

Állatorvostudományi Egyetem



Gyógyszertan és Méregtani Tanszék

Enterococcus faecium hatásának vizsgálata bélhámsejt - baktérium kokultúrán

Készítette: Nagy Eszter

Témavezetők:

Dr. Farkas Orsolya

ÁTE Gyógyszertan és Méregtani Tanszék,
tudományos főmunkatárs

Dr. Palkovicsné Pézsa Nikolett

ÁTE Gyógyszertan és Méregtani Tanszék,
tudományos segédmunkatárs

Budapest, 2023

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés.....	4
2. Szakirodalmi áttekintés	6
2.1. A bél barrier funkciója, bél- és immunrendszer kapcsolata.....	6
2.2. Baktériumok szerepe a sertés bélrendszerében.....	8
2.2.1. Az <i>Escherichia coli</i> szerepe a sertések bélrendszeri megbetegedéseiben.....	9
2.2.2. <i>Salmonella</i> baktériumok szerepe a sertések bélrendszeri megbetegedéseiben	10
2.3. Az oxidatív stressz szerepe a bélrendszerben	11
2.4. Az antibiotikum rezisztencia és jelentősége	13
2.5. Probiotikumok	14
2.5.1. Az <i>Enterococcus faecium</i> probiotikus baktériumtörzs.....	16
2.6. <i>In vitro</i> modellek jelentősége.....	16
2.6.1. IPEC-J2 sejtvonala	18
3. Célkitűzések	19
4. Anyag és módszer	20
4.1. A sejtenyésztés körülményei és folyamata	20
4.2. Baktériumtenyésztés körülményei.....	20
4.3. A sejtek életképességének vizsgálata	21
4.4. Az intracelluláris redox állapot jellemzése	22
4.5. A bélhámsejtek paracelluláris permeabilitásának vizsgálata.....	24
4.6. Statisztikai számítások.....	24
5. Eredmények.....	25
5.1. A sejtek életképességének vizsgálata	25
5.2. Belső redox állapot vizsgálat eredményei	26
5.3. Paracelluláris permeabilitás vizsgálata	27
6. Megbeszélés	30
7. Összefoglalás.....	33
8. Summary	34
9. Irodalomjegyzék.....	35
Köszönetnyilvánítás.....	39

Rövidítések jegyzéke

2D – kétdimenziós

3D – háromdimenziós

AMR – antimikrobiális rezisztencia

ANOVA – egytényezős varianciaanalízis

CFU – colony forming unit

DCF – 2',7'-diklorofluoreszcein

DCFH-DA – diklorofluoreszcein-diacetát

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMEM/F12 – Dulbecco's Modified Eagle's Medium és Ham's F12 Nutrient (1:1) sejtenyésztő tápfolyadék

DNS – dezoxiribonukleinsav

EAST – enteroaggregatív *Escherichia coli* hőstabil enterotoxin

EPEC – enteropatogén *Escherichia coli*

ETEC – enterotoxikus *Escherichia coli*

EU – Európai Unió

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations (Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Világszervezet)

FBS – főtális borjúsavó

FD-4 – fluoreszcens izotiocianát-dextrán

GALT – gut-associated-lymphatic tissue

GIT – gasztrointesztinális traktus

IgA, IgM, IgG – immunglobulin A, immunglobulin M, immunglobulin G

IL – interleukin

IPEC – intestinal porcine enterocyte cell

JAM – junkciós adhéziós molekulák

LT – hőre labilis enterotoxin

PBS – foszfáttal pufferolt sóoldat

ROS – reaktív oxigén származék

STa és b – hőstabil a és b típusú enterotoxin

STx2e – Shiga 2e típusú toxin

TER – transepithelial electrical resistance (transzepiteliális ellenállás)

TJ – tight junction

WHO – World Health Organization (Egészségügyi Világszervezet)

ZO – zonula occludens

1. Bevezetés

Az antibiotikumok felfedezése óriási mérföldkő az orvostudomány történetében, hiszen számos olyan betegség gyógyítását tették lehetővé, amelyek korábban gyakran végzetesek voltak. Az antibiotikumok helytelen és túlzott alkalmazása azonban hosszú távon súlyos következményekkel jár. Sok állattenyésztő az 1950-es években rutinszerűen kezdte használni ezeket a szereket növekedési hormonokkal és szteroidokkal együtt szubklinikai dózisokban. Ennek hatására az állatok teljesítménye és súlygyarapodása fokozódott, a bakteriális fertőzések előfordulása pedig csökkent az állományokban. Ezzel párhuzamosan az antibiotikum rezisztencia mértéke is elkezdett növekedni és egyre több rezisztens baktériumtörzs jelent meg.

