

Szent István Egyetem, Állatorvos- tudományi Kar

A prebiotikumok hatása a bél-agy tengely működésére: mikrobiális, magatartási és hormonális változások

Kővári Dóra

Témavezetők: Dr. Kovács Krisztina

MTA Kísérleti Orvostudományi Kutató Intézet, tudományos tanácsadó

Dr. Ferenczi Szilamér

MTA Kísérleti Orvostudományi Kutató Intézet, tudományos főmunkatárs

Belső Konzulens: Dr. Szabó Péter

SZIE Állatorvos-tudományi Kar,
Ökológiai Tanszék

Budapest, 2015

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	3
2. Irodalmi áttekintés.....	4
2.1. A stressz.....	4
2.2. A bél-agy tengely.....	5
2.3. A bélflóra.....	6
2.4. A pro- és prebiotikumok.....	9
3. Célkitűzések.....	11
4. Anyag és módszer.....	12
4.1. Kísérleti állatok.....	12
4.2. Prebiotikum kezelés.....	13
4.3. Krónikus variábilis stressz.....	13
4.3.1. Stresszorok.....	13
4.4. Kezelési csoportok.....	16
4.5. Viselkedés tesztek.....	16
4.6. Kortikoszteron mérés.....	17
4.7. Bélszövet metszetek.....	17
4.8. Bélfóra összetétel.....	18
4.9. CRH mRNS expresszió mérése colon szövetben és hypothalamusban.....	20
4.10. Statisztikai kiértékelés.....	21
5. Eredmények.....	22
5.1. Viselkedés tesztek.....	22
5.1.1. Open Field.....	22
5.1.2. Emelt keresztpalló teszt.....	24
5.2. Kortikoszteron.....	25
5.3. Bélszövet - nyálkahártya vastagság.....	26
5.4. Bélfóra összetétel.....	27
5.4.1. Bélfóra összetétel a colonban.....	27
5.4.2. Bélfóra összetétel a coecumban.....	30
5.5. CRH mRNS expresszió.....	31
6. Megvitatás.....	32

7. Összefoglalás.....	37
8. Summary.....	38
9. Irodalomjegyzék.....	39
10. Köszönetnyilvánítás.....	44

1. Bevezetés

A humán gasztrointesztinális traktusban hozzávetőlegesen 10^{13} - 10^{14} darab mikroorganizmus található, ami körülbelül 10-szer több, mint az emberi test sejtjeinek száma [1]. A legnagyobb mennyiségben a Bacteroides és Firmicutes taxonok vannak jelen, míg a Proteobacteria, Verrucomicrobia, Actinobacteria és Fusobacteria baktériumok száma kevesebb [2].

Az már korábban bebizonyosodott, hogy az agy és a bél között kétirányú kommunikáció zajlik. A bélbaktériumok képesek befolyásolni az autonóm- és neuroendokrin funkciókat, valamint az immunrendszer működését, míg a stressz, illetve a stresszel-kapcsolatos pszichiátriai betegségek hatására megváltozik a bélflóra összetétele, a bél motilitása és permeabilitása, ez utóbbi pedig lehetővé teszi a patogének transzlokációját [1, 3]. A patogének, vagy sejtfaalkomponenseik a bélből kikerülve lokális és globális gyulladásokat idéznek elő, mivel fokozzák a proinflammatorikus citokinek fokozott felszabadulását [4].

Megfigyelték, hogy a citokineknek fontos szerepe van egyes pszichés betegségekben, mint például a szorongás és a depresszió patofiziológiájában [5]. A gyulladással kapcsolatos citokinek hatására fokozódik a hypothalamus-hipofízis-mellékvese (HPA) tengely aktivációja, ami befolyásolja a bél és a bélflóra működését, tehát a körfolyamat tovább erősödik [6].

A bél nem patogén, kommenzalista baktériumai, vagy a probiotikumok képesek csökkenteni a stressz okozta negatív hatásokat azáltal, hogy növelik a bél barrier funkcióját, ezáltal a permeabilitás redukálódik, továbbá csökkentik a patogén baktériumok szaporodását és kötődését a bél epitéliumához, illetve immunmodulációs hatásuk is van [7].

A bélben, illetve a bélflórában bekövetkező változások helyreállítása a későbbiekben potenciális terápiás irány lehet egyes stresszel kapcsolatos betegségek kiegészítő kezelésében.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A stressz:

Manapság sokat hallunk a stresszről és az általa okozott számos betegségről. Rohanó életünk során egyre több stresszhatás ér minket, mely a nyugati kultúrákban fokozódik leginkább, emiatt pedig egyre nő a stresszel kapcsolatos pszichés- illetve egyéb, alkalmazkodási betegségek előfordulása.

Selye János volt az első, aki megfogalmazta, hogy mi is a stressz. Definíciója szerint a stressz a homeosztázis felborulása, a test nem specifikus válasza a testet ért igénybevételekre [8]. Stresszornak nevezte a stresszt okozó faktorokat, melyek változatosak lehetnek, azonban ugyanolyan biológiai stressz válaszokat, fiziológiás változásokat idéznek elő a szervezetben [9].

A stressz széleskörű hatással van a szervezet működésének számos folyamatára: befolyásolja a viselkedést, az immunrendszer működését, a kardiovaszkuláris válaszokat és a gasztrointesztinális traktus működését. Ezek mellett hat a központi idegrendszer működésére is, ami által képes modulálni többek között a szteroid-, katekolamin-, peptid- és opioid rendszerek aktivitását is. A szervezet stresszre adott válaszreakciója során a hypothalamus-hipofízis-mellékvese tengely szintjén beindul egy neurohumorális kaszkád, ami a stressz által felborított homeosztázis normalizálásának irányába hat, illetve elősegíti az adaptációt és a stresszel való megbirkózást [8].

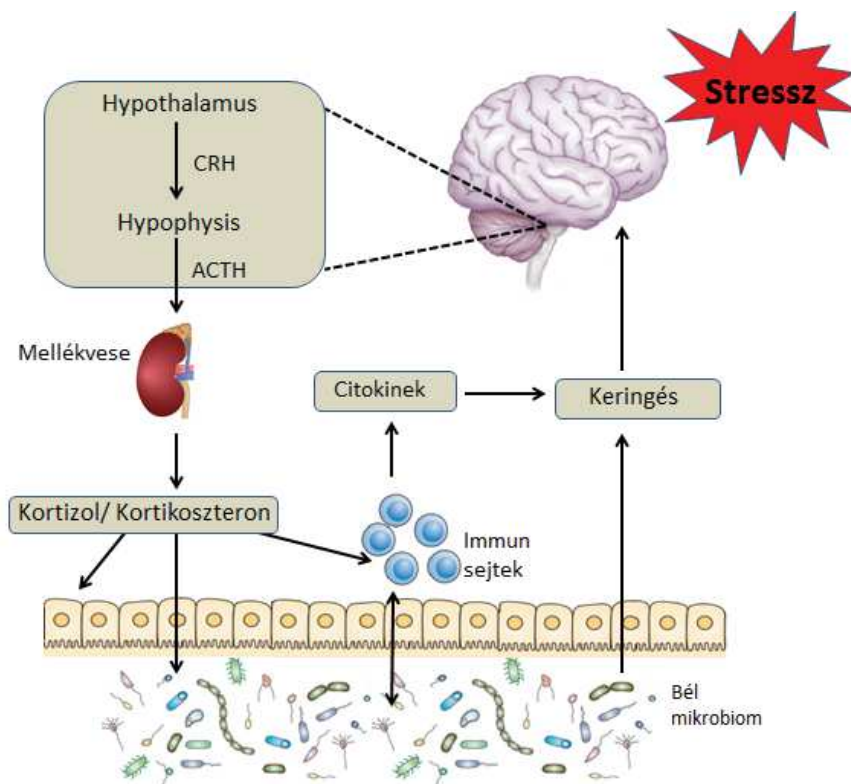
A fokozott stressz eredményeként kialakulhatnak mentális problémák/betegségek, mint például a szorongás és a depresszió. Rágcsálókban a depresszív állapotra jellemzőek a kognitív és küzdelmi hiányosságok, az alacsony explorációs motiváció, a cirkadián ritmus- illetve az alvás zavarai, agresszió, szorongás, illetve a szociális interakciók kerülése [10].

A depresszió úgy is jellemezhető, mint egy krónikus gyulladással szindróma neuropszichiátriai megnyilvánulása [11]. Megfigyelték, hogy emberekben akut- és krónikus stressz hatására is növekszik a proinflammatorikus citokinek mennyisége - melyek gyulladások kialakulását eredményezik - míg csökken az úgynevezett antiinflammatorikus citokineké, melyek a gyulladásokat csökkentik [12; 13]. Ezek a gyulladások gyakran a bélrendszerből indulnak ki, mivel stressz hatására megváltozik a bél-agy tengely működése, ennek hatására felborul a bélflóra összetétele, illetve a bélnyálkahártya is károsodhat, ami különböző betegségekhez, többek között IBS-hez (Irritábilis Bél Szindrómához) és IBD-hez (Gyulladással Bél Betegséghez) vezethetnek [7, 14]. Az előbb felsorolt tényezők normalizálása és ezáltal a gyulladás

megszüntetése/csökkentése lehetővé teheti egyes depressziós betegségek kiegészítő kezelését, mivel a jelenleg használatos antidepresszánsok csak az agyi ingerületátvivő anyagok diszfunkcióját hozzák helyre, azonban a kiváltó okokat nem kezelik [14].

2.2. A bél - agy tengely:

A bél és a központi idegrendszer között kétirányú kommunikáció zajlik, még hozzá az autonóm-, a neuroendokrin-, és az immunrendszeren keresztül. A bélflóra ezeken a rendszereken keresztül képes befolyásolni az agyműködést, illetve a viselkedést, míg a stresszes szituációk a központi idegrendszeren keresztül hatnak a gyomor-bél traktus motilitására, permeabilitására, az immunfunkciókra, illetve az itt jelenlevő speciális hormonok és egyéb mediátorok felszabadítására [3; 15]. A kapcsolatrendszert az 1. ábra foglalja össze. A stressz hatására lejátszódó folyamatok hátterében alapvetően a hypothalamus-hipofízis-mellékvese tengely fokozott aktivációja áll. Ennek során először a hypothalamus paraventricularis magjában (PVN) nő a Corticotropin Releasing Hormon (CRH) mRNS-ének expressziója, ez pedig a hipofízis portális keringésén keresztül bejut a hipofízis elülső lebenyébe, melynek hatására Adenocorticotroph hormon (ACTH) szabadul fel, mely a keringésén keresztül aktiválja a mellékvesekéreg glükokortikoid (emberben kortizol, rágcsálókban kortikoszteron) szintézisét. A glükokortikoidoknak alapvető szerepük van a stresszválaszban, ugyanis feladatuk az energiaforrások újrafelosztása, beleértve a homeosztázis helyreállítását, illetve a zavart okozó tényezővel szembeni ellenállást vagy szembenézést. A glükokortikoidok negatív visszacsatolással szabályozzák a szekréciójukat [16; 17]. Megfigyelték, hogy stressz hatására egyes agyterületeken csökkenhet a glükokortikoid receptorok (GR) mennyisége, ami által csökken a negatív visszacsatolás hatékonysága, így elnyújtott stresszválasz detektálható [18]. A glükokortikoidok és a stressz hatására felszabaduló katekolaminok számos módon hatnak a szervezetre: fokozzák a szív- és légzésfrekvenciát, illetve a glükóz mobilizációt és a glükoneogenezist. Ezek mellett növelik az egyes immunsejtek citokin termelését, képesek megváltoztatni a bélflóra normál összetételét, illetve fokozzák a bél permeabilitását. Ez utóbbi hatására felborul a kommenzalista baktérium flóra és a bélnyálkahártya közötti egyensúly, ami lehetővé teszi a patogének elszaporodását.



A bél megnövekedett permeabilitása miatt pedig ezek a patogének, vagy a sejtfal komponenseik kijutnak a szervezetbe, ahol az immunsejtekkel kapcsolatba lépve további gyulladásos citokinek felszabadulását eredményezik. Ezek a citokinek a keringésbe jutva képesek lokális és globális gyulladásokat előidézni az egész szervezetben, beleértve a központi idegrendszert is, melyet már megfigyeltek egyes depressziós betegségekben [4; 19]. Ezek a proinflammatorikus citokinek megannyi folyamatra hatnak, többek között a neurotranszmitter metabolizmusra és ezáltal az érzelmi funkciókra [5], a neuroendokrin működésre a HPA-tengely aktivitásának fokozásával [20], illetve a szinaptikus plaszticitásra és a viselkedésre is [6].

2.3. A bélflóra:

A humán bélrendszer körülbelül 10^{13} - 10^{14} baktériumot tartalmaz [1]. A bélflóra kialakulása komplex folyamat, a születésnél kezdődik, amikor az újszülött az anya mikrobiotájával először érintkezik, majd az egész élet során változik, fejlődik. A humán mikrobiom meglehetősen nagy egyéni variációt mutat, mivel az összetételt befolyásolja többek között a genetika, a kor, a környezet, a táplálkozás, illetve az egészségi állapot. A

bélflóra fontos szerepet játszik a tápanyagok hasznosításában, a bél barrier funkcióinak fenntartásában, illetve az immunrendszer megfelelő fejlődésében a stimuláció által [21]. A legnagyobb számban, körülbelül 75%-os arányban a Bacteroidetes, Firmicutes és Actinobacteria taxonok képviselői vannak jelen, míg kisebb számban a Proteobacteria, Verrucomicrobia, Fusobacteria és Cyanobacteria baktériumok [21; 22; 23]. A egér és a humán bélflóra között jelentős hasonlóság mutatkozik törzs és család szinten is, ezért az egerek alkalmas modellállatok az említett taxonómiai szinteken történő változások nyomon követésére és humán vonatkoztatásra [2; 24].

