

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**FLAVONOIDOK HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA *IN VITRO*
SERTÉS GYOMOR-BÉLFERTŐZÉS MODELLEKBEN**

Dr. Kovács Dóra

Témavezetők: Dr. Farkas Orsolya

Dr. Jerzsele Ákos



ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Állatorvostudományi Doktori Iskola

Budapest, 2022

Témavezetők

.....

Dr. Farkas Orsolya

Tudományos főmunkatárs

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, Állatorvostudományi Egyetem

.....

Dr. Jerzsele Ákos

Egyetemi docens, tanszékvezető

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, Állatorvostudományi Egyetem

Készült 8 példányban. Ez a(z) számú példány.

.....

Dr. Kovács Dóra

Tartalomjegyzék

1. A doktori értekezés előzményei és célkitűzései	4
2. Az értekezés új tudományos eredményei	6
3. A doktori értekezés témájában született publikációk	7

1. A doktori értekezés előzményei és célkitűzései

Az antimikrobiális rezisztencia (AMR) a XXI. század egyik vezető humán- és állategészségügyi problémája, amely területek elválaszthatatlanul kapcsolódnak egymáshoz az AMR kialakulása és leküzdése szempontjából. Az AMR kifejezés magában foglalja bármely mikroorganizmusban az ellene használt kemoterapeutikummal szemben kialakuló ellenállást, de leggyakrabban a baktériumokban antibiotikumokkal szemben megjelenő rezisztenciát értjük a kifejezés alatt. Az antibiotikumokra rezisztens baktériumok széleskörű előfordulása, különösen a multirezisztens (multidrug-resistant, MDR, azaz több hatóanyaggal szemben egyaránt ellenálló) kórokozók jelenléte nagymértékben megnehezíti az általuk okozott fertőzések gyógykezelését, és a betegség mortalitásának növekedéséhez vezethet.

A bakteriális AMR kialakulásának hátterében a túlzott és helytelen antibiotikum használat áll, amely a humán- és állatorvoslás területein egyaránt megfigyelhető, így a probléma visszaszorításához is elengedhetetlen a két oldal összefogása, és közös, tudományterületeken átívelő intézkedések végrehajtása (“Egy Egészség”, “One Health” megközelítés). Kiemelt figyelmet érdemel a haszonállatokban történő antibiotikum felhasználás, amely összefüggést mutat az emberekben tapasztalt rezisztens baktériumok előfordulásával, elsősorban az állati eredetű élelmiszerekkel történő terjedés következményeként. Sertésekben az *Escherichia coli* és *Salmonella* fajok által okozott gyomor-bélrendszeri fertőzések nagy jelentőséggel bírnak, mivel mindkét patogén széleskörűen előfordul, potenciálisan zoonótikus, és igen hajlamos rezisztencia kialakítására. Az általuk okozott fertőzések így gyakran nehezen kezelhetők, és közegészségügyi jelentőséggel is bírnak az élelmiszerlánccal való terjedés lehetősége miatt.

Az AMR leküzdésére számos stratégia született, amelyek közé tartozik az antibiotikum alternatívák kutatása. Ezen vegyületek önállóan, vagy antibiotikumokkal kombinációban alkalmasak lehetnek bakteriális fertőzések kezelésére és/vagy megelőzésére. Az antibiotikum alternatívák nagy csoportjába sorolhatók többek között a flavonoidok, amelyek növényi eredetű bioaktív anyagok számos, emberi és állati egészségre gyakorolt jótékony hatással.

Jelen kutatás célja az volt, hogy megvizsgáljuk egyes flavonoidok – szőlőmag oligomer proantocianidinek (GSOP) és luteolin (LUT) – hatékonyságát sertések zoonótikus baktériumok (*E. coli* és *S. enterica* ser. Typhimurium) okozta gyomor-bélfertőzéseit modellező *in vitro* rendszerekben, ezáltal képet kapva lehetséges alkalmazhatóságukról, mint takarmánykiegészítők sertések bakteriális bélfertőzéseinek megelőzésére és kezelésére.