A gasztrointesztinális betegségek leküzdésében a sertéságazat is nagy mértékben támaszkodott az antibiotikumok profilaktikus alkalmazására. Az antibiotikum rezisztencia miatti aggodalomra való tekintettel 2006-ban az Európai Unióban betiltották az antibiotikumok növekedésserkentőként való használatát. A legújabb 2022. január 28-án hatályba lépett uniós rendelet (2019/6. Európai Parlament és Tanács 2018. december 11., az állatgyógyászati készítményekről) tovább korlátozza az antibiotikumok állatgyógyászati felhasználását (Az Európai Parlament és az Európai Tanács, 2018).

Minden olyan lehetőség, amely csökkentheti a rezisztencia terjedését és lehetővé teszi az antibiotikumok hatékonyságának fenntartását, kulcsfontosságú az emberi egészség szempontjából. A gasztrointesztinális traktus egészségének megőrzésére alkalmas alternatív takarmánykiegészítők bevezetése éppen ezért nagy jelentőséggel bír.

A probiotikumok élő mikroorganizmusok, amelyek megfelelő mennyiségben adva jótékony hatást gyakorolnak a gazdaszervezetre, és hatásukat többféleképpen fejtik ki. Modulálják a gazdaszervezet immunrendszerét, illetve hatást gyakorolnak a mikrobiótára közvetlen módon, valamint az általuk termelt anyagok felszabadulása által. A probiotikus baktériumokkal végzett előkezelések csökkenthetik a sejthalál előfordulását, a sejtek disszociációját, és segítenek megőrizni a kórokozóknak kitett sejtek szerkezeti integritását. A legtöbb probiotikus baktérium bélrendszer eredetű és a tejsavtermelő baktériumok csoportjába tartozik. Az *Enterococcus*okat széles körben használják probiotikumként a mikrobiális egyensúly javítására. Az *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) NCIMB 10415 immunrendszerre és a növekedés serkentésére gyakorolt jótékony hatását *in vitro* és *in vivo* kísérletek igazolták.

Az IPEC-J2 malacok jejunumából származó egészséges sejtvonalt. Széles körben használják sertés emésztőrendszeri megbetegedéseinek modellezésére, valamint probiotikumok és más anyagok hatásainak tanulmányozására.

Jelen dolgozatban egy sertésből izolált probiotikus baktériumtörzs, az *E. faecium* hatását vizsgáltuk sertés bélhámsejtekből álló sejtenyészeten. Kísérleteink során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy képes-e a kiválasztott baktériumtörzs ellensúlyozni egyes bélbeli patogén baktériumok által kiváltott oxidatív stresszt, és a bélbarrier paracelluláris permeabilitásának növekedését.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1. A bél barrier funkciója, a bél- és az immunrendszer kapcsolata

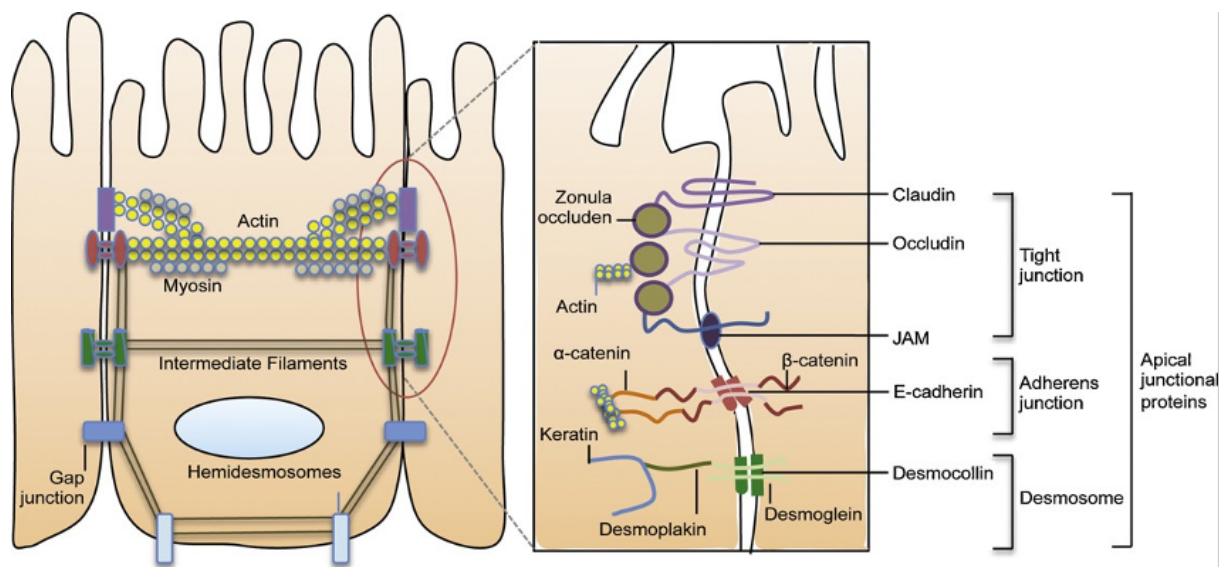
Az optimálisan működő gasztrointesztinális traktus (GIT) fontos a sertések általános anyagcseréje, fiziológiája, egészségi állapota és teljesítménye szempontjából a növekedés és fejlődés minden szakaszában. A bélrendszer egy összetett, dinamikus és folyamatosan változó szervrendszer, amely számos fiziológiai és funkcionális folyamatot lát el és biztosít, ideértve a tápanyagok emésztését és felszívódását, a gazdaszervezet anyagcseréjét és energiatermelését, az állandó és egészséges mikrobiótát, különféle védekezési mechanizmusokat, mint a barrier funkció és a nyálkahártya immunmechanizmusai, valamint az ezek közötti kölcsönhatásokat (Pluske és mtsai, 2018).