A bélmikrobiom és a központi idegrendszer közötti kommunikáció tanulmányozására manapság elterjedten alkalmaznak a kutatásokban úgynevezett Germ-free (GF, „csíramentes”) egereket, melyek nem rendelkeznek a normál, kommenzalista flórával. A GF egereket alkalmazó kísérletekből számos tanulság vonható le: például a HPA-tengely aktivitását vizsgálva kutatók azt találták, hogy GF egerekben stressz hatására fokozódik az ACTH és kortikoszteron, azaz a stresszhormonok felszabadulása a normál bélflórával rendelkező (SPF, „specifikus patogén mentes”) egerekhez képest, ez a változás pedig fiatal korban még normalizálható volt, miután *Bifidobacterium infantis* baktériumokat adagoltak a GF állatoknak [25].

Az IBS és az IBD - mint a stresszről szóló részben említettem – többek között a bélflóra összetételének negatív irányba történő változásának következményeként is kialakulhat, a patogének elszaporodásának a hatására. Ezen bélbetegségek esetén megfigyelték, hogy csökken a bélflóra diverzitása, illetve néhány kommenzalista (pl. *Bifidobacteria*) aránya [26], viszont nő a patogének, többek között az *Escherichia coli* [27], *Bacteroides* és *Gammaproteobacteria* száma [3]. A bélnyálkahártyának fontos szerepe van a bél baktériumai és a szervezet közötti kapcsolat fenntartásában, ugyanis a gasztrointesztinális traktusban a Toll-like receptorokon (TLR) keresztül szabályozzák a baktériumok a bél homeosztázisát, illetve a gyulladási válaszokat. Megfigyelték, hogy IBD-ben vagy IBS-ben szenvedő betegekben ezen receptorok expressziója különbözik az egészséges emberekéhez képest [28].

2.3.1. Fontosabb taxonok:

Bacteroides:

Az ide tartozó mikroorganizmusok anaerob, nem spóra-formáló, Gram-negatív pálcikák [29]. A humán bélben nagy számban fordulnak elő, az itt található anaerobok 25% a *Bacteroides*-ek közé tartozik [30]. Az ide tartozó fajok nagy része jelentős klinikai

patogén, melyek normál esetben a bélben jótékonyan hatnak, azonban kikerülve onnan a szervezetbe komoly megbetegedéseket képesek okozni. Érdekesség, hogy az anaerob patogén baktériumok közül a Bacteroides genus tagjainak a legmagasabb a rezisztenciája antibiotikumokkal szemben [29].

Firmicutes:

A Firmicutes taxon baktériumai Gram-pozitív, alacsony G+C tartalommal rendelkező mikroorganizmusok. Fontosabb osztályai a Clostridia, illetve a Bacilli, melyek közül az utóbbiba tartoznak a jótékony, tejsavtermelő Lactobacillusok is, melyek probiotikumként is ismertek [31]. A Lactobacillusok nem spórás coccusok, coccobacillusok vagy pálcikák. Három fő csoportjuk van, az obligát homofermentatív, a fakultatív homofermentatív és a heterofermentatív csoportok [32]. A jótékony hatásuk abban nyilvánul meg, hogy a tejsav termelésük által biztosítják a bélben a megfelelő pH-t, emellett antimikrobiális anyagokat is termelnek, melyekkel gátolják egyes patogének szaporodását.

A Firmicutes törzs Clostridia osztályban főként anaerob vagy aerotoleráns, spóráképző, pálcika alakú mikrobák vannak jelen, melyek közül számos humán patogénként viselkedik, ugyanis exotoxinokat bocsátanak ki. Alapesetben azonban a normál baktériumflóra gátolja a túlzott elszaporodásukat [33].

Actinobacteria:

Az Actinobacteria a Bacteria-n belül a legnagyobb törzs. Tagjaik Gram-pozitív, coccoid, pálcika-coccoid alakúak, vagy hifaszerűek. Jellemző rájuk, hogy az örökítőanyagukban magas a G+C tartalom. Tagjaik között nagy számban találunk patogéneket, azonban ide tartoznak a Bifidobacteriumok is, melyek a bél kommenzalistái [34]. A Bifidobacteriumokat általánosan használják probiotikumokként, mivel jótékonyan hatnak a bélműködésre azáltal is, hogy akadályozzák a patogének túlszaporodását. Jellemzően nem sporuláló, nem gázképző, anaerob fermentáló mikrobák a tagjai ennek taxonnak [35].

Proteobacteria:

A Proteobacteria törzs a legnagyobb és legdiverzebb divízió a prokarióták között. Tagjaik Gram-negatív, nem spóra-képző, pálcika alakú mikrobák. Öt nagy szubdivízióra osztható fel a törzs, még hozzá az Alfa, Béta, Gamma, Delta és Epsilon divíziókra. A

Gamma-proteobacteriák közé tartozik az *Escherichia coli*, ami a normál bélflórában megtalálható, azonban ha túlszaporodik és átjut a bélfalon keresztül a szervezetbe, megbetegedéseket képes okozni [36].

2.4. A pro- és prebiotikumok:

viselkedésre [42]. *Lactobacillus rhamnosus* hasonlóan képes csökkenteni a stressz indukálta kortikoszteron szintet, illetve a szorongásos- vagy depresszió-függő viselkedést egerekben [43], továbbá redukálja a gyulladásos folyamatokban részt vevő TNF- α és IL-8 szintjét is [44]. Ezekből az eredményekből jól látszik, hogy a probiotikumok sok esetben hatásosnak bizonyulnak, azonban kérdéses, hogy a bélben önállóan mennyire képesek elszaporodni és fennmaradni hosszabb távon. Erre a problémára adhatnak megoldást a prebiotikumok, melyek ezen jótékony bélbaktériumok szaporodását segítik elő lokálisan.

Újszülött korban a legalapvetőbb prebiotikum forrás az anyatej, ugyanis inulint és galaktooligoszacharidokat is tartalmaz, melyek mind a *Lactobacillus*ok, mind a *Bifidobacterium*ok szaporodását elősegítik [45]. A prebiotikumok jótékony hatását IBS-es betegekben szintén több vizsgálat is alátámasztotta: Paineau és mtsai. csökkent IBS-es tüneteket mutattak ki inulin-típusú fruktán prebiotikumok adagolásának hatására a placebót szedő csoporthoz képest [46], míg egy másik vizsgálatban, szintén IBS-es betegekben a galaktooligoszacharid prebiotikum képes volt növelni a jótékony *Bifidobacterium*ok számát [47, 48].

3. Célkitűzések

Az egyes pszichés betegségek és a gasztrointesztinális traktus komorbiditása még viszonylag új felfedezés, sok tényezője még feltárára vár. Egyre több vizsgálat irányul a probiotikumokra, melyek hatékonynak bizonyulnak a stressz hatására bekövetkező diszfunkciók helyreállításában, azonban a prebiotikumok hatásait ez idáig még kevésbé vizsgálták. Kevés olyan eredményt találunk a szakirodalomban a prebiotikumok komplex hatásáról, mely nem csak egy-egy baktérium taxon változásait tanulmányozza, hanem több csoportét, illetve egyéb fiziológiai változásokat is vizsgál a viselkedés mellett. A szakirodalomban főként galakto-oligoszacharid, frukto-oligoszacharid és inulin prebiotikumok hatását vizsgálták eddig, míg a mannooligoszacharid prebiotikumét eddig leginkább csak takarmányállatokon [49; 50] tanulmányozták, egereken és embereken nem. Kísérleteink során ezért a manno-oligoszacharid (MOS) prebiotikum hatását vizsgáltuk krónikus variábilis stressznek kitett egereken.

Munkám során a következő kérdésekre kerestem választ:

- 1. Hogyan változik a bélflóra összetétele krónikus variábilis stressz hatására?**
- 2. Hogyan változik a magatartás, illetve a stresszhormonok szintje krónikus stresszben?**
- 3. Hogyan befolyásolja a krónikus stressz okozta bélflóra-, magatartási- és hormonális válaszokat a manno-oligoszacharid prebiotikum?**

4. Anyag és Módszer

4.1. Kísérleti állatok

A kísérlet során az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutató Intézet SPF tenyészetéből származó C57/Bl6-os 7-8 hetes, hím egereket használtunk fel. A kísérletet 2014 nyarán végeztük. Az egereket a kezelések megkezdése előtt egyedileg jelöltük fül bevágással, illetve a farkukon alkoholos filctollal. Az állattartó szobákban 12D-12L megvilágítási ciklust alkalmaztunk, a nappali, fényes szakasz 07:00-tól kezdődött. A páratartalom és a hőmérséklet ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) állandó volt, víz és táp *ad libitum* az állatok rendelkezésére állt. A krónikus variábilis stressznek kitett egereket külön szobában tartottuk a kezelések alatt. Az állatokat nem izoláltuk, hanem 3-5 egyed tartózkodott egy ketrecben.

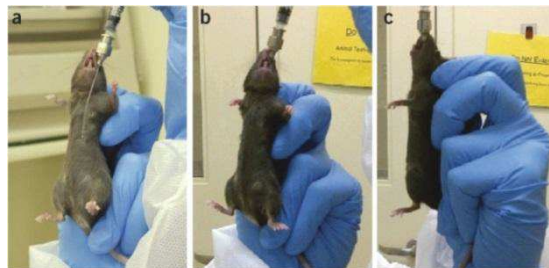


A C57/Bl6-os egértörzs manapság a legelterjedtebben használt törzs a világon [51]. Főként emocionális, lokomóciós, explorációs és kogníciós vizsgálatokban alkalmazzák őket [52]. A törzset 1921-ben tenyésztették ki a Bussey Institute for Research in Applied Biology intézményében [53]. A törzsre jellemző, hogy az állatok meglehetősen robusztusak, ingerlékenyek és érzékenyek a fájdalomra [51].

A kísérleteinkben alkalmazott beavatkozások összhangban vannak az Európai Unió (86/609) direktívájával és a magyar Állatvédelmi Törvénynek 1998/XXVIII. sz) megfelelően a kísérleti beavatkozásokat mind az intézeti, mind a területi hatóság (Fővárosi és Pest Megyei Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal, Élelmiszerlánc-Biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság, Járványügyi és Állatvédelmi Főosztálya) jóváhagyta (MÁB engedély: PE/001/29-4/2013).

4.2. Prebiotikum kezelés

A kezelésekhez élesztő sejtfal kivonatból származó manno-oligoszacharid prebiotikumot használtunk, mely szilárd formában elérhető. A kezeléseink során 500 mg/testtömeg kg-os dózist alkalmaztunk, ennek során 50 mg/ml-es szuszpenziót készítettünk vízzel, melyből a kezelt állatok 100 µl-t kaptak 10 testtömeg grammonként naponta, gyomorszondával adagolva.



A prebiotikum szuszpenziót két napig használtuk fel és végig hűtőben tároltuk, használat előtt közvetlenül mindig felrázva.

4.3. Krónikus variábilis stressz (CVS)

A krónikus stressz során egy hosszabb időtartamon át (pl: hetek) tesszük ki valamilyen stresszornak minden nap a kísérleti állatokat [8]. Alapvetően egy hosszabb ideig alkalmazott, egy féle stresszor adaptációhoz vagy habituációhoz vezethet [54]. Ezért kísérletünkben a stressz rezisztenciát vagy habituációt elkerülendő, krónikus variábilis stressz modellt alkalmaztunk, amely hosszabb időn keresztül, változatos stresszelési formákat foglal magában [11]. Az első krónikus stressz paradigma az irodalomban széles körűen elterjedt modell, melynek alapjait Katz és kollégái fektették le [55].

Vizsgálatunkban a stressz kezelése során a megfelelő csoportokon krónikus variábilis stresszt (CVS) alkalmaztunk, 3 héten keresztül, naponta kétszer. A CVS beosztás az 1. táblázatban található.

4.3.1. Stresszorok

Footshock: A rágcsálók meglehetősen érzékenyek az enyhe sokkolásra, mely után jelentős stresszválasz detektálható. Ennél a stresszornál az állatot egy műanyag kamrába helyezzük, aminek az aljzata fémrács, melyhez egy sokk generátor csatlakozik [56]. A kezelés 12 percig tartott, melynek során 20 másodpercenként 0,5 mA erősségű sokkot alkalmaztunk.

Szociális alárendeltség (Social defeat): Az egerekre jellemzőek a szociális interakciók, melyek agresszivitás formájában is megjelenhetnek. A szociális alárendeltség általános velejárója ezeknek a folyamatoknak, ez pedig egy releváns stresszornak is tekinthető [57]. Stresszorként történő alkalmazása során egy idegen, agresszív egérhez tesszük a vizsgált állatainkat, melyek a számukra új környezetben alárendeltté válnak a domináns, rezidens egérrel szemben [58]. A vizsgálatunkban domináns CD1-es törzsből származó hím egereket használtunk, melyek 1 órán keresztül tartózkodtak egy ketrecben a stresszelt B16-os állatainkkal.

Kényszerített úszás (Forced swim): Ennek során egy átlátszó, vízzel teli tartályba/nagyobb főzőpohárba helyezik az egereket ahonnan nem tudnak menekülni. A szituáció egérnél a teljesen ismeretlen környezeti feltétel miatt nagyfokú stresszválaszt indukál [59]. A

ketreceket fél napra 45°-ban megdőntve hagytuk, illetve az almot is benedvesítettük. A Rázatás + zsúfoltság esetén az összes stressz kezelt állatunk egy ketrecbe került melyet 1 órára rázató gépre helyeztünk.

