
205. Phan TG, Shimizu H, Nishimura S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Human adenovirus type 1 related to feline adenovirus: evidence of interspecies transmission. *Clin Lab.* 2006;52(9-10):515-8.
206. Luiz LN, Leite JP, Yokosawa J, Carneiro BM, Pereira Filho E, Oliveira TF, Freitas GR, Costa LF, Paula NT, Silveira HL, Nepomuceno JC, Queiróz DA. Molecular characterization of adenoviruses from children presenting with acute respiratory disease in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil, and detection of an isolate genetically related to feline adenovirus. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010 Aug;105(5):712-6.
207. Tarcsai KR, Corolciuc O, Kapran I, Kövesdi V, Stercz B, Ongrádi, J. The first feline adenovirus isolate is related to human adenovirus 1. *FEMS Online Conference on Microbiology.* 2020; 28-31 October, Belgrade, Serbia.

## **10. Saját publikációk jegyzéke**

### **10. 1. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények listája:**

1. Ongrádi J, Chatlynne LG, Tarcsai KR, Stercz B, Lakatos B, Pring-Åkerblom P, Gooss D Sr, Nagy K, Ablashi DV. Adenovirus Isolated From a Cat Is Related to Human Adenovirus 1. *Front Microbiol.* 2019 Jun 25;10:1430. **IF: 4,236**

2. Tarcsai KR, Kapran I, Hidvégi M, Stercz B, Nagy K, Ongrádi J. (2020). Fermentált búzacsíra-kivonat(Avemar) antivirális hatásának vizsgálata macska AIDS modellben. *Magy. állatorv. L.* 2020;142(12), 731-741. **IF: 0,220**

3. Tarcsai KR, Hidvégi M, Corolciuc O, Nagy K, Abbas AA, Ablashi DV, Kövesdi V, Ongrádi J. The effects of Avemar treatment on feline immunodeficiency virus infected cell cultures. *Vet Med Sci.* 2023 Jul;9(4):1446-55. **IF: 1,7**

### **10. 2. Egyéb, nem az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények listája:**

1. Nagy A, Nagy O, Tarcsai K, Farkas Á, Takács M. First detection of tick-borne encephalitis virus RNA in clinical specimens of acutely ill patients in Hungary. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018 Mar;9(3):485-489. **IF: 3,055**

## 11. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Ongrádi Józsefnek, hogy lehetőséget adott arra, hogy a munkacsoportjában dolgozhassak és biztosította kutatásaim anyagi és infrastrukturális feltételeit. Hálás vagyok, hogy az évek során végig bíztatott, segítette és támogatta munkámat, szakmai tanácsaival pedig irányt mutatott a kutatások megtervezésében, kivitelezésében és kiértékelésében.

Köszönet illeti Dr. Nagy Károly professzort, aki módszertani ismereteivel és segítségével hozzájárult kísérleteim kivitelezéséhez, továbbá köszönöm, hogy publikációink kéziratát, valamint a tudományos konferenciákra szánt előadások anyagát mindig alaposan és kritikusan átnézte.

Köszönöm Stercz Balázs tanársegédnek, hogy gyakorlati tanácsaival segítette a laboratóriumi munkafolyamatok alapjainak elsajátításában, valamint, hogy elkészítette az FL-4 sejtekről készült fénymikroszkópos képeket. Köszönettel tartozom továbbá Kövesdi Ferencné asszisztensnek, hogy technikai és adminisztratív közreműködéssel segítette kutatásaimat.

Köszönöm Prof. Dr. Szabó Dórának, az Orvosi Mikrobiológiai Intézet igazgatójának, hogy engedélyt adott munkám elvégzésére az Intézetben. Hálás vagyok továbbá az Orvosi Mikrobiológiai Intézet minden munkatársának, akik kutatási és oktatási tevékenységeim során elősegítették szakmai fejlődésemet.

Köszönöm, hogy a Semmelweis Egyetem Patológiai Doktori Iskola hallgatójaként végezhettem tanulmányaimat.

Köszönettel tartozom Hidvégi Máténak a szakmai együttműködésért, hogy biztosította számunkra a kísérletekben felhasznált, Biopharma Kft. által gyártott Avemar pulvist, valamint a közös publikációk minőségének javításáért és hasznos tanácsaiért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönetet szeretnék mondani szüleimnek, hálás vagyok, hogy gondoskodásukkal, áldozathozatalukkal és támogatásukkal lehetővé tették, hogy időmet és energiámat a munkámra fordíthassam.