A bél egészségének megőrzésében szerepet játszó tényezők és feltételek összetettek. A GIT nyálkahártyája és a mikrobióta között fellépő összetett kölcsönhatások kulcsfontosságúak a bél egészségének megőrzésében. A GIT zavarai egyensúlyhiányt okozhatnak és megzavarhatják az általános homeosztázist. A bélrendszer védelme két fő tényezőtől függ: az egyrétegű hámsejtek barrier funkciójától és a nyálkahártya védekezőképességétől (Pluske és mtsai, 2018). A GIT-et mindig nyálkahártya borítja be, amely alatt laza kötőszöveti réteg, majd egy izomréteg helyezkedik el. A lumentől kifelé haladva a bélcsatorna fala négy rétegből áll, ezek sorrendben a *tunica mucosa*, *tunica submucosa*, *tunica muscularis* és *tunica serosa*. A *tunica mucosa* talán a legfontosabb rétege a GIT-nek és a feladata is szerteágazó, védi a mélyebb rétegeket, szekréciós tevékenységet folytathat, és részt vesz a tápanyagok felszívásában is. Három réteg építi fel, a *lamina epithelialis*, a *lamina propria* és a *lamina muscularis mucosae*. A *lamina muscularis mucosae* felelős a nyálkahártya mozgásaiért, melyek a bélcsatorna falának mozgásától függetlenek (Röhlich, 2006). A *lamina epithelialis* és a *lamina propria* bír jelentős szereppel az immunfunkciók szabályozásában, így a továbbiakban ezek kerülnek részletesebb bemutatásra.

A hám integritásának és struktúrájának fenntartása kulcsfontosságú a külső és belső környezet elválasztásában. Ezt részben a mikrotubulusok és az aktin szabályozzák. A mikrotubulusok központi szerepet játszanak a celluláris integritás fenntartásában, irányítják az intracelluláris (sejten belüli) transzportot és szekréciót. Az aktin szabályozza az epiteliális réteg permeabilitását az apikális junkciós fehérjéken keresztül, amelyek sejtkapcsoló komplexekből állnak (Natividad és Verdu, 2013).

A *lamina epithelialis* hámsejtei között szorosan összekapcsolódó (tight junction - TJ) fehérjék képeznek gátakat, amelyek lezárják a hámsejtek közötti paracelluláris teret,

szabályozva a hámréteg permeabilitását (Zheng és mtsai, 2021). A hámsejtek közötti szoros kapcsolat egy vékony, övszerű struktúrával jön létre, amely a sejt oldalán az apikális régiónál fut körbe összekapcsolva a szomszédos sejteket. A sejt-sejt kapcsolatot a szomszédos sejtek plazmamembránjából kinyúló membránkötő fehérjék, az okkludin és a klaudinok tartják fenn (1. ábra). Citoplazmatikus fehérjék, mint például a zonula okkludens-1 (ZO-1), a zonula okkludens-2 (ZO-2) és a cingulin szintén hozzákapcsolódnak a TJ-t alkotó fehérjékhez (Oswald, 2006). A sejtek között létrejövő TJ szabályozza a luminális és a bazolaterális kompartmentek közötti ionok és más oldott anyagok passzív diffúzióját. A TJ fehérjék szűrőként szolgálnak, hogy lehetővé tegyék a fontos tápanyagok, az elektrolitok és a víz transzlokációját a bél lumenéből a keringésbe (Zheng és mtsai, 2021).



1. ábra: A TJ felépítése a bélhámsejtek között. A sejtben belül kétféle fehérje található, az integrin és az aktin. Az aktin-filamentumok kereszt-kötéseket képeznek az epitheliális sejtek apikális régiójában, és szerepet játszanak az epitheliális permeabilitás szabályozásában. Az apikális junctionális komplex TJ-ből, adherens kapcsolatból, desmoszómból vagy makula adherensekből áll. A TJ transzmembrán fehérjékből, okkludinból, klaudinokból és junctionális adhéziós molekulákból (JAM) állnak, amelyek a zonula okkludens (ZO) fehérjéken keresztül kapcsolódnak az aktin citoskeletonhoz (Natividad és Verdu, 2013).