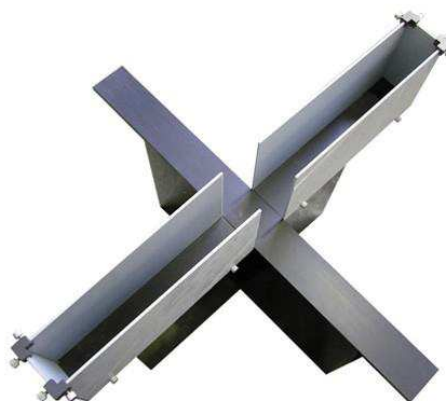
	Délelőtt	Délután
D1	restraint (1h)	footshock
D2	social defeat (1h)	világosság O/N
D3	FST (5', 25 C°)	dőlt ketrec+nedves alom
D4	rázatás-zsúfoltság (1h)	zsúfoltság-sötétség (18h)
D5	WAS (1h)	izolációs stressz (új alom)
D6	social defeat (1h)	FST (5', 25 C°)
D7	rázatás-zsúfoltság (1h) m1	footshock
D8	social defeat (1h)	dőlt ketrec+ nedves alom
D9	WAS (1h)	világosság O/N
D10	footshock	FST (5', 25 C°)
D11	izolációs stressz (új alom)	izoláció-sötétség
D12	rázatás-zsúfoltság (1h)	zsúfoltság+dőlt ketrec+nedves alom
D13	FST (5', 25 C°)	világosság O/N
D14	WAS (1h) m2	social defeat (1h)
D15	sötétség	rázatás-zsúfoltság (1h)
D16	footshock	FST (5', 25 C°)
D17	WAS (1h)	zsúfoltság-nedves alom
D18	social defeat (1h)	sötétség
D19	WAS(1h)	footshock
D20	EPM (5')	OF (10')

4.4. Kezelési csoportok

Csoport név	Elemszám	Kezelések
Kontroll	4	nincs CVS kezelés, nincs gyomorszondázás
Kontroll + víz	5	CVS kezelés nincs, de gyomorszondán a prebiotikum vivőanyagát, azaz vizet kapott naponta
Kontroll + MOS	4	CVS kezelés nincs, de gyomorszondán prebiotikum szuszpenziót kapott naponta
CVS + víz	5	CVS kezelés + gyomorszondán a prebiotikum vivőanyagát, azaz vizet kapott naponta
CVS + MOS	5	CVS kezelés + gyomorszondán prebiotikum szuszpenziót kapott naponta

4.5. Viselkedés tesztek

Emelt Keresztpalló teszt (EPM): A vágás előtti napon a délelőtti folyamán 5 perces EPM tesztet végeztünk, melyet videókamerával vettünk fel, majd a *Noldus EthoVision 10.1*-es programjával elemeztünk ki. Az EPM teszt egy gyakori modell a szorongás mérésére rágcsálókban. Az apparátus a padlószinthez képest 80 cm magasan megemelt, egymást merőlegesen keresztező, két pallóból áll, melyeken két nyílt, illetve két fallal körülvett zárt kar található. A teszt azon alapul, hogy a rágcsálók új környezetbe kerülve igyekeznek mielőbb felderíteni azt, azaz van egy explorációs indíttatásuk, azonban tartanak a nyílt, világos, nem védett térrészekről, melyet a nyitott karok reprezentálnak. A zárt kari belépések száma, illetve a teszt során megtett út utal a lokomotoros aktivitásra, míg a nyílt kari belépések %-os aránya és az ott töltött időtartam a szorongás mértékét fejezi ki [56]. Két vizsgálat között a kísérleti platformot vízzel mostuk le, majd szárazra töröltük.



Nyílt tér teszt (OF): A nyílt tér tesztet szintén alkalmazzák szorongásos viselkedés detektálására, illetve lokomotoros aktivitás mérésére is. Ennek során egy 40 x 40 centiméteres, 20 cm falmagasságú műanyag apparátust alkalmaznak, melynek területét felosztják centrum, széli és sarki részekre. A felosztás történhet magában a dobozban megrajzolva a területet, vagy utólag program segítségével az üres porondra vetítve. Mi az utóbbit alkalmaztuk, szintén a *Noldus EthoVision 10.1*-es programmal, illetve a kiértékelés is ezzel a programmal történt. A rágcsálók alapvetően félnek a nyílt, kitett terektől, ezért főként a porond perifériás részein mozognak, azonban az explorációs motivációjuk is jelentős. Minél erősebb a szorongás mértéke, annál kisebb az explorációs motiváció. Tehát minél többet tartózkodik a vizsgált állat a centrumban, illetve minél nagyobb az általa megtett útvonal, annál kevésbé szorong [64].



Az OF teszt során 10 perces videó felvételeket készítettünk, két állat között pedig vízzel mostuk el a platformot, majd szárazra töröltük. A videók kiértékelésénél vizsgáltuk az egyes térrészekben töltött időtartamot, a megtett útvonalat, illetve a mozgással töltött időtartamot.

4.6. Kortikoszteron mérés

A kortikoszteron szint mérése vérplazmából történt. Az állatok dekapitálása után a vért etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA) tartalmazó Eppendorf-csövekbe gyűjtöttük, melyeket a centrifugálásig jégben tároltunk. A centrifugálás 4°C-on történt, 15 percig 5000 g-n. Ennek végeztével a plazmát pipettával leszívtuk, majd a hormonmérésig -20°C-on tároltuk. A kortikoszteron szintet radioimmunassay (RIA) segítségével határoztuk meg.

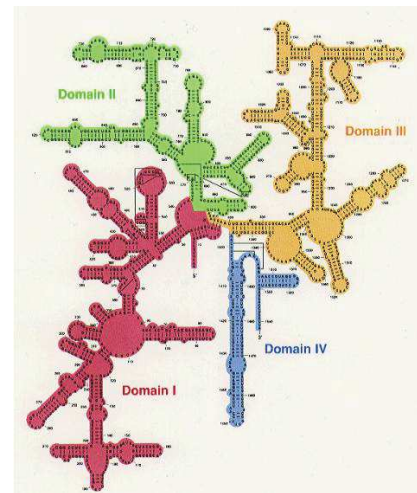
4.7. Bélszövet metszetek

Az állatok boncolása során colomból szöveti mintát gyűjtöttünk 10%-os formalinba, majd a szövetdarabokat 4°C-on tároltuk. 3 nap után KPBS-be helyeztük át őket. A metszetek elkészítéséhez a bélszöveteket paraffinba ágyasztuk be. Ennek során először dehidráltuk a szöveteket felszálló alkoholsorral, majd tisztítás következett xilolban. Az immerzióhoz először paraffin:xilén 1:1 arányú keverékét használtuk, majd tisztán paraffint,

ezekbe helyeztük a szöveteket. A szöveteket ezután papírhajóba raktuk, a sorszámukkal együtt, majd olvadt paraffint öntöttünk rájuk, ezt követően hideg vízben megvártuk, hogy megszilárduljon a paraffin. Az ezáltal megszilárdult tömböt felvagtuk, és az egyes szöveteket fakockákra olvasztottuk a metszéshez. A metszés szánkamikrotómmal történt, melynek során 10 µm-es metszeteket készítettünk, párhuzamosan 2 tárgylemezre. Ezután hematoxylin-eozin szövetfestési eljárást alkalmaztunk, melynek során először deparaffináltuk a metszeteket xilolban majd leszálló alkohol sorban, ezt követően alkalmaztuk a hematoxylin-eozin festést, majd a metszetek dehidrációja következett alkoholban és xilolban. A metszeteket Depex-szel és fedőlemezzel fedtük le, majd mikroszkópban vizsgálva lefényképeztük a szöveteket az *Axio Vision* program segítségével. Minden állatból származó bélszövet metszeteiről 3 különböző fotót készítettünk. Ezután Image J programmal mértük a nyálkahártya vastagságot 10 random módon kiválasztott területen.

4.8. Bélflóra összetétel

A baktériumok vizsgálatára ma megannyi módszer rendelkezésünkre áll, ezek közül jelentősek a tenyésztésen alapuló technikák. Azonban számos baktériumfajt nehéz izolálni, vagy nem tenyésztethető táptalajon, illetve csak nagyon speciális körülmények között, vagy előfordulhat, hogy nagyon lassú a vizsgált baktériumok növekedése. Újjonnan kifejlesztett molekuláris technikák (például PCR) esetén ezek a problémák nem merülnek fel, ezek alkalmazása így jelentősen megkönnyíti egyes baktériumok vizsgálatát [65]. A baktériumok molekuláris vizsgálatai alapvetően a riboszómális géneken alapulnak (rDNS), mivel ezek a bakteriális szekvenciák erősen konzerváltak, viszont találhatóak bennük olyan közbeiktatott hipervariábilis régiók, melyek faj- vagy genus specifikusak [66]. Ezért széles körben elterjedtek a 16 S rRNS génjének vizsgálatára alapuló technikák, mivel ez a gén az összes prokariótában jelen van, funkciója pedig nem változott az idők során, mégis tartalmaz hipervariábilis régiókat [67]. Vizsgálataink során ezért ez alapján a génszakasz alapján becsültük a bélben a bakteriális összetételt.



A bélflóra összetételének megállapításához a boncoláskor a vastagbél proximális részéből és a vakbélből béltartalmat vettünk ki, előbbiből 150 mg-ot, utóbbiból 200 mg-ot. Ezután szárazjégre helyzetük a mintákat, majd -70°C -on tároltuk a felhasználásig. A mintaelemzéshez első lépésben a bakteriális genomiális DNS-t izoláltuk béltartalomból. Ehhez a QIAGEN által gyártott *QIAamp DNA Stool Mini Kit*-et használtuk, és a kit-hez tartozó standard protokollt alkalmaztuk. Az izolált DNS koncentrációját és tisztaságát *NanoDrop* készülékkel mérük meg.

A következő lépésben real-time qPCR módszert alkalmaztunk, mely a fluoreszcens fotometria és a PCR együttes alkalmazásán alapul. A reakció során DNS kettős szálak keletkeznek, melyhez a hozzáadott fluoreszcens festék kötődik, így az egyes ciklusokban keletkező DNS szálak mennyiségével az idő függvényében arányosan nő a fluoreszcens intenzitás, melyet a gép detektál, ezáltal meghatározható a DNS mennyiség. Fluoreszcens festékként vizsgálatainkban *EvaGreen* festéket, illetve a reakcióelegy elkészítéséhez a *Light Cycler 480 Probes Master PCR Master Mix*-et (Roche) használtunk. A PCR vizsgálatot az *Applied Biosystems StepOnePlus* rendszerrel végeztük, melyben 6 pontos standard görbét adtunk meg az adott baktérium mennyiségi vizsgálatához készült standard hígítási sor alapján.

A program beállítások során iniciációs lépésként 10 percre 95°C –ot állítottunk be, mely után 35-40 ciklus következett. A ciklusok első lépése a denaturáció, mely 95°C –on történt 15 másodpercig, majd a primerek tapadásához és az elongációhoz szükséges 60°C –ot állítottuk be 30 másodpercre.

Taxonómiai egység	Primer neve	Szekvencia
Bifidobacteria	BifF	GCGTGCTTAACACATGCAAGTC
	BifR	CACCCGTTTCCAGGAGCTATT
Lactobacillus	lacto f	TGCCTAATACATGCAAGTCTGA
	lacto r	GTTTGGGCCGTGTCTCAGT
Firmicutes	928F-Firm	TGAAACTYAAAGGAATTGACG
	1040FirmR	ACCATGCACCACCTGTC
Bacteroides	Bact934F	GGARCATGTGGTTTAATTCGATGAT
	Bact1060R	AGCTGACGACAACCATGCAG
Gamma proteobacteria	y Prot f	TCGTCAGCTCGTGTGTGTA
	y Prot r	CGTAAGGGCCATGATG

4.9. CRH mRNS expresszió mérése colon szövetben és hypothalamusban

Az állatok vágása során a hypothalamust, illetve colon szöveti mintát tettünk el a CRH mRNS mennyiségének mérésére. A begyűjtött mintákat szárazjégre helyeztük, majd -70°C -on tároltuk a felhasználásig. Első lépésben a szövetek feltárásához fenol tartalmú TRI-reagenst alkalmaztunk, melyben a mintákat homogenizáltuk, majd centrifugálás után kloroformot is adtunk a mintákhoz, mely a fázis szeparáláshoz szükséges. A következő centrifugálás után a víztiszta felülúszót leszívtuk majd a *Geneaid Total RNA Mini Kit (Tissue)*-t használtuk a további lépésekhez, a kit-hez tartozó *Tissue Protocol* alapján (<http://www.geneaid.com/sites/default/files/RT6.pdf>). Ennek során először a sejtek lízise történik meg, majd RB oszlopokon az RNS kötése, mosási lépések, végül pedig az RNS elúció következik. A tisztítás után *NanoDrop*-pal mértük meg a mintáink RNS koncentrációját, majd a mintákból cDNS-t (komplemeter DNS) szintetizáltunk az *Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler* készülékkel, melyhez az *Applied Biosystem High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit* komponenseit használtuk. Ezután real-time qPCR-t alkalmaztunk, szintén az *Applied Biosystems StepOnePlus* rendszerrel, melyet már a bélflóra összetétel mérésnél ismertettem. A reakcióhoz CRH specifikus primereket, illetve referenciaként GAPDH specifikus primereket használtunk, mivel utóbbi génje úgynevezett „háztartási gén”, azaz minden sejtben jelen van. Az egyes termociklusok során keletkező DNS mennyiségből tud következtetni a program, hogy mekkora volt az RNS expresszió mértéke, melyet ún. „fold change” (FC) egységben kapunk meg, és az általunk megjelölt kontrollhoz viszonyítja, mely FC értékét 1-nek számítja.

