

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**

**PROBIOTIKUMOK HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA SERTÉS BÉLHÁMSEJT  
TENYÉSZETEN**

Palkovicsné Pézsa Nikolett

Témavezetők: Dr. Farkas Orsolya

Prof. Dr. Rác Bence



**ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM**

Állatorvostudományi Doktori Iskola

Budapest, 2023

## **Témavezetők**

.....

### **Dr. Farkas Orsolya**

Tudományos főmunkatárs

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, Állatorvostudományi Egyetem

.....

### **Prof. Dr. Rácz Bence**

Egyetemi tanár

Anatómiai és Szövettani Tanszék, Állatorvostudományi Egyetem

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

.....

### **Palkovicsné Pézsa Nikolett**

## **Tartalomjegyzék**

|   |   |   |
|---|---|---|
| 1 | A doktori értekezés előzményei és célkitűzései .....      | 4 |
| 2 | Az értekezés új tudományos eredményei .....               | 6 |
| 3 | A doktori értekezés témájában született publikációk ..... | 8 |

# 1 A doktori értekezés előzményei és célkitűzései

A világ népességének növekedésével egyidejűleg nő az igény az állati eredetű élelmiszerek, és ezen belül a sertéshús iránt is. A sertések *Escherichia coli* (*E. coli*) és *Salmonella* törzsek által kiváltott emésztőrendszeri megbetegedése súlyos gazdasági károkat okozhat és gyakran antibiotikus kezelést igényel. A múltban a sertéságazat nagymértékben az antibiotikumok profilaktikus és metafilaktikus alkalmazására támaszkodott a bélrendszeri betegségek leküzdése során. Az antibiotikumok nem körültekintően történő alkalmazása azonban antibiotikum-rezisztencia kialakulásához vezethet, valamint antibiotikummaradványok jelenhetnek meg az élelmiszerláncban, ezzel veszélyeztetve az emberek egészségét is. Következésképpen a sertéságazat számára kulcsfontosságúvá vált, hogy olyan takarmány-adalékanyagokat keressen, amelyek hozzájárulhatnak a bélrendszer egészségéhez. A probiotikumok ígéretes jelöltek erre a célra. A probiotikumok hatása összetett, a pontos mechanizmusukat széles körben tanulmányozták, de még mindig sok nyitott kérdés maradt. A probiotikus baktériumok által kifejtett jótékony hatások között szerepel a kórokozók tapadásának gátlása, a hősokkfehérjék stimulálása, a citokintermelés megváltoztatása, antioxidáns tulajdonságok és a barrierfunkció fokozása. Kutatásunk során négy probiotikum; *Enterococcus faecium* (*E. faecium*), *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*), *Bacillus licheniformis* (*B. licheniformis*) és *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), illetve sejtmentes felülúszóik hatását vizsgáltuk bélfertőzést modellező *in vitro* rendszerben. A bélfertőzést két, gazdasági szempontból is fontos sertés patogénnel *E. coli* és *S. enterica* serovar Typhimuriummal (*S. Typhimurium*), illetve *S. Typhimurium* vagy *E. coli* eredetű lipopoliszacchriddal (LPS) váltottuk ki.

Elsőként meghatároztuk az optimális kezelési feltételeket a kísérleteinkhez. A probiotikumokból készült sejtmentes felülúszók és sejtszuszpenziók sertés bélhámsejtek (IPEC-J2) életképességére gyakorolt hatását vizsgáltuk (Neutral Red módszer).

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy az *E. faecium*, a *L. rhamnosus*, a *B. licheniformis* és a *B. subtilis* sejtmentes felülúszók képesek-e jótékony hatásokat elérni. Az IPEC-J2 sejteket három különböző típusú LPS-sel (*S. Typhimurium* LPS, *E. coli* O111:B4 LPS és *E. coli* O127:B8 LPS) valamint *E. faecium*, *L. rhamnosus*, *B. licheniformis* és *B. subtilis* sejtmentes felülúszókkal kezeltük. A reaktív oxigénszármazékok (ROS) termelésére gyakorolt hatást

diklór-dihidrofluorescein-diacetát (DCFH-DA) módszerrel mértük, és meghatároztuk a sejtmertes felülúszók antioxidáns kapacitását. A felülúszók potenciális antibakteriális tulajdonságát sertés eredetű *E. coli* és *S. Typhimurium* izolátumokkal szemben vizsgáltuk (mikrodilúciós módszer).