A *lamina propria* laza kötőszövetből álló réteg, amely vér- és nyirokereket, idegrostokat és számos egyéb kötőszöveti sejtet tartalmaz. Szinte teljes hosszában megtalálhatók benne az immunrendszer elemei, melyek a patogénnel szemben védik a szervezetet. A külső környezetből a táplálékkal nagy mennyiségű patogén mikroorganizmus kerül a bélcsatornába. Mivel a hámréteg vékony és sérülékeny, ezért kifejezetten szükséges a *lamina*

propria jelenléte (Röhlich, 2006). Ez a szervezet első védelmi vonala. Képes arra, hogy az antigéneket (köztük takarmányok fehérjéit), természetes toxinokat és fertőző betegségeket okozó mikroorganizmusokat felismerje és a mélyebb rétegbe való bejutástól védje (Stokes és mtsai, 2001). Nagy mennyiségben megtalálhatók benne az immunrendszer sejtjei, mint a limfoid sejtek és a makrofágok. Jelen vannak továbbá plazmasejtek, amelyek IgA antitesteket termelnek. Gyakran előfordul diffúz nyirokszövet, nyiroktüsző is, amelyet gut-associated-lymphatic tissue-nak (GALT) nevezünk. A disztális szakaszokon ezen nyiroktüszők aggregált formáit, Peyer plakkokat is találunk (Röhlich, 2006). Mindegyik plakk külön-külön tartalmaz számos B-sejtet, amelyeket T-sejteket tartalmazó interfollikuláris területek határolnak be. Az IgM-t, IgG-t és IgA-t tartalmazó plazmasejtek is jelen vannak a tüszőben (Stokes és mtsai, 2001).

A bélhámsejtek az általuk felismert patogén szignálmolekulák jelenlétének hatására interleukinokat (IL) és növekedési faktorokat választanak ki, amelyek fontos immunmoduláló tulajdonságokkal rendelkeznek. A GIT immunrendszere számos molekuláris mechanizmuson keresztül szigorúan szabályozott, hogy megakadályozza a túlzott aktivációt és gyulladást. Mindemellett a GIT immunrendszerének gyorsan és erőteljesen reagálnia kell a védekező funkció bármely megsértésére. Patogén, illetve antigén jellegű kihívás esetén mobilizálja a veleszületett és adaptív immunválaszokat, amely kritikus fontosságú a fertőzés szisztémás terjedésének megakadályozásában (Pluske és mtsai, 2018).

2.2. Baktériumok szerepe a sertés bélrendszerében

A gasztrointesztinális traktusban több, mint 10^{14} számú baktérium él, amelyek élethosszig tartó szimbiotikus kapcsolatban állnak a test sejtjeivel. Ezt az ökoszisztémát összefoglaló néven intesztinális mikrobiótának nevezzük (Natividad és Verdu, 2013).

A nyálkahártyához kapcsolódó mikrobióta védelmi vonalat biztosít a kórokozók ellen és modulálja a gazdaszervezet immunállapotát. A mikrobióta indukálja a nyálkahártya immunrendszerének immunglobulin termelését, amely a lumenbe szekretálódik, hogy korlátozza a baktériumok kolonizációját és megakadályozza a baktériumok behatolását a hámrétegen (Zheng és mtsai, 2021).

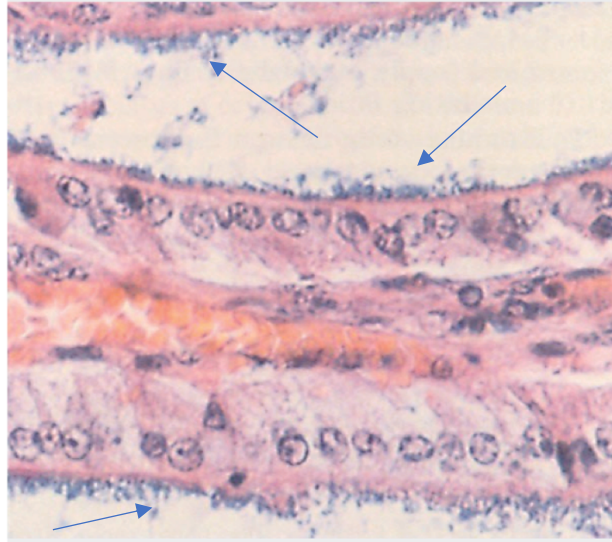
A gazdaszervezet kolonizációja a születéskor kezdődik, és a mikrobióta összetétele a gazdaszervezet fejlődése során folyamatosan változik. A mikrobiális sűrűség a proximális bélszakasztól a disztális bélszakaszig növekszik (a gyomorban 10^1 , a duodenumban 10^3 , a jejunumban 10^4 , az ileumban 10^7 , a vastagbélben pedig 10^{12} sejt/gramm található). Ezzel párhuzamosan a baktériumok sokfélesége, bifidobaktériumok, a lactobacillusok és az