Vizsgált gén	Primer neve	Szekvencia
GAPDH	upM	TGACGTGCCGCCTGGAGAAA
	lowM	AGTGTAGCCCAAGATGCCCTTCAG
CRH	CRHmusQf	CGCAGCCCTTGAATTTCTTG
	CRHmusQr	CCAGGCGGAGGAAGTATTCTT

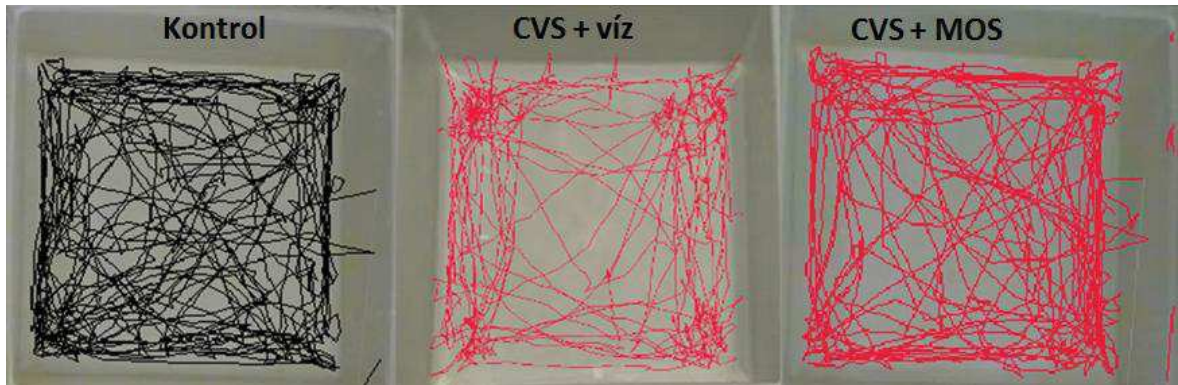
4.10. Statisztikai kiértékelés

Az eredmények kiértékeléséhez a *Pism GraphPad6* programot használtuk, melynek során ANOVA tesztet végeztünk az összes kezelési csoportunk adatait összehasonlítva és Tukey-féle post hoc tesztel állapítottuk meg, hogy mely csoportjaink térnek el egymástól szignifikánsan. Az eredményt akkor tekintettük szignifikánsnak, ha $p < 0,05$ volt. Ahol t-próbát is végeztünk, az adatok eloszlása és varianciája alapján határoztuk meg, hogy milyen próbát alkalmazzunk. A grafikonokon az átlag + standard errors of means (SEM) értékek láthatóak. Az ábrákhoz tartozó aláírásokban jelöltem, hogy milyen statisztikai próbákkal értékeltem ki az adatokat.

5. Eredmények

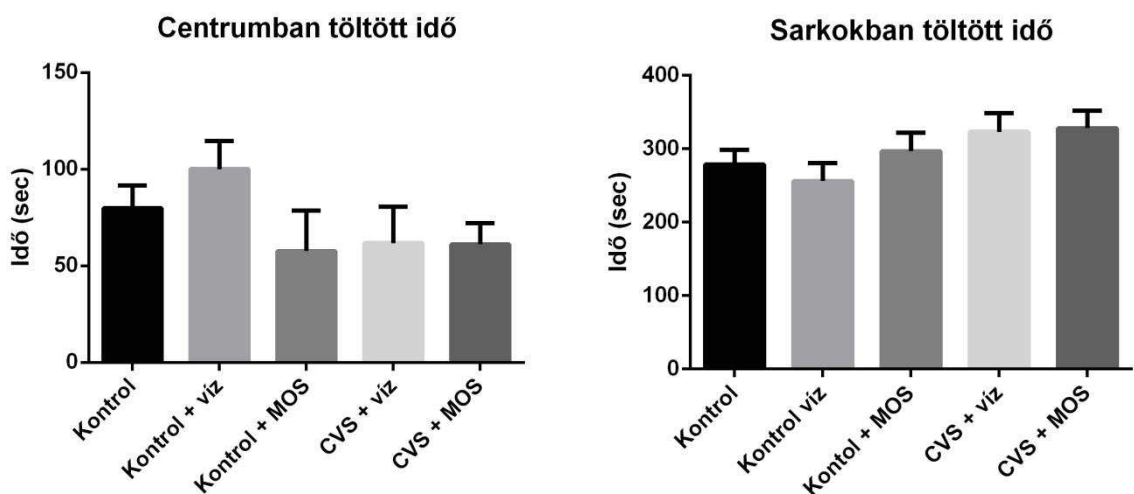
5.1. Viselkedés tesztek

5.1.1 Open Field



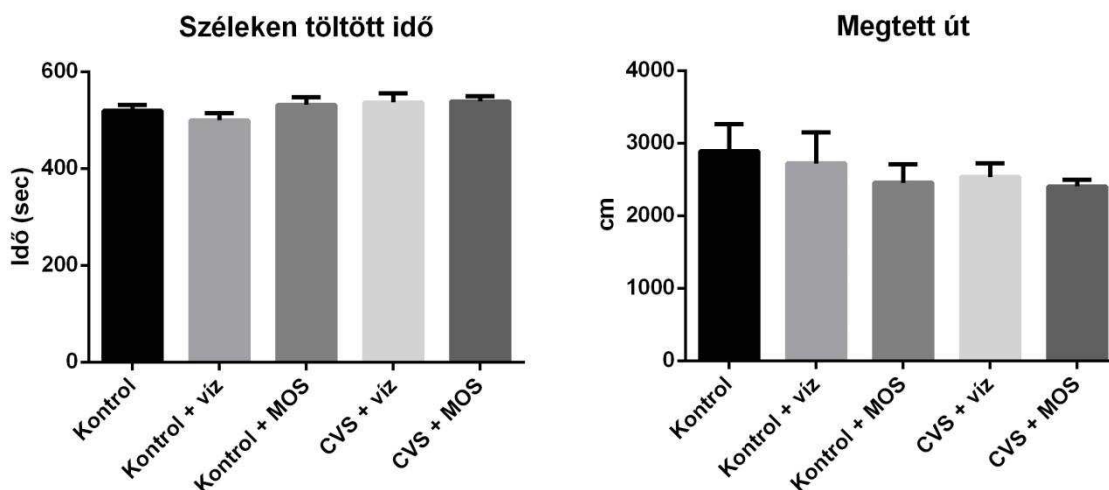
A Nyílt tér tesztben a centrumban töltött időtartamot tekintve (8. ábra) nem találtunk szignifikáns különbséget az egyes kezelési csoportjaink között ($p = 0,2946$). A Kontrol + víz csoport tagjai töltötték a legtöbb időt a centrumban, míg a legkevesebbet és egyben közel megegyező időtartamot a Kontrol + MOS és a két krónikus stresszelt (CVS) csoport.

A sarkokban töltött időtartamot (9. ábra) vizsgálva szintén nem mutatkozott szignifikáns különbség a csoportjaink között ($p = 0,2023$), a legtöbb időt a CVS csoportjaink töltötték ott, a legkevesebbet pedig a Kontrol + víz tagjai.

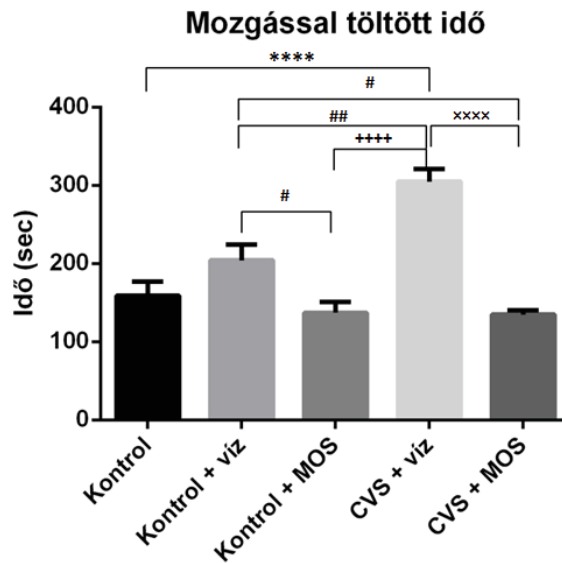


A széleken töltött időtartamban (10. ábra) nem mutatkozott szignifikáns különbség ($p = 0,3237$) a kezelési csoportjaink között, az egyes csoportok értékei közel azonosak voltak.

A 10 perces vizsgálati időtartam alatt összesen megtett út hosszában (11. ábra) szintén nem mutatkoztak szignifikáns különbségek ($p = 0,7690$), a Kontrol és Kontrol + víz csoport tette meg a leghosszabb utat, míg a másik három csoport kevesebbet, közel azonos értékeket mutatva.



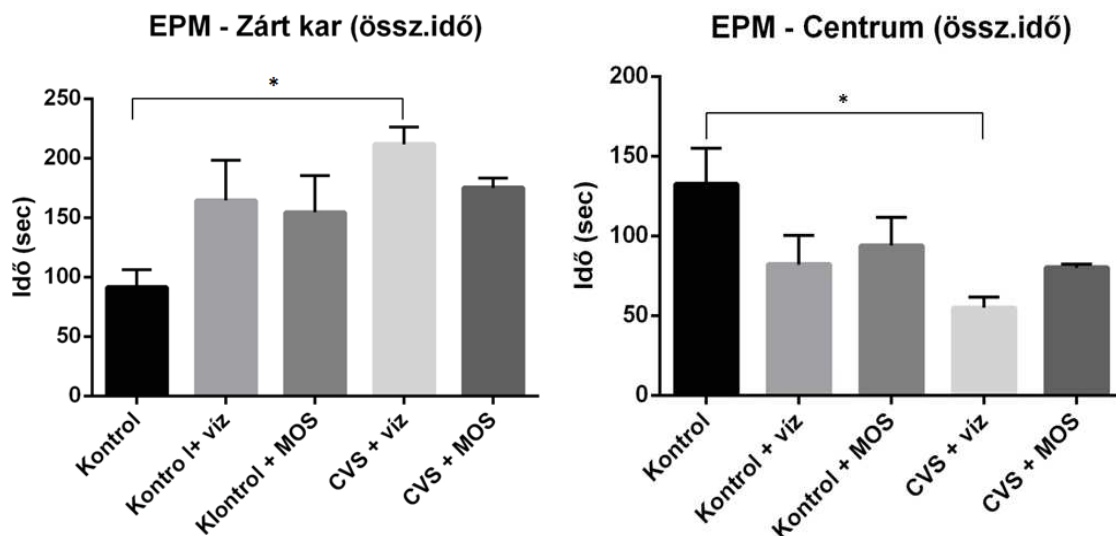
A mozgással töltött időtartamban (12. ábra) azonban szignifikáns különbségeket találtunk ($p < 0.0001$). A CVS + víz csoportban volt a legmagasabb a mozgással töltött időtartam, mely mindegyik kezelési csoportunktól szignifikánsan különbözött, a második legmagasabb értéket a Kontrol + víz csoport állatai mutatták, ez a csoport szignifikánsan eltért a prebiotikummal kezelt csoportjainktól. A mozgással töltött idő a 2 prebiotikummal kezelt csoport esetén volt a legalacsonyabb.



5.1.2. Emelt Keresztpalló Teszt (EPM)

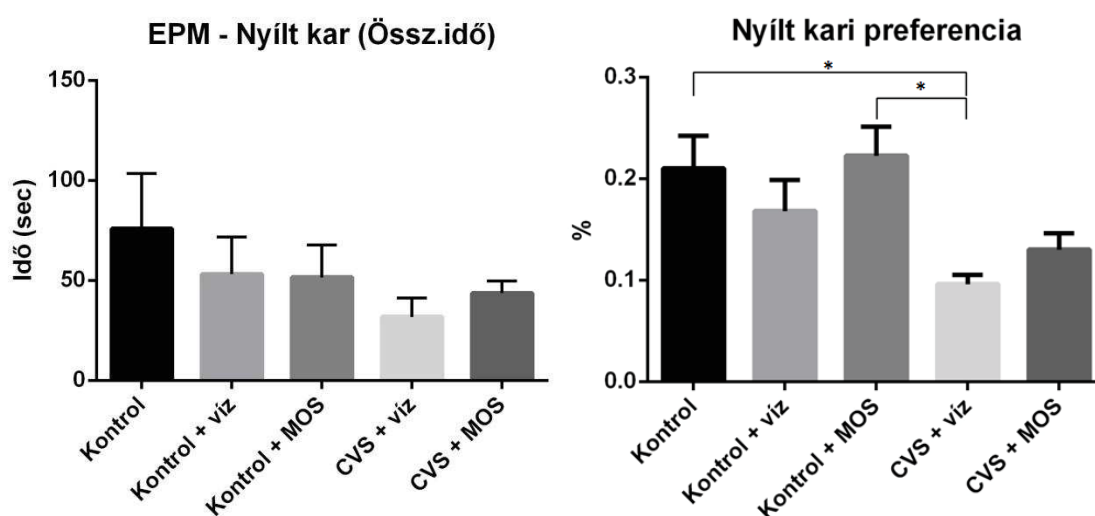
Az emelt keresztpalló tesztben a zárt karban töltött időtartamot (13. ábra) vizsgálva szignifikáns különbséget ($p = 0,0267$) találtunk, még hozzá a Kontrol és a CVS + víz csoport között, ugyanis utóbbiak szignifikánsan több időt töltöttek a zárt karban, ahogy a másik három csoport is, azonban az eltérés itt már nem mutatkozott szignifikánsnak.

A centrumban töltött időtartamban (14. ábra) a Kontrol csoporthoz képest a többi csoport kevesebb időt töltött, azonban szignifikancia ($p = 0,0255$) szintén csak a CVS + víz csoportnál mutatkozott.



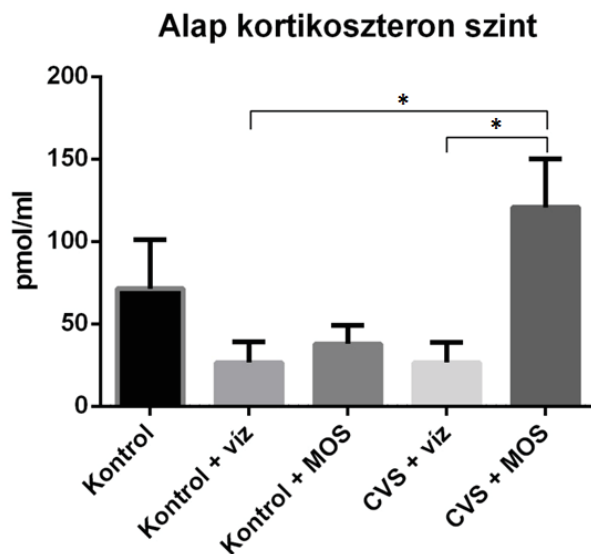
A nyílt karban töltött időtartamban (15. ábra) nem találtunk szignifikáns eltérést ($p = 0,4547$) a kezelési csoportjaink között, a legtöbb időt a Kontrol csoport tagjai, míg a legkevesebbet a CVS + víz tagjai töltötték ebben a térrészben.