Elsőként megvizsgáltuk a flavonoidok sejtelképességre kifejtett hatását IPEC-J2 sertés vékonybélhám sejteken, hogy meghatározzuk a biztonságosan alkalmazható koncentrációikat (Neutral Red festés). Ezt követően a bélhámsejteket bakteriális (*E. coli* és *S. Typhimurium* eredetű) endotoxinnal (lipopoliszacharid, LPS) kezeltük, és vizsgáltuk a flavonoidok antioxidáns hatását az LPS által kiváltott oxidatív stresszel szemben (dikloro-dihidro-fluoreszcein diacetát [DCFH-DA] és Amplex Red módszerek). Gram-negatív baktériumok által okozott fertőzések során az endotoxin jelenléte súlyosbíthatja a tüneteket, különösen, amikor antibiotikus kezelés során nagy mennyiségben szabadul fel. A tesztelt flavonoidokat különböző koncentrációkban alkalmaztuk LPS-sel kombinációban, hogy vizsgáljuk a hatásuk esetleges koncentráció-függését.

Ezt követően meghatároztuk a flavonoidok minimális gátló koncentrációját (MIC érték) sertésből származó, klinikai *E. coli* és *S. Typhimurium* izolátumokban, hogy megvizsgáljuk esetleges bakteriosztatikus hatásukat (mikrohígítási módszer). Teszteltük továbbá, hogy mutatnak-e bármilyen interakciót (szinergizmus, antagonista vagy semleges hatás) három, sertésekben gyakran használt antibiotikummal (amoxicillin, gentamicin, enrofloxacin) együttesen alkalmazva (kereszt-hígítási módszer). Ezek a szerek hatékonyak lehetnek *E. coli* és *S. Typhimurium* fertőzések esetén, és mind a humán, mind pedig állatgyógyászatban széleskörűen használtak, de a rezisztencia gyakori velük szemben.

A kutatás harmadik fázisában kialakítottunk egy ko-kultúra modellt, amelyben IPEC-J2 sejteket sertésből izolált *E. coli* és *S. Typhimurium*mal fertőztünk, és vizsgáltuk a GSOP és a LUT jótékony hatásait a kórokozókkal szemben. A flavonoidokat ebben az esetben is különböző koncentrációkban teszteltük, valamint vizsgáltuk azt is, hogy a fertőzés előtt, azzal egyidőben, vagy utólagosan alkalmazva hogyan alakul a hatásuk, ezzel modellezve lehetséges használatukat megelőzési és/vagy kezelési célokra sertések bakteriális bélfertőzéseinek esetén. Teszteltük hatásukat a sejtek reaktív oxigén- és nitrogén-specifikus (DCFH-DA és Amplex Red módszerek), valamint interleukin-6 és interleukin-8 (IL-6, -8) szintjére (enzimhez kötött immunoszorbens próba [ELISA]) a bakteriális fertőzések által okozott káros hatások esetén. Ezeket túl vizsgáltuk a GSOP és a LUT esetleges védőhatását a kórokozók által kiváltott bélbarrier károsodással szemben (fluoreszcein-izotiocianát-dextrán [FD4] próba), valamint, hogy képesek-e gátolni a baktériumok IPEC-J2 sejtekhez történő tapadását (telepformáló egység [CFU] számlálás).

Köszönhetően a vizsgált kórokozók potenciálisan zoonótikus mivoltának, eredményeink nem csak az állatorvoslás, hanem a humán egészségügy számára is hasznosak lehetnek a jövőben.

2. Az értekezés új tudományos eredményei

Jelen kutatás során elsőként vizsgáltuk a szőlőmag oligomer proantocianidinek (GSOP) és a luteolin (LUT) jótékony hatásait bakteriális endotoxinnal (LPS) kezelt IPEC-J2 sertés vékonybélhám sejtekben, valamint IPEC-J2 – baktérium ko-kultúrában (azaz IPEC-J2 sejteket *Escherichia coli* és *Salmonella enterica* ser. Typhimurium baktériumokkal fertőzve). Ezen túl teszteltük a flavonoidok antibakteriális hatását és esetleges antibiotikumokkal mutatott interakcióit sertésből származó, klinikai *E. coli* és *S. Typhimurium* izolátumokon.