enterococcusok száma is növekszik (Sommer és Bäckhed, 2013). Az intesztinális mikrobióta genetikai sokfélesége óriási, amely számos előnnyel jár a gazdaszervezet számára, olyan biológiai aktivitást biztosít, amelyek a gazdaszervezetben hiányoznak. A mikrobióta fontos az állatok egészsége és fejlődése szempontjából, valamint elengedhetetlen az immunrendszerük és a bél barrier funkciójának fejlődésében (Isaacson és Kim, 2012). A fiziológias bélmikrobiótát az anaerob baktériumok uralják, amelyek száma 100-1000-szeresen meghaladja az aerob és fakultatív anaerob baktériumokét. Összességében a bélmikrobióta körülbelül 500-1000 fajból áll (Sommer és Bäckhed, 2013).

2.2.1. Az *Escherichia coli* szerepe a sertések bélrendszeri megbetegedéseiben

A sertés colibacillózist két *Escherichia coli* (*E. coli*) típus okozza: az enterotoxikus *E. coli* (ETEC) és az enteropatogén *E. coli* (EPEC), melyek közül az előbbi bír nagyobb jelentőséggel. Az ETEC az újszülött és a növendék (nemrégiben elválasztott) sertések megbetegedésének és elhullásának fő okozója. A fertőzés a növendék sertésekben hasmenést válthat ki az elválasztás utáni időszak első vagy második hetében, ami általában kiszáradáshoz, csökkent súlygyarapodáshoz és elhulláshoz vezethet (Sun és Kim, 2017).

Ezek a baktériumok a vékonybél hámfájához tapadnak. Közvetlenül nem indukálnak káros morfológiai változásokat, hanem enterotoxinokat választanak ki, amelyek peptidok vagy fehérjék lehetnek. Ezek a baktérium fő virulencia faktorai, amelyek rontják az enterociták működését azáltal, hogy növelik a bél mucin termelését és csökkentik a vízfelvételt. (Sun és Kim, 2017) A sertéseknél hasmenést okozó ETEC törzsek által termelt toxinok közé tartozik a hőre labilis enterotoxin (LT), a hőstabil A típusú enterotoxin (STa); a hőstabil B típusú enterotoxin (STb); a Shiga 2e típusú toxin (Stx2e) és az enteroaggregatív *E. coli* hőstabil enterotoxin 1 (EAST1) (Francis, 2002). További virulenciafaktorok a szőrszerű függelékekkel rendelkező adhezinek – fimbriák és pilik. A gazdaszervezet által expresszált receptorok is fontosak az adhezinek és enterotoxinok általi patogenezisben. A receptorok fajspecifikussága miatt az ETEC törzsek nagyon specifikusak a gazdaszervezet típusára (Sun és Kim, 2017). A patogén folyamat első lépése a vékonybél mikrobolyhain lévő adhezinek és ligandumok közötti kölcsönhatás, amely elengedhetetlen lépése a baktériumok mikrobolyhokhoz való kötődésének (2. ábra). A fimbriák az ETEC tapadó felületi antigénjeinek legelterjedtebb típusai. A választás után megbetegedő sertésekből származó ETEC-en található fimbriák gyakori típusai az F18 és az F4 (Sun és Kim, 2017).



2. ábra: Hematoxilin-eozinnal festett vékonybél szövettani metszete ETEC-cel fertőzött sertésből. A baktériumok összefolyó réteget képeznek a hám felszínén (×400) (Francis, 2002).

Az *E. coli* által okozott választás utáni hasmenés a baktérium elszaporodásával jár, amely ezután megtelepedik a vékonybél epitéliumán vagy a hámréteget bevonó nyálka receptoraihoz kötődik. A fertőzés és a betegség kialakulását a kolonizáció mértéke határozza meg (Sun és Kim, 2017). A kolosztrumból és tejből nyert antitestek (immunglobulinok) megvédik az újszülött sertéseket az *E. coli* törzsek bélrendszerében történő elszaporodásától. Az elválasztás okozta stressz miatt azonban a növendék sertések fogékonyabbak az *E. coli* bélfertőzésekre. A vírusok széles köre fertőzi meg ilyenkor a sertéseket, elősegítve a bakteriális felülfertőzést. Kimutatták, hogy mind a rotavírus, mind az ETEC törzs fertőzései súlyos hasmenést eredményeznek, ami alátámasztja, hogy a hám vírusos károsodása fokozhatja az *E. coli* kolonizációját (Sun és Kim, 2017).