A nyílt kari preferenciát (16. ábra) tekintve – mely a nyílt kari belépések száma, osztva az összes területre történő belépések számával – szignifikancia mutatkozott ($p = 0,0086$), ugyanis a CVS + víz csoport tagjai szignifikánsan kisebb preferenciát mutattak a Kontrol és a Kontrol + MOS csoporthoz képest is. A CVS + MOS csoport szintén kisebb nyílt kari preferenciát mutatott, azonban ez a különbség már nem mutatkozott szignifikánsnak.



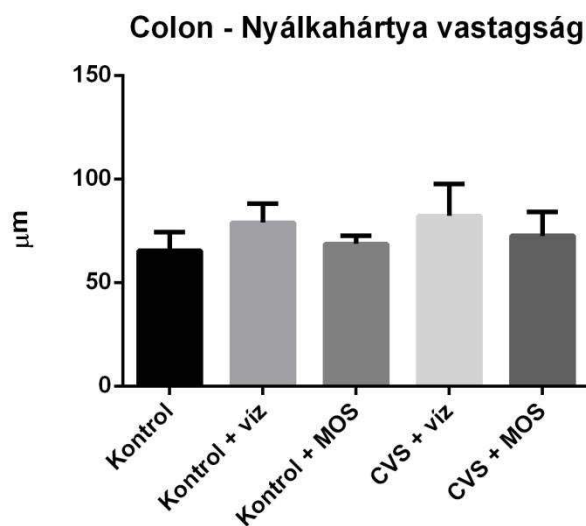
5.2. Kortikoszteron

A délelőtti órákban vett vérminták alap kortikoszteron szintjében (17. ábra) a CVS + MOS csoportunk szignifikánsan ($p = 0,0168$) magasabb értéket mutatott a CVS + víz, illetve a Kontrol + víz csoporthoz képest, míg a Kontrol + MOS és Kontrol csoporttól nem különbözött szignifikánsan. Azonban megjegyzendő, hogy az összes csoport értékei a normál tartományon belül vannak, tehát a CVS + MOS csoport értéke sem tekinthető magasnak.



5.3. Bélszövet – nyálkahártya vastagság

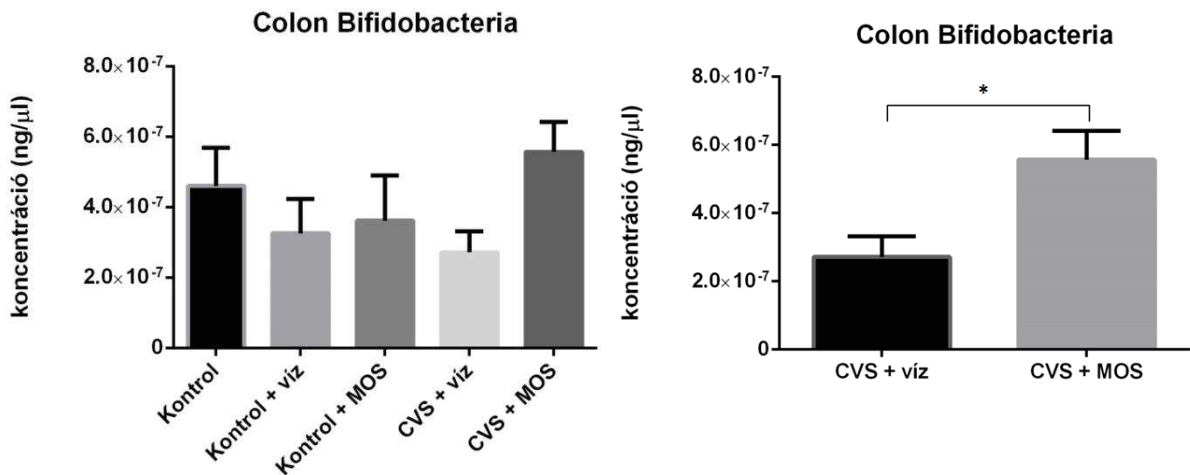
A colonban a nyálkahártya vastagságát (18. ábra) vizsgálva nem találtunk szignifikáns különbséget ($p = 0,3735$) a csoportjaink között. A legkisebb értékeket a Kontrol csoportnál kaptuk, míg a legnagyobbakat a CVS + víz csoportban.



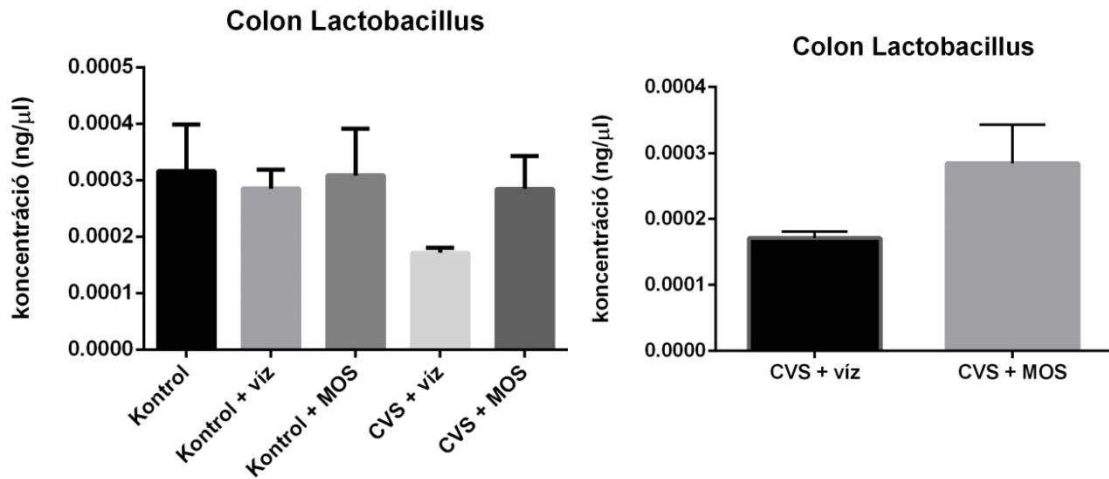
5.4. Bélflóra összetétel

5.4.1. Bélflóra összetétel a colonban

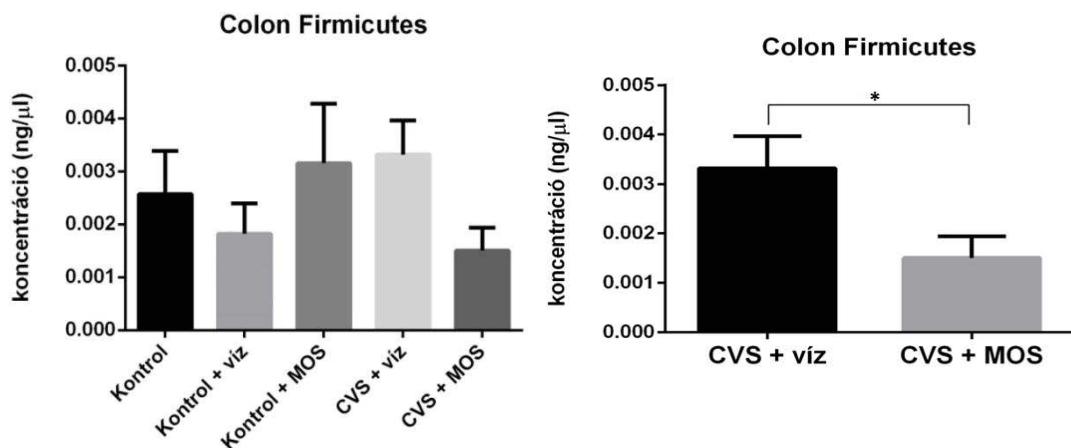
Colon tartalomban a Bifidobacteriák mennyiségében (19. ábra) ANOVA-val nem találtunk szignifikáns különbséget ($p = 0,2358$) a csoportjaink között. A legnagyobb különbség a két stresszelt csoport között látszódott, ugyanis a CVS + MOS csoportban volt a legmagasabb, míg a CVS + vízben a legalacsonyabb a Bifidobacteria mennyisége. Párosítatlan t-próbát végezve (20. ábra) a két krónikus stresszelt csoport között szignifikáns differencia ($p = 0,0251$) mutatkozott, azaz a CVS + MOS csoportban szignifikánsan nagyobb volt a Bifidobacteria mennyiség, mint a CVS + víz tagjaiban.



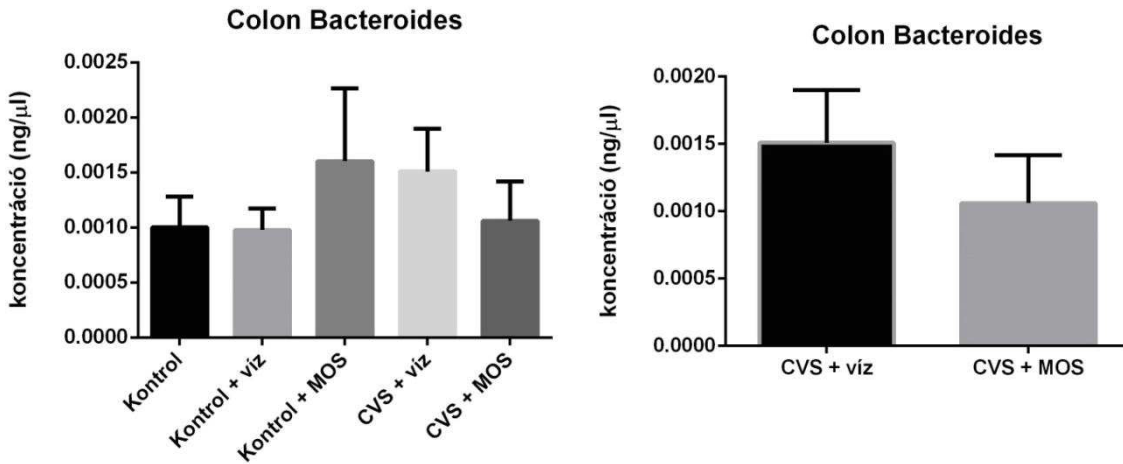
Colon tartalomban a Lactobacillusok mennyiségében (21. ábra) ANOVA-val szintén nem találtunk szignifikáns különbséget ($p = 0,9171$) a csoportjaink között, azonban hasonló tendencia mutatkozott, mint a Bifidobacteria-nál, ugyanis a CVS + víz csoportban volt a legkisebb a Lactobacillusok aránya, míg CVS + MOS-ban magasabb, körülbelül a többi csoporttal azonos mennyiségű. Welch-féle t-próbával a két stresszelt csoportunk között (22. ábra) szintén nem mutatkozott szignifikancia ($p = 0,1248$).



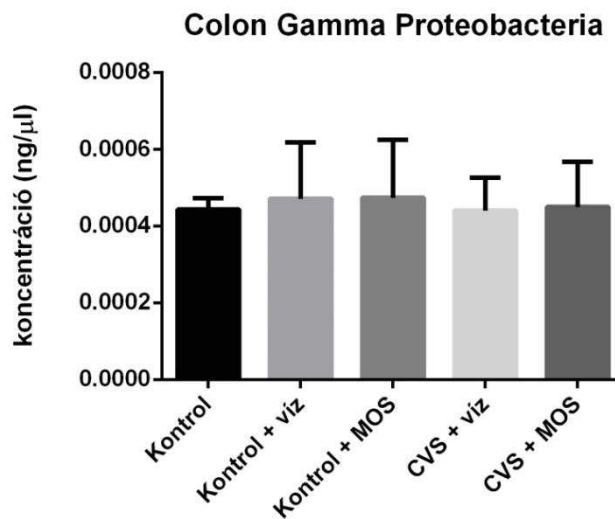
A Firmicutesek mennyisége a colon tartalomban (23. ábra) ANOVA-val vizsgálva nem különbözött szignifikánsan ($p = 0,2997$) a csoportok között, a legalacsonyabb értékeket a CVS + MOS tagjai mutatták, míg a legmagasabbat a CVS + víz illetve Kontrol + MOS csoport állatai. Párosítatlan t-próbát végezve a két krónikus stresszelt csoport között (24. ábra) szignifikánsan ($p = 0,0478$) alacsonyabb volt a CVS + MOS-ban a Firmicutesek aránya, mint a CVS + vízben, a Kontrol + MOS csoporttal összehasonlítva azonban a kis különbség ellenére nem volt szignifikáns az eltérés.



A Bacteroidesek mennyisége a colon tartalomban (25. ábra) ANOVA-val vizsgálva nem mutatott szignifikanciát a csoportok között, a legmagasabb értékeket a Kontrol + MOS és a CVS + víz csoport tagjai mutatták, míg a másik 3 csoport értékei közel azonosnak mutatkoztak. Mann-Whitney –féle t-próbával (26. ábra) sem mutatkozott szignifikáns különbség ($p = 0,4127$) a két krónikus stresszelt csoport között.



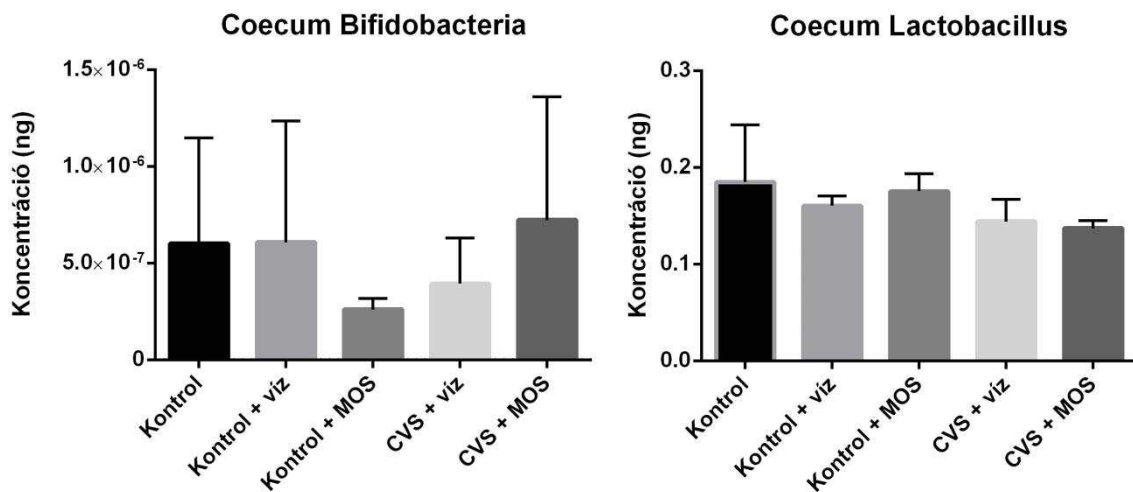
A Gammaproteobacteria mennyisége (27. ábra) a colon tartalomban az összes csoportunkban közel azonos volt, tehát nem találtunk szignifikáns eltérést ($p = 0,9993$) a csoportok értékei között.