A kutatás főbb eredményei a következők:

1. Sem a GSOP (200 µg/ml koncentrációig), sem pedig a LUT (100 µg/ml-ig) nem mutatott citotoxikus hatást IPEC-J2 sertés vékonybélhám sejteken 1, 12 és 24 órás kezelési idők alatt.
2. A GSOP és a LUT egyaránt csökkenteni tudták az IPEC-J2 sejtekben kiváltott oxidatív stresszt (intracelluláris reaktív oxigénszármazékok szintjét) *E. coli* (O111:B4, O127:B8) és *S. Typhimurium* eredetű LPS-sel, valamint *E. coli* és *S. Typhimurium in vitro* fertőzéssel szemben.
3. A GSOP és a LUT – bizonyos kezelési módokon alkalmazva – csökkenteni tudták az IPEC-J2 sejtekben *E. coli* és *S. Typhimurium in vitro* fertőzés által okozott gyulladást (interleukin-6 és interleukin-8 szinteket) és bélbarrier károsodást.
4. A GSOP gátolni tudta az *E. coli* és *S. Typhimurium* baktériumok IPEC-J2 sejtekhez való tapadását, míg a LUT nem mutatott adhéziógátló hatást egyik kórokozóval szemben sem.
5. A GSOP minimális gátló koncentrációja (MIC értéke) minden vizsgált, sertés eredetű, klinikai *E. coli* és *S. Typhimurium* izolátum esetén 2048 µg/ml-nek bizonyult, míg a LUT bakteriosztatikus hatása ugyanezen baktériumok esetén már 256 µg/ml-es koncentrációnál megmutatkozott. Sem a GSOP, sem pedig a LUT jelenléte nem befolyásolta a tesztelt antibiotikumok (amoxicillin, gentamicin, enrofloxacin) hatékonyságát ugyanezen baktériumok esetén (az átlagos frakcionált gátló koncentráció [FIC] indexek értéke 1.0000 és 1.4375 között alakult).

Eredményeink alapján a GSOP és a LUT potenciális antibiotikum alternatívák, amelyek a jövőben takarmánykiegészítőként alkalmazva hatékonyak lehetnek sertések *E. coli* és *S. Typhimurium* által okozott gyomor-bélfertőzéseinek megelőzésére és/vagy kezelésére.

3. A doktori értekezés témájában született publikációk

Lektorált folyóiratban megjelent közlemények

Kovács D., Palkovicsné Pézsa N., Jerzsele Á., Süth M., Farkas O.: **Protective Effects of Grape Seed Oligomeric Proanthocyanidins in IPEC-J2-*Escherichia coli*/Salmonella Typhimurium Co-Culture**, Antibiotics (Basel), 11(1). 110, 2022.

Kovács D., Karancsi Z., Farkas O., Jerzsele Á.: **Antioxidant activity of flavonoids in LPS-treated IPEC-J2 porcine intestinal epithelial cells and their antibacterial effect against bacteria of swine origin**, Antioxidants, 9(12). 1267, 2020.

Kovács D., Palkovicsné Pézsa N., Farkas O., Jerzsele Á.: **Antibiotikum-alternatívák a sertéstartásban**, Magyar Állatorvosok Lapja, 143. 281-292, 2021.

Kovács D., Karancsi Z., Palkovicsné Pézsa N., Jerzsele Á., Farkas O.: **Polifenolok bélhámra gyakorolt antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatásának modellezése**, Új Diéta: A Magyar Dietetikusok Lapja, 30. 10–13, 2021.

Kovács D., Karancsi Z., Palkovicsné Pézsa N., Farkas O.: **Bélhámsejt-modell gyulladáscsökkentő és antioxidáns hatású anyagok vizsgálatára**. In: Poór P., Mézes M., Blázovics A.: Oxidatív stressz és antioxidáns védekezés a növényvilágtól a klinikumig. Budapest, Magyarország, Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság, 218. 136-145, 2020.

Konferencia prezentációk

Kovács D., Palkovicsné Pézsa N., Jerzsele Á., Farkas O.: **Szőlőmag proantocianidinek hatásai sertés bélhámsejt – baktérium kokultúrában**. MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Hungary, 2022.

Kovács D., Karancsi Z., Palkovicsné Pézsa N., Farkas O., Jerzsele Á.: **Baktérium-bélhámsejt ko-kultúra létrehozása a bakteriális eredetű bélhámkárosodás, valamint potenciális antibiotikum alternatívák tanulmányozására**. MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Hungary, 2021.

Kovács D., Karancsi Z., Farkas O., Jerzsele Á.: **Proantocianidinek használata sertések bakteriális bélfertőzéseiben**. MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Hungary, 2020.