A kutatás harmadik fázisában egy ko-kultúra modellt hoztunk létre; az IPEC-J2 sejteket sertésből izolált *E. coli* és *S. Typhimurium*mal fertőztük meg és vizsgáltuk az *E. faecium*, a *L. rhamnosus*, a *B. licheniformis* és a *B. subtilis* jótékony hatását a patogén baktériumok okozta károsodások ellen. Különböző kezelési körülményeket alkalmaztunk: az előkezelés során az IPEC-J2 sejtek probiotikummal történő kezelése megelőzte a patogén baktériumokkal történő kezelést; egyidejű kezeléskor a probiotikumot és a patogén baktériumot egyidőben adtuk az IPEC-J2 sejtekhez, míg az utókezelés során a korokozó baktériummal történő kezelés előzte meg a probiotikumokkal történő kezelést. Az elő-, egy-, ill. utóidejű kezeléssel modelleztük a probiotikumok megelőzési, illetve kezelési céllal történő lehetséges alkalmazhatóságát. Teszteltük a probiotikumok hatását a paracelluláris permeabilitásra (fluoreszcein-izotiocianát-dextrán [FD4] módszer), az IL-6, ill. IL-8 gyulladáscitokinek szintjére (ELISA módszer), valamint a ROS-termelésre (DCFH-DA módszer) *E. coli*, ill. *S. Typhimurium* fertőzések által előidézett károsodások esetén. Vizsgáltuk továbbá, hogy a probiotikumok képesek-e gátolni a baktériumok IPEC-J2 sejtekhez történő tapadását (telepformáló egység [CFU] számlálás).

A probiotikumok jótékony hatásait széles körben tanulmányozták, azonban ezek törzs/faj-specifikusak, másképpen fogalmazva az ígéretes hatásokat minden egyes probiotikus törzs/faj esetében meg kell határozni. Kutatásunk jelentősen hozzájárul a probiotikum-specifikus potenciálisan előnyös hatások feltérképezéséhez. Eredményeink alapul szolgálhatnak további, sertéseken végzett *in vivo* vizsgálatokhoz. Továbbá, tekintettel az emberi és a sertés bélrendszer közötti hasonlóságokra, eredményeink hozzájárulhatnak a probiotikumok humán egészségügyben való alkalmazásához is.

## 2 Az értekezés új tudományos eredményei

Elsőként vizsgáltuk átfogóan IPEC-J2 sejteken az *E. faecium*, *L. rhamnosus*, *B. licheniformis* és *B. subtilis* jótékony hatását. Teszteltük a probiotikumok sejtmentes felülúszóinak antioxidáns hatásait LPS által indukált oxidatív károsodás esetén és vizsgáltuk az felülúszók antimikrobiális aktivitását több sertés eredetű *E. coli* és *S. Typhimurium* izolátummal szemben. Ezen túl IPEC-J2—baktérium kokultúra modellben (azaz IPEC-J2 sejteket *Escherichia coli* és *Salmonella enterica* ser. Typhimurium baktériumokkal fertőzve) vizsgáltuk a probiotikumok hatását az intracelluláris ROS-termelésre, az IL-6, ill. IL-8 gyulladáscitokinek szintjére, a paracelluláris permeabilitásra és a patogén baktériumok adhéziójának gátlására.

### A kutatás főbb eredményei a következők:

1. Az *E. faecium*, *L. rhamnosus*, *B. licheniformis* és *B. subtilis* fajspecifikus módon befolyásolja az IPEC-J2 sejtek életképességét. Az *E. faecium*, *L. rhamnosus*, *B. licheniformis* és *B. subtilis* sejtmentes felülúszók (6%-os koncentrációban 1 órán keresztül alkalmazva) és az *E. faecium*, *L. rhamnosus*, *B. licheniformis* és *B. subtilis* sejtuszpenziók ( $10^8$  CFU/ml-es koncentrációban 1 órán keresztül alkalmazva) nem gyakorolnak citotoxikus hatást az IPEC-J2 sejtekre.
2. A *B. licheniformis* és a *B. subtilis* sejtmentes felülúszók intracelluláris reaktív oxigénszármazékok szintjét csökkentő hatása független az oxidatív stressz kiváltásához használt LPS típusától. Az *E. faecium*, *L. rhamnosus* sejtmentes felülúszók intracelluláris reaktív oxigénszármazékok szintjét csökkentő hatása függ az oxidatív stressz kiváltására alkalmazott LPS alkalmazott típusától.
3. A probiotikus baktériumsuszpenziók hatása az IPEC-J2 sejtek barrier integritására fajspecifikus; a *L. rhamnosus* fokozza, a *B. subtilis* csökkenti, míg az *E. faecium* és a *B. licheniformis* nem befolyásolja szignifikánsan a barrier integritást. Az *E. faecium* és a *L. rhamnosus* képes ellensúlyozni az IPEC-J2 sejtek barrier károsodását, függetlenül a barrier integritás károsodását kiváltó ágens típusától (*E. coli* vagy *S. Typhimurium*) és a probiotikum hozzáadásának idejétől (elő/egy/utóidejű kezelés).