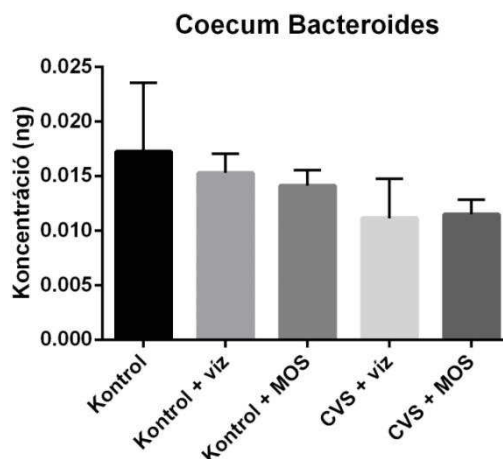
5.4.2. Bélflóra összetétel a coecumban

Coecum tartalomban a Bifidobacteriák mennyisége (28. ábra) között nem mutatkozott szignifikáns különbség ($p = 0,6372$), a Kontrol, a Kontrol + víz és a CVS + MOS csoport értékei magasabbak voltak és közel megegyezők, azonban ennél a három csoportnál a szórások is jóval magasabbak voltak a Kontrol + MOS és CVS + víz csoportokhoz képest, melyek átlagai alacsonyabbnak mutatkoztak.

A Lactobacillusok mennyiségében (29. ábra) sem találtunk szignifikáns eltérést ($p = 0,7039$) a csoportok között, az értékek közel azonosak voltak az összes csoportban.



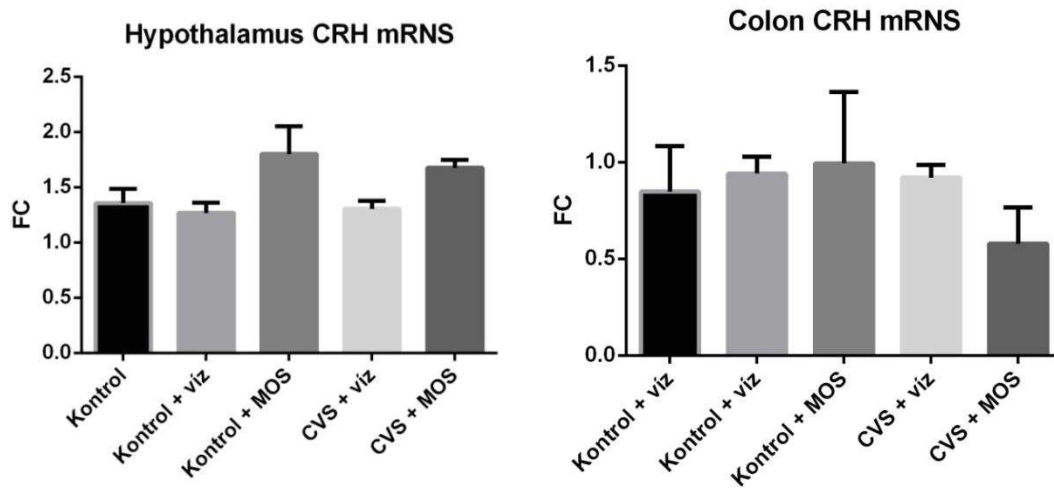
A Bacteroidesek mennyiségében (30. ábra) sem mutatkozott szignifikáns különbség ($p = 0,6439$) a coecum tartalomban. A Kontrol csoportban volt a legnagyobb a mennyiségük, azonban itt a szórás is nagyobb volt a többi csoporthoz képest, a legkisebb értékek pedig a stresszelt csoportokban mutatkoztak.



5.5. CRH mRNS expresszió

A Corticotropin releasing hormon mRNS -ének expressziója a hypothalamusban (31. ábra) ANOVA-val vizsgálva szignifikánsan ($p = 0,0276$) eltért, azonban a post hoc teszt elvégzésével nem találtunk szignifikanciát. A legmagasabb expresszió a Kontrol + MOS csoportban volt detektálható, míg a legalacsonyabb a CVS + víz és Kontrol + víz csoportban.

A colonban a CRH mRNS expressziójában (32. ábra) nem találtunk szignifikáns különbségeket ($p = 0,5867$) az egyes csoportjaink között, az expresszió mértéke a legalacsonyabb a CVS + MOS csoportban volt.



6. Megvitatás

Munkánk során a manno-oligoszacharid prebiotikum hatásait vizsgáltuk krónikus variábilis stressznek (CVS) kitett C57/Bl6-os egereken. A stressz széleskörű hatást gyakorol a szervezetre: képes befolyásolni a viselkedést, az immunrendszer működését, a kardiovaszkuláris rendszert és a gasztrointesztinális traktus működését, továbbá modulálja a központi idegrendszer működését [1]. Vizsgálataink során ezeknek a komplex folyamatoknak a tanulmányozására viselkedés tesztekét végeztünk (EPM, OF), mértük az állatok bazális kortikoszteron szintjét plazmából, a CRH mRNS expresszióját hipotalamuszban és colon szövetben, vizsgáltuk a vastagbél nyálkahártya vastagságát, illetve meghatároztuk a bélflóra összetételének változásait.

A viselkedés tesztekét a szorongásos tünetek, illetve depresszív magatartás detektálására alkalmaztuk. A Nyílt tér (OF) tesztet főként a szorongásos magatartás vizsgálatára, illetve a lokomotoros aktivitás mérésére használják. A teszt során minél többet tartózkodik az állat a centrumban és minél kevesebbet a porond sarkain, illetve széli részein, annál kisebb a szorongás mértéke [63]. A tesztelés során nem találtunk szignifikáns különbségeket ezeket a faktorokat vizsgálva a kezelési csoportjaink között, csak tendencia mutatkozott arra, hogy a krónikus stressz csökkentette a centrumban töltött időtartamot, míg enyhén megnövelte a sarkokban töltött időt. A prebiotikum kezelés ezekre a paraméterekre az eredmények alapján nem volt hatással. A megtett út hosszában, ami a lokomotoros aktivitást fejezi ki, szintén nem találtunk szignifikáns eltérést a csoportjaink között, azonban a mozgással töltött időtartamban a CVS + víz csoportunk az összes csoporthoz képest szignifikánsan több időt töltött mozgással, ami zavarodott, hiperaktív viselkedésre utal, mivel a mozgás többit nem a megtett út hosszában, azaz a lokomotoros aktivitásban mutatkozott meg. A prebiotikum kezelés ebben az esetben hatásosnak bizonyult, azaz képes volt jelentősen csökkenteni ezt a zavart magatartást mind a stresszelt -, mind a Kontrol, vízzel szondázott csoporthoz képest is. Ezen eredményeink összhangban vannak germ-free egereken végzett korábbi irodalmi adatokkal, ahol stressz hatására hasonlóan megnövekedett mozgási aktivitást találtak, melyet a bélflóra helyreállításával képesek voltak normalizálni [68].

Az emelt keresztpalló teszt (EPM) egy szintén gyakran alkalmazott modell a rágcsálók szorongásos magatartásának vizsgálatára. A teszt a rágcsálók explorációs motivációja és a kitett térrészekről való félelem csereviszonyán alapul. A kisebb arányú

tartózkodás a nyílt karban szorongásos magatartásra utal, tehát a szorongó állatok a zárt karban jóval több időt töltenek. Az akut és az ismételt stressz irodalmi adatok alapján fokozza a szorongást [8, 13, 56]. Ezt a megfigyelést sikerült az általunk alkalmazott krónikus stressz modellben is alátámasztanunk. Vizsgálatainkban a CVS + víz csoport állatai szignifikánsan több időt töltöttek a zárt karban és kevesebbet a centrumban, mint a Kontrol csoport, a másik 3 csoport, azaz a Kontrol + víz és a két prebiotikummal kezelt csoportunk nem különbözött szignifikánsan sem a Kontroltól, sem a CVS + víz csoporttól, az értékeik közel azonosak voltak mindkét változó esetén. A nyílt karban töltött időtartamban nem találtunk szignifikáns különbséget, a nyílt kari preferenciában azonban a CVS + víz csoport szignifikánsan kisebb értékeket mutatott, mint a Kontrol, illetve a Kontrol + MOS csoport. Ezek alapján látható, hogy a prebiotikum kezelésünk a CVS hatását képes volt enyhén pozitív irányban befolyásolni, de ez a hatás nem volt akkora mértékű, hogy szignifikánsan eltérjenek a CVS + víz csoporttól a prebiotikummal is kezelt csoport értékei. Más vizsgálatok probiotikum kezelés hatására kimutatták a szorongásos tünetek jelentős csökkenését ezekben a viselkedés tesztekben [41, 43]. Ez a pozitív, szorongás csökkentő hatás többek között a neurotranszmitterek modulációjában nyilvánul meg, ugyanis egyes *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* fajok képesek GABA termelésére, illetve centrális expressziójának befolyásolására [43, 69]. Mivel a GABA a központi idegrendszer fő gátló transzmittere, ezáltal a rendszer diszfunkciója szorongáshoz és depresszióhoz vezethet [70]. A probiotikumok képesek növelni a triptofán szintet is, ami a szerotonin prekursora, ezáltal antidepresszáns hatást fejt ki [71]. A jótékony baktériumokkal szemben a patogének fokozott elszaporodásának hatására nő a szorongásos tünetek kifejeződése, például *Campylobacter jejuni* és *Citrobacter rodentium* hatására [72]. A prebiotikumok adagolásával a jótékony baktériumok szaporodásának elősegítésével és ezáltal a patogének gátlásával tehát csökkenthetők a szorongásos magatartási tünetek. Az eredményeink alapján a kismértékben megmutatkozó javulásnak a lehetséges oka, hogy nem volt elegendő a nagyfokú változásokhoz a kezelési időtartam, illetve érdemes lenne nagyobb minta-elemszámú csoportokban újra elvégezni a teszteket.

Stressz hatására jellemzően megemelkedik a plazma kortikoszteron szint a HPA – tengely fokozott aktivitása miatt [16, 17]. Kísérletünkben az utolsó stressz kezeléseket utáni 2. napon a bazális kortikoszteron szint az összes állatunkban a normál tartományon belül volt. Azonban érdekes módon a legalacsonyabb értékeket a CVS + víz és Kontrol + víz csoport tagjai mutatták, míg a legmagasabbat a CVS + MOS, azonban utóbbi a Kontrol és Kontrol + MOS csoporttól nem különbözött szignifikánsan és ez a többi csoporthoz képest

magasabb érték is csak kis mértékben magasabb, mint a napszaknak megfelelő bazális kortikoszteron szint. Akut stressz esetén ennél jóval magasabb értékek a jellemzőek. Az eredményeink alapján a kortikoszteron szint csökkenése a CVS + víz csoportban ellentmond más kutatások eredményeinek [1, 16, 17, 73]. Ahogy abban is ellentétes eredményt kaptunk, hogy vizsgálatunkban a stressz + prebiotikum kezelés hatására volt a legmagasabb a kortikoszteron szint, míg más kutatásokban probiotikumok segítségével a bélflóra helyreállításával csökkent a stresszhormonok szintje [1, 41-43], mivel az összes kezelési csoportunk bazális kortikoszteron szintje alacsony volt. A krónikus variábilis stressz plazma kortikoszteronra gyakorolt hatására az irodalomban változatos eredményeket találunk. Vannak kutatók, akik az alap kortikoszteron növekedéséről számolnak be, míg mások munkáiban akutan nem stresszelt rágcsálók kortikoszteron szintje a napszakos ritmus minimumán (a reggeli órákban) mérve nem mutatott eltérést a krónikusan nem stresszelt állatok szintjétől. Munkacsoportunk patkányokon illetve egereken végzett korábbi vizsgálatai is arra utalnak, hogy a krónikus stressz nem változtatja a bazális kortikoszteron szintet. A krónikus variábilis stressz ugyanakkor növeli a stressz reaktivitást azaz egy új stresszor hatására kialakuló akut kortikoszteron választ. Jelen munkánkban ezt a hatást nem teszteltük.

A kommenzalista baktériumflóra a nyálkahártyához tapadva fenntartja a bél barrier funkcióját, ezáltal a nyálkahártya egységét, fokozzák a mucintermelést így megakadályozva, hogy a patogének károsíthassák azt és kijussanak a bélből, további gyulladásokat indukálva [7, 14, 19]. A prebiotikumok segítik a kommenzalista mikrobák elszaporodását a bélben [38, 45], ezáltal segítve elő a nyálkahártya erősödését. Ezzel szemben a stressz a patogének számát növeli, csökkenti a barrier funkciókat az epitélium gyengítésével [3, 74]. Kísérletünkben sem a stressz-, sem a prebiotikum kezelés hatását nem sikerült kimutatni a nyálkahártya vastagságára, feltehetően a kezelés nem volt kellőképpen hosszú ezen strukturális változások kialakításához. .

Stressz hatására felborul a baktériumflóra normál összetétele [14, 75], ezért vizsgáltuk, hogy CVS-nek kitett egereknek prebiotikumot adva hogyan változik a bélben a mikrobiális összetétel. A vizsgálatunkban ezért colon és coecum tartalomban mértük a 16 S rRNS alapján a bakteriális kompozíciót. Colon tartalomban a jótékony, kommenzalista Bifidobacteriumok mennyisége a CVS + víz csoportban volt a legalacsonyabb, alátámasztva ezzel a krónikus stressz káros hatását a bélflórára. Ugyanakkor a CVS + MOS csoportban volt a Bifidobaktérium koncentráció a legmagasabb, tehát a MOS prebiotikum képes volt a stressz által lecsökkentett Bifidobacteria szintet növelni.