2.2.2. *Salmonella* baktériumok szerepe a sertések bélrendszeri megbetegedéseiben

A *Salmonella* nemzetség tagjai képesek megfertőzni a gazdaszervezetek széles körét. Számos szerotípus meglehetősen alkalmazkodott egyetlen gazdafajhoz, például a *Salmonella typhi* embert, a *Salmonella dublin* szarvasmarhát, a *Salmonella pullorum/gallinarum* baromfit, a *Salmonella choleraesuis* sertést betegít meg (Carlson és mtsai, 2012). A szepszist okozó *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis serovariáns mellett a *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) a sertésbetegségek esetén leggyakrabban izolált serovariánsok közé tartozik Európában és az Egyesült Államokban

(D’Incau és mtsai, 2021). A sertések szalmonellafertőzései két fő okból jelentenek gondot. Az első a sertések klinikai betegsége (szalmonellózis), a második pedig az, hogy a sertések a *Salmonella* szerotípusok széles skálájával fertőződhetnek meg, amelyek potenciálisan megfertőzhetik a sertés eredetű hústermékeket, és veszélyt jelenthetnek az emberi egészségre (Carlson és mtsai, 2012).

A szalmonellózis különböző klinikai megnyilvánulásai közé tartozik a hasmenés, a vetélés, a tüdőgyulladás, a szepszikus ízületgyulladás, az agyhártyagyulladás, a disztális végtagok gangrénája és egyéb más betegségek, amelyek a szerotípusok virulenciájával, a fertőző dózissal és a gazdaszervezet immunitásával kapcsolatosak (Souto és mtsai, 2017). A *S. Typhimurium*mal fertőzött sertések kezdeti klinikai tünete a vizenyős sárga hasmenés, kezdetben vér vagy nyálka nélkül. A betegség gyorsan elterjedhet, és néhány napon belül a legtöbb sertést az ólban érintheti. Szórványosan vér jelenhet meg a székletben, ritkán a sertésdizentériára vagy a sertés vérzéses proliferatív enteropátiájára jellemző bőséggel. Az érintett sertések lázasak, csökkent a takarmányfelvételük és dehidratáltak (Carlson és mtsai, 2012). Leggyakrabban olyan sertéseknél alakulnak ki a tünetek, amelyek a szalmonellafertőzéssel egy időben más, immunszuppresszív betegségben szenvednek, emellett rossz higiéniai körülmények között tartják őket. Bár a fertőzés gyakran előfordul, a felnőttek és a szopós sertések ritkán betegnek meg. Betegség esetén a legtöbb sertés teljesen felépül, de vannak olyan egyedek, amelyek több hónapig is hordozók maradhatnak, és időszakosan üríthetik is a kórokozót (D’Incau és mtsai, 2021). A betegség világszerte előfordul, de becsült prevalenciája, morbiditása és mortalitása jelentősen eltér a különböző területeken (Steven A. Carlson és mtsai., 2012).

A *S. Typhimurium* egyre nagyobb mértékben felelős az emberekben előforduló *Salmonella*-járványokért, és ez a harmadik leggyakrabban jelentett szerovariáns. A szalmonella előfordulása nagymértékben változik a gazdaságok között, illetve ugyanazon gazdaságon belül a különböző növekedési szakaszokban. A faktorok nagy száma, valamint a kórokozó és a gazdaszervezet közötti összetett kapcsolatok miatt a baktériumok átadásának és ürítésének mechanizmusainak megértése a mai napig nehézséget jelent (D’Incau és mtsai, 2021).

2.3. Az oxidatív stressz szerepe a bélrendszerben

A bélhámsejtek, illetve az immunsejtek által termelt reaktív oxigén származékok (ROS) elengedhetetlenek a jelátviteli útvonalak szabályozásában, beleértve a sebgyógyulásban részt vevő folyamatokat (Aviello és Knaus, 2017).

Az oxidatív stressz egyensúlyzavart jelent a reaktív oxigénfajták termelési és eliminációs folyamatai között. A ROS-ok instabil és aktív oxigénközpontú molekulák, melyek szignálmolekulaként fontos élettani funkciókat töltenek be az anyagcsere folyamatokban és az immunrendszer működésében. Fiziológias körülmények között az élőlények képesek a ROS előállítására és annak hatékony eltávolítására, azonban az exogén források, mint a szennyező anyagok, a sugárzás, kórokozók, valamint a helytelen étrend és életmód mind hozzájárulhatnak ahhoz, hogy felboruljon az egyensúly, és a ROS-ok szintje kóros mértékben emelkedjen. A ROS-ok között megtalálhatók gyökös és nem gyökös molekulák is. Legismertebb gyökös képviselőik közé a szuperoxid anion gyök (O_2^-), a hidroxilgyök ($\cdot OH$), a peroxilgyök ($ROO\cdot$) és az alkoxigyök ($RO\cdot$) tartozik. A nem gyökös ROS vegyületek közül a legismertebb a hidrogén-peroxidból (H_2O_2). A ROS-ok sokfélesége határozza meg a ROS tulajdonságait, beleértve az instabilitást és az aktivitást (Wang és mtsai, 2020).