A *B. licheniformis* és a *B. subtilis* nem fejt ki jótékony hatást az IPEC-J2 sejtek *E. coli* vagy *S. Typhimurium* által okozott barrier károsodásával szemben.

4. AZ IPEC-J2 sejtekben *S. Typhimurium*mal kiváltott gyulladás esetében az *E. faecium*mal, a *L. rhamnosus*szal, a *B. licheniformis*szal és a *B. subtilis*szal történő egyes kezelések gyulladáscsökkentő hatással (csökkent IL-6 és IL-8 szint) rendelkeznek. A probiotikumok hatása az IPEC-J2 sejtek gyulladássalos válaszára fajspecifikus, és függ a vizsgált gyulladássalos citokin típusától, valamint a gyulladással kiváltására használt kórokozótól típusától (*E. coli* vagy *S. Typhimurium*) is. A probiotikumok hozzáadásának időpontja szintén befolyásolja a gyulladáscsökkentő hatást.
5. IPEC-J2 sejtekben az *E. faecium*, *L. rhamnosus*, *B. licheniformis* és *B. subtilis* általános intracelluláris ROS-csökkentő hatással rendelkezik, mely hatás nem fajspecifikus és független az oxidatív stressz okozójától (*E. coli* vagy *S. Typhimurium*).
6. A hozzáadás időpontjától (elő-, egy-, utóidejű kezelés) függetlenül mind az *E. coli*, mind a *S. Typhimurium* IPEC-J2 sejtekhez való tapadását az *E. faecium*, a *L. rhamnosus* és a *B. licheniformis* szignifikánsan gátolja. A *B. subtilis* patogén adhéziót gátló tulajdonsága függ az alkalmazott patogén baktériumok típusától.

Eredményeink alapján az *E. faecium*, a *L. rhamnosus*, a *B. licheniformis* és a *B. subtilis* ígéretes takarmány adalékanyagoknak bizonyulnak, amelyek hozzájárulhatnak az *E. coli* vagy *S. Typhimurium* által kiváltott emésztőrendszeri betegségek megelőzéséhez és kezeléséhez.

### 3 A doktori értekezés témájában született publikációk

#### Lektorált folyóiratban megjelent közlemények

Palkovicsné Pézsa N., Kovács D., Rácz B., Farkas O.: **Effects of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* on gut barrier function, proinflammatory response, ROS production and pathogen inhibition properties in IPEC-J2 — *Escherichia coli*/*Salmonella* Typhimurium co-culture**, *Microorganisms*, 10. 936, 2022.

Palkovicsné Pézsa N., Kovács D., Gálfi P., Rácz B., Farkas O.: **Effect of *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 on gut barrier function, internal redox state, proinflammatory response and pathogen inhibition properties in porcine intestinal epithelial cells**, *Nutrients*, 14. 1486, 2022.

Palkovicsné Pézsa N., Kovács D., Somogyi Z., Rácz B., Farkas O., **Probiotikumok hatásának vizsgálata sertésekben**, *Magyar Állatorvosok Lapja*, 144. 613-622., 2022

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., Farkas O.: **Bélgámsejt-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

Palkovicsné Pézsa N., Karancsi Z., Farkas O., Rácz B.: ***Lactobacillus plantarum* 2142 hatása bélgámsejtek morfológiájára fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatokban**. MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Hungary, 2018

Palkovicsné Pézsa N., Karancsi Z., Bowles H., Rácz B., Farkas O.: **Probiotikumokkal történő kezelés hatásának nyomonkövetése IPEC-J2 sertés bélgám sejteken**. MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Hungary, 2019



Palkovicsné Pézsa N., Karancsi Z., Farkas O., Rácz B. **Probiotikumok hatása IPEC-J2 bélhám sejtekre.** Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság X. Kongresszusa, Szeged, Hungary, 2019.

Palkovicsné Pézsa N., Karancsi Z., Rácz B., Farkas O.: **Enterococcus faecium felülszóval történő kezelés hatásának nyomonkövetése IPEC-J2 sejt kultúráján.** MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Hungary, 2020

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

Palkovicsné Pézsa N., Kovács D., Farkas O., Rácz B.: **Enterococcus faeciummal történő kezelés hatásának nyomonkövetése IPEC-J2 sejt kultúráján.** MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Hungary, 2022

Farkas O., Palkovicsné Pézsa N., Kovács D., Pászti-Gere E., Rácz B.: **In Vitro Porcine Intestinal Co-Culture Model to Study the Effect of Enterococcus faecium in Escherichia coli and Salmonella Typhimurium Infection** IPC 2022 - International Conference of Probiotics and Prebiotics, Bratislava, Slovakia, 2022

Palkovicsné Pézsa N., Kovács D., Farkas O., Rácz B.: **Lactobacillus rhamnosusszal történő kezelés hatásának vizsgálata IPEC-J2— baktérium ko-kultúráján.** MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Hungary, 2023