A szintén jótékony *Lactobacillus*okat vizsgálva hasonló tendencia mutatkozott, itt is a CVS + víz csoportban volt a legalacsonyabb ezeknek a baktériumoknak a szintje, míg a CVS + MOS állataiban a legmagasabb, tehát a prebiotikum kis mértékben növelte a mennyiségüket, ez a különbség azonban nem mutatkozott szignifikánsnak. A stresszel kapcsolatos betegségek hatására a *Bifidobacteria* és *Lactobacillus* szám csökkenését más vizsgálatok is kimutatták már [3, 75, 76]. Ezeknek a baktériumoknak a mennyiségi növekedését inulin és galaktooligoszacharid prebiotikum hatására a colonban szintén alátámasztották már más kutatások is [45, 77]. Eredményeink alapján a manno-oligoszacharid prebiotikum is hasonlóan befolyásolta ezeknek a baktériumoknak a szaporodását.

A Firmicutes-ek közé tartoznak a jótékony *Lactobacillus*ok is, ám a törzs nagyobb részben patogéneket tartalmaz [33]. Vizsgálatainkban a colon tartalomban a legmagasabb Firmicutes számot a CVS + víz tagjai mutatták, míg a legalacsonyabbat a CVS + MOS csoportunk. A két stresszelt csoport közti különbség t-próbával összehasonlítva szignifikánsnak bizonyult, tehát a krónikus stressz hatására megnövekedett Firmicutes mennyiséget képes volt a prebiotikumunk csökkenteni. Érdekes módon a Kontrol + MOS csoportban kaptuk a második legmagasabb értékeket, viszont ez a csoport jelentősen nem különbözött a Kontrol csoportunktól.

A *Bacteroides* törzsbe tartozó fajok jelentős része klinikai patogén [29]. A *Bacteroides* mennyiségben a legmagasabb értékeket a CVS + víz és a Kontrol + MOS csoport mutatták, a legkisebbet a CVS + MOS tagjai, azonban a differenciák nem bizonyultak még t-próbával összehasonlítva sem szignifikánsnak. A vizsgálatok egy része hasonló növekedést mutat stressz és mentális betegségek hatására a *Bacteroides* számban [76, 78], de a szakirodalomban található olyan eredmény is, mely a *Bacteroides* szám csökkenéséről számol be egy szociális stresszor alkalmazása során [75].

A Gamma proteobacteria taxonba szintén nagyrészt patogének tartoznak, többek között az *Escherichia coli* is [36]. Vizsgálatunkban sem a krónikus stressz, sem a prebiotikum adagolás nem okozott szignifikáns változást ezen baktériumok mennyiségében. A szakirodalomban azonban találunk példa arra, hogy stresszel kapcsolatos betegségekben, például IBS esetén nő ezen baktériumok száma a bélben [3]. Eredményeink alapján egyes, főként a patogéneket tartalmazó taxonokban tehát tendencia mutatkozott arra, hogy a CVS kezelés növelte ezen baktériumok mennyiségét a bél tartalomban, míg a prebiotikum kezelésünk csökkentette ezeknek a változásoknak a nagy részét stresszelt állatokban.

Coecum tartalomban nem találtunk számottevő különbségeket a vizsgált baktérium taxonokat tekintve a kezelési csoportjaink között. A Bifidobacteria, Lactobacillus és Bacteroides számban sem mutatkozott szignifikáns különbség a mennyiségekben a csoportjaink között, tehát sem a stressz, sem a prebiotikum kezelés nem volt képes jelentősen befolyásolni a coecumban ezen mikróbák számát. Ennek oka valószínűleg az, hogy a coecum baktériumflórája a colonhoz képest sokkal stabilabb, viszonylag állandó.

A kortikoszteron szint emelkedése stressz hatására együtt jár a magasabb CRH mRNS expresszióval, mivel a CRH hatására növekszik az ACTH és ebből kifolyólag a mellékvese glükokortikoid termelése [16, 73, 79]. Eredményeink alapján a legmagasabb kortikoszteron szint a CVS + MOS csoportban mutatkozott, így a hipotalamusz CRH expressziójában is itt kaptuk a legmagasabb értékeket, míg a CVS + víznel a legalacsonyabbat, ami szintén a csoportban mutatott kortikoszteron szintnek megfelelő. Azonban az expresszió különbsége a két stresszelt csoportunk között biológiailag nem tekinthető jelentősnek. A colon szövetben a CRH mRNS mennyisége azonban a hypothalamus-tól eltérően a CVS + MOS csoportban volt a legalacsonyabb, a többi csoport egymással hasonló értékeket mutatott, de szignifikáns különbségeket nem találtunk. A szakirodalom alapján stressz hatására magasabb CRH értékek mutatkoznak a kortikoszteronnal egyetemben [17, 80], ez a magasabb szint a mi vizsgálatainkban tehát nem mutatkozott meg.

Összefoglalva, eredményeink alapján látható, hogy a krónikus stressz hatására a colonban lévő baktérium flóra megváltozik, visszaszorulnak a jótékony kommenzalista taxonok képviselői, mint a Bifidobaktériumok és Lactobacillusok és teret nyernek a patogének. Ezzel párhuzamosan a krónikus variábilis stressz hatására az állatok egyes magatartás tesztekben szorongásos viselkedést mutatnak és mozgási viselkedésük hiperaktívvá válik. A mannoooligoszacharid prebiotikummal (MOS) végzett kezelés képes volt kivédeni ezen stressz-indukálta magatartási, és bél mikrobiom összetételbeli változásokat. Eredményeink hozzájárulnak a bél-agy tengely működésének jobb megértéséhez és rámutatnak a mannoooligoszacharidok bélflóra alakító hatására és ezen keresztül egyes stresszel kapcsolatos központi idegrendszeri elváltozások kiegészítő kezelésének lehetőségére.

7. Összefoglalás

Az már korábban bebizonyosodott, hogy az agy és a bél, illetve a bélflóra között kétirányú kommunikáció zajlik, mivel a bél baktériumai képesek befolyásolni a szervezet számos fiziológiai aspektusát, illetve a pszichés tényezők és a stressz is hatnak a bélmikrobiomra [1, 3].

Kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy a prebiotikumok, melyek elősegítik a bélflóra jótékony kommenzalistáinak a szaporodását a patogénekkal szemben, hogyan befolyásolják a stressz okozta kedvezőtlen változásokat. Vizsgálatainkat krónikus variábilis stressznek kitett egereken végeztük, prebiotikumként pedig manno-oligoszacharidot használtunk. A kísérlet során viselkedés tesztet végeztünk, mértük a bélflóra összetételét béltartalomból, meghatároztuk a stresszhormonok szintjét, illetve mértük a bélszövet nyálkahártya vastagságát.

A Nyílt tér tesztben a vizsgált paraméterek nagy részét tekintve nem mutatkozott jelentős hatása a stressz és a prebiotikum kezelésnek, viszont a mozgással töltött idő tekintetében a stresszelt egerek által mutatott zavart magatartást a prebiotikumunk normalizálta. Az Emelt keresztpalló tesztben a stresszelt csoport által mutatott szorongásos viselkedést a prebiotikum jelentősen nem befolyásolta. A kortikoszteron és CRH mRNS mennyiséget vizsgálva a stressznek kitett csoportunk alacsony értékeket mutatott, míg a stressz + prebiotikum kezelés hatására magasabb értékek mutatkoztak, ám biológiailag ez nem volt releváns. A bél baktériumflórájának összetételét a stressz kezelés kedvezőtlen irányba befolyásolta, növelte a patogének számát és csökkentette a jótékony, kommenzalista baktériumok mennyiségét, azonban a prebiotikum kezelésünk képes volt ezeket a negatív hatásokat jelentősen csökkenteni.

Eredményeink azt mutatják, hogy a manno-oligoszacharid prebiotikum képes normalizálni illetve javítani a stressz okozta kedvezőtlen változások egy részét, mely felveti a lehetőségét, hogy a jövőben a prebiotikumok egyes stresszel kapcsolatos betegségek kiegészítő terápiájában használhatóak legyenek.

8. Summary

It has already proved that there is bidirectional communication between the brain and gut and also gut microbiota, because gutflora can affect several physiological aspects of the organism, respectively psychological factors and stress also have an impact on gut bacteria [1, 3].

In our experiment we examined, how can a prebiotic influence the adverse effects of stress, because prebiotics help to enhance the amounts of beneficial commensalists of gut, and these commensalists reduce the amounts of pathogens. In the study, we exposed mice to chronic variable stress and used a mannan-oligosaccharide prebiotic. We measured the level of anxiety by behavioral tests and also the composition of gutflora, we determined the levels of stress hormones, and also the mucosa thickness of gut tissue.

In the Open Field test, we did not find significant differences in most of the measured parameters, but in the time spent with movement the chronic stressed group exhibit flustered behaviour, which was normalized by using the prebiotic. The anxiety-like behavior, that chronic stressed group showed in the Elevated Plus Maze test, was not affected notably by the mannan-oligosaccharide prebiotic treatment. The stressed group exhibited lower levels of serum corticosterone and CRH mRNA levels, while the stressed and prebiotic treated group showed higher levels of these hormones, but these elevated levels were not biological relevant. The composition of gut flora was affected by chronic stress adversely, because it enhanced the amounts of pathogens, while reduced the numbers of beneficial commensalists, however the prebiotic treatment could reverse most of these negative effects of stress.

Our results indicate that the mannan-oligosaccharide prebiotic can normalize or ameliorate some adverse aspects of stress and these effects propose the chance to use prebiotics in stress-related disorders as a supplementary treatment in the future.

9. Irodalomjegyzék:

- [1] T. G. Dinan and J. F. Cryan, "Regulation of the stress response by the gut microbiota: implications for psychoneuroendocrinology," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 37, pp. 1369-78, Sep 2012.
- [2] P. B. Eckburg, E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, *et al.*, "Diversity of the human intestinal microbial flora," *Science*, vol. 308, pp. 1635-8, Jun 2005.
- [3] D. M. Saulnier, Y. Ringel, M. B. Heyman, J. A. Foster, P. Bercik, R. J. Shulman, *et al.*, "The intestinal microbiome, probiotics and prebiotics in neurogastroenterology," *Gut Microbes*, vol. 4, pp. 17-27, 2013 Jan-Feb 2013.
- [4] J. Szelényi and E. S. Vizi, "The catecholamine cytokine balance: interaction between the brain and the immune system," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1113, pp. 311-24, Oct 2007.
- [5] C. L. Raison, L. Capuron, and A. H. Miller, "Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression," *Trends Immunol*, vol. 27, pp. 24-31, Jan 2006.
- [6] H. O. Besedovsky and A. del Rey, "Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses," *Endocr Rev*, vol. 17, pp. 64-102, Feb 1996.
- [7] P. C. Konturek, T. Brzozowski, and S. J. Konturek, "Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options," *J Physiol Pharmacol*, vol. 62, pp. 591-9, Dec 2011.
- [8] W. Sutanto and E. R. de Kloet, "The use of various animal models in the study of stress and stress-related phenomena," *Lab Anim*, vol. 28, pp. 293-306, Oct 1994.
- [9] H. Selye, "The evolution of the stress concept," *Am Sci*, vol. 61, pp. 692-9, 1973 Nov-Dec 1973.
- [10] T. R. Insel, "From animal models to model animals," *Biol Psychiatry*, vol. 62, pp. 1337-9, Dec 2007.
- [11] N. Bhatia, P. P. Maiti, A. Choudhary, A. Tuli, D. Masih, M. M. U. Khan, *et al.*, "Animal models of stress," vol. 2, ed. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2011, pp. 1147-1155
- [12] M. U. Goebel, P. J. Mills, M. R. Irwin, and M. G. Ziegler, "Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production after acute psychological stress, exercise, and infused isoproterenol: differential effects and pathways," *Psychosom Med*, vol. 62, pp. 591-8, 2000 Jul-Aug 2000.
- [13] M. Maes, C. Song, A. Lin, R. De Jongh, A. Van Gastel, G. Kenis, *et al.*, "The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety," *Cytokine*, vol. 10, pp. 313-8, Apr 1998.
- [14] J. Fehér, I. Kovács, and B. G. Corrado, "A krónikus gyomor-bél gyulladások szerepe a depresszió kialakulásában és kezelésében," vol. 152, ed. Orvosi Hetilap, 2011, pp. 1477-1485.
- [15] J. F. Cryan and T. G. Dinan, "Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour," *Nat Rev Neurosci*, vol. 13, pp. 701-12, Oct 2012.
- [16] E. R. De Kloet, E. Vreugdenhil, M. S. Oitzl, and M. Joëls, "Brain corticosteroid receptor balance in health and disease," *Endocr Rev*, vol. 19, pp. 269-301, Jun 1998.