Az oxidatív stressz okozta károsodás akkor következik be, amikor az antioxidáns védelmi rendszer nem tudja eltávolítani a felesleges ROS-okat a szervezetből. Ez a fehérjék, a lipidek és a DNS károsodását okozza, ami végül betegségekhez vezethet. A fehérjék, mint a szövetek és szervek alapvető komponensei, a ROS-ok fontos célmolekulái. A ROS-ok módosíthatják az aminosav-maradékokat, keresztkötéseket alakíthatnak ki a fehérjékkel, ezáltal károsítva a sejteket. Az oxidatív stressz szignifikánsan összefügg a DNS-károsodással, mivel DNS-szálltöréseket és a bázisok módosulását okozhatja. Emiatt a ROS-ok a legfontosabb rákkeltő, teratogén és mutagén tényezők közé tartoznak (Wang és mtsai, 2020).

A ROS-ok tolerálható és káros szintje közötti egyensúlyt szabályozó biológiai rendszerek diszfunkciója tartós és megoldatlan nyálkahártya-gyulladásához vezethet. Az oxidálószernek nem megfelelő, azaz túl alacsony vagy túl magas szintje megváltoztatja a redox egyensúlyt, ezáltal kóros folyamatokat indít el. A redox egyensúly szabályozásának rendellenességei veszélyeztetik az antimikrobiális védekezést, meghosszabbítják az immunaktivációt, és megváltoztatják a veleszületett és adaptív immunválaszokat. Az ebből eredő hiányos kórokozó-elimináció és oxidatív stressz nemcsak állandósítja a gyulladást, hanem végső soron más krónikus szövödményekhez is vezethet, mint például fibrózis, neoplázia és extraintesztinális tünetek (Aviello és Knaus, 2017).

2.4. Az antibiotikum rezisztencia és jelentősége

Becslések szerint 2050-re a világon élők száma eléri a 9 milliárdot. Az emberi populáció folyamatos növekedése elválaszthatatlanul összefügg a növényi és állati eredetű élelmiszerek iránti növekvő keresettel. Emiatt a szakemberek olyan megoldásokat keresnek, amelyek lehetővé teszik az élelmiszertermelés intenzitásának növelését és a termelési költségek csökkentését. Az új állattenyésztési módszerek célja a hús minőségének és mennyiségének növelése, az állatok jólétének és a természeti környezet szempontjainak figyelembevételével (Markowiak és Ślizewska, 2018).

Mind az állati takarmánynak, mind a takarmánykiegészítőknek szigorú kritériumoknak kell megfelelniük anélkül, hogy az állattenyésztési költségek egyidejűleg emelkednének. A múltban az antibiotikumokat és más gyógyszereket széles körben használták, főként az bélmikrobióta módosítására, valamint a termelékenység és az állatok növekedésének fokozására. Az antimikrobiális szerek emberi életek millióit mentették meg, de többségüket élelmiszertermelő állatoknál használják (Van Boeckel és mtsai, 2019). Ezen anyagok hosszútávú használata antibiotikum rezisztens (AMR) mikroorganizmusok kialakulásához vezetett, amelyek veszélyt jelentenek a fogyasztók egészségére és negatív hatást gyakorolnak a környezetre (Markowiak és Ślizewska, 2018).

Az emberből származó baktériumok rezisztenciája az élelmiszertermelő állatokból származó baktériumok rezisztenciájával összefüggésbe hozható, amely főként az állatok antimikrobiális szerekkel történő kezeléséből adódik. A *Campylobacter* törzsek esetében például az előbb említettekre egyértelmű pozitív összefüggést találtak (EFSA, 2022).

Az állatok és emberek bakteriális fertőzéseinek kezelésére alkalmazott antibakteriális szerek sok esetben megegyeznek, ezért a súlyos emberi megbetegedéseknél is használt antibiotikumokkal kapcsolatos növekvő rezisztencia egyre nagyobb problémát jelent. (Van Boeckel és mtsai, 2019). Az EU felismerve az antibiotikum rezisztencia növekvő veszélyét, 2006-ban betiltotta az hozamfokozóként való használatukat (Európai Bizottság, 2005). 2019-ben új uniós rendeletet adtak ki (2019/6. Európai Parlament és Tanács 2018. december 11., az állatgyógyászati készítményekről), amely tovább korlátozza az antibiotikumok állatgyógyászati felhasználását. Az EU nagy hangsúlyt helyezett az emberi fertőzések megelőzésére és kezelésére szolgáló antimikrobiális szerek használatának csökkentésére is. (Az Európai Parlament és az Európai Tanács, 2018).