- [17] C. J. Cook, "Stress induces CRF release in the paraventricular nucleus, and both CRF and GABA release in the amygdala," *Physiol Behav*, vol. 82, pp. 751-62, Sep 2004.
- [18] C. O. Ladd, R. L. Huot, K. V. Thirivikraman, C. B. Nemeroff, and P. M. Plotsky, "Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation," *Biol Psychiatry*, vol. 55, pp. 367-75, Feb 2004.
- [19] S. C. Resta, "Effects of probiotics and commensals on intestinal epithelial physiology: implications for nutrient handling," *J Physiol*, vol. 587, pp. 4169-74, Sep 2009.
- [20] H. M. Gao, J. Jiang, B. Wilson, W. Zhang, J. S. Hong, and B. Liu, "Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease," *J Neurochem*, vol. 81, pp. 1285-97, Jun 2002.
- [21] M. C. Collado, M. Cernada, C. Bäuerl, M. Vento, and G. Pérez-Martínez, "Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages," *Gut Microbes*, vol. 3, pp. 352-65, 2012 Jul-Aug 2012.
- [22] L. C. Roger, A. Costabile, D. T. Holland, L. Hoyles, and A. L. McCartney, "Examination of faecal Bifidobacterium populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life," *Microbiology*, vol. 156, pp. 3329-41, Nov 2010.
- [23] D. B. DiGiulio, R. Romero, H. P. Amogan, J. P. Kusanovic, E. M. Bik, F. Gotsch, *et al.*, "Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation," *PLoS One*, vol. 3, p. e3056, 2008.
- [24] A. Spor, O. Koren, and R. Ley, "Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome," *Nat Rev Microbiol*, vol. 9, pp. 279-90, Apr 2011.
- [25] N. Sudo, Y. Chida, Y. Aiba, J. Sonoda, N. Oyama, X. N. Yu, *et al.*, "Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice," *J Physiol*, vol. 558, pp. 263-75, Jul 2004.
- [26] K. A. Verbeke, L. Boesmans, and E. Boets, "Modulating the microbiota in inflammatory bowel diseases: prebiotics, probiotics or faecal transplantation?," *Proc Nutr Soc*, vol. 73, pp. 490-7, Nov 2014.
- [27] J. Penders, E. E. Stobberingh, P. A. van den Brandt, and C. Thijs, "The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders," *Allergy*, vol. 62, pp. 1223-36, Nov 2007.
- [28] S. de Kivit, M. C. Tobin, C. B. Forsyth, A. Keshavarzian, and A. L. Landay, "Regulation of Intestinal Immune Responses through TLR Activation: Implications for Pro- and Prebiotics," *Front Immunol*, vol. 5, p. 60, 2014.
- [29] H. M. Wexler, "Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty," *Clin Microbiol Rev*, vol. 20, pp. 593-621, Oct 2007.
- [30] A. A. Salyers, "Bacteroides of the human lower intestinal tract," *Annu Rev Microbiol*, vol. 38, pp. 293-313, 1984.
- [31] H. L. Qin, T. Y. Shen, Z. G. Gao, X. B. Fan, X. M. Hang, Y. Q. Jiang, *et al.*, "Effect of lactobacillus on the gut microflora and barrier function of the rats with abdominal infection," *World J Gastroenterol*, vol. 11, pp. 2591-6, May 2005.
- [32] Å. Ljungh and T. Wadström, "Lactobacillus Molecular Biology: From Genomics to Probiotics," ed. Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2009.

- [33] D. Hentges and S. Baron, "*Anaerobes: General Characteristics*, in *Medical Microbiology*," ed. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas, 1996.
- [34] M. Ventura, C. Canchaya, A. Tauch, G. Chandra, G. F. Fitzgerald, K. F. Chater, *et al.*, "Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum," *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 71, pp. 495-548, Sep 2007.
- [35] G. R. Gibson and M. B. Roberfroid, "Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics," *J Nutr*, vol. 125, pp. 1401-12, Jun 1995.
- [36] R. S. Gupta, "The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes," *FEMS Microbiol Rev*, vol. 24, pp. 367-402, Oct 2000.
- [37] K. Papadimitriou, G. Zoumpopoulou, B. Foligné, V. Alexandraki, M. Kazou, B. Pot, *et al.*, "Discovering probiotic microorganisms: in vitro, in vivo, genetic and omics approaches," *Front Microbiol*, vol. 6, p. 58, 2015.
- [38] G. R. Gibson, H. M. Probert, J. V. Loo, R. A. Rastall, and M. B. Roberfroid, "Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics," *Nutr Res Rev*, vol. 17, pp. 259-75, Dec 2004.
- [39] T. G. Dinan and E. M. Quigley, "Probiotics in the treatment of depression: science or science fiction?," *Aust N Z J Psychiatry*, vol. 45, pp. 1023-5, Dec 2011.
- [40] L. O'Mahony, J. McCarthy, P. Kelly, G. Hurley, F. Luo, K. Chen, *et al.*, "Lactobacillus and bifidobacterium in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles," *Gastroenterology*, vol. 128, pp. 541-51, Mar 2005.
- [41] M. Messaoudi, R. Lalonde, N. Violle, H. Javelot, D. Desor, A. Nejdi, *et al.*, "Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (Lactobacillus helveticus R0052 and Bifidobacterium longum R0175) in rats and human subjects," *Br J Nutr*, vol. 105, pp. 755-64, Mar 2011.
- [42] J. Bravo and M. Chew, "The probiotic Lactobacillus reuteri induces constitutive changes in central GABA receptor expression," ed. SFN 795.17/FFF2., 2010.
- [43] J. A. Bravo, P. Forsythe, M. V. Chew, E. Escaravage, H. M. Savignac, T. G. Dinan, *et al.*, "Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 108, pp. 16050-5, Sep 2011.
- [44] C. A. Akdis and M. Akdis, "Mechanisms of allergen-specific immunotherapy," *J Allergy Clin Immunol*, vol. 127, pp. 18-27; quiz 28-9, Jan 2011.
- [45] G. Boehm, B. Stahl, J. Jelinek, J. Knol, V. Miniello, and G. E. Moro, "Prebiotic carbohydrates in human milk and formulas," *Acta Paediatr Suppl*, vol. 94, pp. 18-21, Oct 2005.
- [46] D. Paineau, F. Payen, S. Panserieu, G. Coulombier, A. Sobaszek, I. Lartigau, *et al.*, "The effects of regular consumption of short-chain fructo-oligosaccharides on digestive comfort of subjects with minor functional bowel disorders," *Br J Nutr*, vol. 99, pp. 311-8, Feb 2008.
- [47] D. B. Silk, A. Davis, J. Vulevic, G. Tzortzis, and G. R. Gibson, "Clinical trial: the effects of a trans-galactooligosaccharide prebiotic on faecal microbiota and symptoms in irritable bowel syndrome," *Aliment Pharmacol Ther*, vol. 29, pp. 508-18, Mar 2009.
- [48] F. Depeint, G. Tzortzis, J. Vulevic, K. I'anson, and G. R. Gibson, "Prebiotic evaluation of a novel galactooligosaccharide mixture produced by the enzymatic activity of Bifidobacterium bifidum NCIMB 41171, in healthy humans: a

- randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled intervention study," *Am J Clin Nutr*, vol. 87, pp. 785-91, Mar 2008.
- [49] F. Solis de los Santos, A. M. Donoghue, M. B. Farnell, G. R. Huff, W. E. Huff, and D. J. Donoghue, "Gastrointestinal maturation is accelerated in turkey poultlets supplemented with a mannan-oligosaccharide yeast extract (Alphamune)," *Poult Sci*, vol. 86, pp. 921-30, May 2007.
- [50] G. B. Kim, Y. M. Seo, C. H. Kim, and I. K. Paik, "Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers," *Poult Sci*, vol. 90, pp. 75-82, Jan 2011.
- [51] "Inbred Strains of Mice: C57BL," ed. Mouse Genome Informatics <http://www.informatics.jax.org/external/festing/mouse/docs/C57BL.shtml>, 1998.
- [52] T. Strekalova, Y. Couch, N. Kholod, M. Boyks, D. Malin, P. Leprince, *et al.*, "Update in the methodology of the chronic stress paradigm: internal control matters," *Behav Brain Funct*, vol. 7, p. 9, 2011.
- [53] D. Engber, "The Trouble With Black-6," ed. http://www.slate.com/articles/health_and_science/the_mouse_trap/2011/11/black_6_lab_mice_and_the_history_of_biomedical_research.html, 2011.
- [54] M. T. Jones and B. Gillham, "Factors involved in the regulation of adrenocorticotrophic hormone/beta-lipotrophic hormone," *Physiol Rev*, vol. 68, pp. 743-818, Jul 1988.
- [55] R. J. Katz, "Animal models and human depressive disorders," *Neurosci Biobehav Rev*, vol. 5, pp. 231-46, 1981.
- [56] A. C. Campos, M. V. Fogaça, D. C. Aguiar, and F. S. Guimarães, "Animal models of anxiety disorders and stress," *Rev Bras Psiquiatr*, vol. 35 Suppl 2, pp. S101-11, 2013.
- [57] M. Razzoli, L. Carboni, M. Andreoli, A. Ballottari, and R. Arban, "Different susceptibility to social defeat stress of BalbC and C57BL6/J mice," *Behav Brain Res*, vol. 216, pp. 100-8, Jan 2011.
- [58] N. N. Kudryavtseva, I. V. Bakshtanovskaya, and L. A. Koryakina, "Social model of depression in mice of C57BL/6J strain," *Pharmacol Biochem Behav*, vol. 38, pp. 315-20, Feb 1991.
- [59] A. Can, D. T. Dao, M. Arad, C. E. Terrillion, S. C. Piantadosi, and T. D. Gould, "The mouse forced swim test," *J Vis Exp*, p. e3638, 2012.
- [60] S. Kasuga, M. Ushijima, N. Morihara, Y. Itakura, and Y. Nakata, "[Effect of aged garlic extract (AGE) on hyperglycemia induced by immobilization stress in mice]," *Nihon Yakurigaku Zasshi*, vol. 114, pp. 191-7, Sep 1999.
- [61] S. Nicholson, J. H. Lin, S. Mahmoud, E. Campbell, B. Gillham, and M. Jones, "Diurnal variations in responsiveness of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis of the rat," *Neuroendocrinology*, vol. 40, pp. 217-24, Mar 1985.
- [62] T. A. Kosten and P. Kehoe, "Neonatal isolation is a relevant model for studying the contributions of early life stress to vulnerability to drug abuse: response to Marmendal *et al.* (2004)," *Dev Psychobiol*, vol. 47, pp. 108-10, Sep 2005.
- [63] M. Denda, T. Tsuchiya, J. Hosoi, and J. Koyama, "Immobilization-induced and crowded environment-induced stress delay barrier recovery in murine skin," *Br J Dermatol*, vol. 138, pp. 780-5, May 1998.
- [64] L. Prut and C. Belzung, "The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review," *Eur J Pharmacol*, vol. 463, pp. 3-33, Feb 2003.

- [65] D. N. Fredricks and D. A. Relman, "Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases," *Clin Infect Dis*, vol. 29, pp. 475-86; quiz 487-8, Sep 1999.
- [66] W. F. Doolittle, "Phylogenetic classification and the universal tree," *Science*, vol. 284, pp. 2124-9, Jun 1999.
- [67] J. B. Patel, "16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory," *Mol Diagn*, vol. 6, pp. 313-21, Dec 2001.
- [68] R. Diaz Heijtz, S. Wang, F. Anuar, Y. Qian, B. Björkholm, A. Samuelsson, *et al.*, "Normal gut microbiota modulates brain development and behavior," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 108, pp. 3047-52, Feb 2011.
- [69] A. Schousboe and H. S. Waagepetersen, "GABA: homeostatic and pharmacological aspects," *Prog Brain Res*, vol. 160, pp. 9-19, 2007.
- [70] J. F. Cryan and K. Kaupmann, "Don't worry 'B' happy!: a role for GABA(B) receptors in anxiety and depression," *Trends Pharmacol Sci*, vol. 26, pp. 36-43, Jan 2005.
- [71] L. Desbonnet, L. Garrett, G. Clarke, J. Bienenstock, and T. G. Dinan, "The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat," *J Psychiatr Res*, vol. 43, pp. 164-74, Dec 2008.
- [72] M. Lyte, W. Li, N. Opitz, R. P. Gaykema, and L. E. Goehler, "Induction of anxiety-like behavior in mice during the initial stages of infection with the agent of murine colonic hyperplasia *Citrobacter rodentium*," *Physiol Behav*, vol. 89, pp. 350-7, Oct 2006.
- [73] K. Pacák, R. Kvetnanský, M. Palkovits, K. Fukuhara, G. Yadid, I. J. Kopin, *et al.*, "Adrenalectomy augments in vivo release of norepinephrine in the paraventricular nucleus during immobilization stress," *Endocrinology*, vol. 133, pp. 1404-10, Sep 1993.
- [74] W. A. Petri, M. Miller, H. J. Binder, M. M. Levine, R. Dillingham, and R. L. Guerrant, "Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development," *J Clin Invest*, vol. 118, pp. 1277-90, Apr 2008.
- [75] M. T. Bailey, S. E. Dowd, J. D. Galley, A. R. Hufnagle, R. G. Allen, and M. Lyte, "Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation," *Brain Behav Immun*, vol. 25, pp. 397-407, Mar 2011.
- [76] G. C. Parkes, N. B. Rayment, B. N. Hudspith, L. Petrovska, M. C. Lomer, J. Brostoff, *et al.*, "Distinct microbial populations exist in the mucosa-associated microbiota of sub-groups of irritable bowel syndrome," *Neurogastroenterol Motil*, vol. 24, pp. 31-9, Jan 2012.
- [77] T. Ryuichiro, T. Hiroo, MorotomiMasami, K. Toshikata, U. Sadao, M. Keisuke, *et al.*, "Effects of administration of TOS and *Bifidobacterium breve* 4006 on human fecal flora," vol. 2, ed. *Bifidobacteria Microflora*, 1983, pp. 17-24.
- [78] S. M. Finegold, S. E. Dowd, V. Gontcharova, C. Liu, K. E. Henley, R. D. Wolcott, *et al.*, "Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children," *Anaerobe*, vol. 16, pp. 444-53, Aug 2010.
- [79] M. Venihaki, A. Gravanis, and A. N. Margioris, "Comparative study between normal rat chromaffin and PC12 rat pheochromocytoma cells: production and effects of corticotropin-releasing hormone," *Endocrinology*, vol. 138, pp. 698-704, Feb 1997.
- [80] M. J. Owens and C. B. Nemeroff, "Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor," *Pharmacol Rev*, vol. 43, pp. 425-73, Dec 1991.

Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném megköszönni a témavezetőimnek, Dr. Kovács Krisztinának és dr. Ferenczi Szilamérnek, hogy lehetőséget kaptam, hogy munkámat a kutatócsoportjukban végezhessem és segítséget nyújtottak, mind a témaválasztásban, mind a módszerek elsajátításában, színvonalas felkészítésemben. Köszönettel tartozom továbbá az MTA Kísérleti Orvostudományi Intézet Molekuláris Neuroendokrinológia csoport további tagjainak, Kuti Dánielnek, Polyák Ágnesnek és Winkler Zsuzsannának, hogy kérdéseimmel bármikor bizalommal fordulhattam hozzájuk, emellett segítettek a módszerek elsajátításában és a kísérlet lebonyolításában.