Az új rendeletek nagy nyomás alá helyezték az állat- és baromfitelepeket, amelynek fő következménye a terápiás antibiotikumok használatának jelentős növekedése volt. Olyan alternatívák keresése vált szükségessé, amelyek javíthatják az állatok természetes védekező

mechanizmusait és csökkenthetik az antibiotikumok tömeges használatát. Ebben az összefüggésben a probiotikumok, prebiotikumok és szinbiotikumok lehetséges megoldást jelentenek (Balamurugan és mtsai, 2013).

2.5. Probiotikumok

A „probiotikum” kifejezés két görög szóból származik („pro” és „bios”), és jelentése „az életért” az „élet érdekében”. A probiotikumokkal kapcsolatban 1907-ben elsőként Mechnikov írta le, hogy fermentált tejtermékek jótékony hatással lehetnek a bél természetes mikrobiótájára. A probiotikum megnevezést Ferdinand Vergin is használta, aki 1954-es „Anti- und Probiotika” című cikkében az antibiotikumok és más antimikrobiális szerek bél mikrobiótára gyakorolt káros hatását a probiotikumok jótékony hatásával hasonlította össze. Idővel a probiotikum definíciója nagymértékben módosult (Markowiak és Ślizewska, 2018). A probiotikumok kifejezést Lilly és Stillwell (1965) is használták egy csillós protozoon által termelt ismeretlen növekedésserkentő anyagok megjelölésére, amelyek egy másik csillós protozoon növekedését serkentették. A kifejezés ma már az organizmusok sokkal szélesebb csoportját takarja. Parker (1974) úgy határozta meg a probiotikumokat, mint szervezeteket és anyagokat, amelyek hozzájárulnak a bél mikrobiális egyensúlyához, így az élő szervezeteket és a nem élő anyagokat egyaránt magukban foglalják. Fuller (1989) bírálta az „anyagok” szó beillesztését, és újradefiniálta a probiotikumok fogalmát, mint egy élő mikrobiális takarmány-kiegészítőt, amely jótékony hatással van a gazdaállatra azáltal, hogy javítja a bél mikrobiális egyensúlyát. Az Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Világszervezete (FAO) és az Egészségügyi Világszervezet (WHO) közös munkacsoportja a probiotikumokat élő mikroorganizmusokként határozta meg, amelyek megfelelő mennyiségben adva jótékony hatással vannak a gazdaszervezetre (FAO/WHO, 2001). Ezt a definíciót a Probiotikumok és Prebiotikumok Nemzetközi Tudományos Szövetsége széles körben elfogadja és használja (Bajagai és mtsai, 2016).

A probiotikum kifejezés olyan tápszerekre vagy termékekre vonatkozik, amelyek bizonyos szigorúan meghatározott kritériumoknak megfelelnek. A kritériumok közül a legfontosabbak a következők: az életképes sejtek megfelelő száma, a gazdaszervezet egészségére gyakorolt jótékony hatás (amely magában foglalhatja a növekedés serkentését is), valamint a tápcsatorna működésére gyakorolt jótékony hatás. A probiotikus készítmények hatékonysága számos tényezőtől függ, ezért rendkívül fontos a baktériumtörzsek megfelelő kiválasztása és a megfelelő dózis alkalmazása. (Markowiak és Ślizewska, 2018).

Probiotikumként sok mikroorganizmust használnak, amelyek különböző tulajdonságaik szerint csoportosíthatók. A legtöbb felhasznált mikroorganizmus baktérium, azonban bizonyos élesztő- és gombafajok a nem probiotikus baktériumok közé tartoznak. Ilyen például az *Aspergillus oryzae* és *Saccharomyces cerevisiae*. Bakteriális probiotikumokra példa a *Lactobacillus*, a *Bifidobacterium*, a *Bacillus* és *Enterococcus* nemzetségbe tartozó számos faj. Lehet egy probiotikum spóráképző vagy nem spóráképző. Bár kezdetben a nem spóráképző *Lactobacillus* és a *Bifidobacterium* törzseket használták gyakrabban, ma már inkább spóráképző baktériumokat használnak, pl. a *Bacillus subtilis*. A probiotikus termékek mikrobiális összetétele az egyetlen törzstől a több törzsből vagy fajtól állóig terjed, ez alapján megkülönböztetünk több fajtól (vagy több törzsből álló) és egyfajú (vagy egyetlen törzsből álló) probiotikumokat. Azokat a probiotikumként használt mikroorganizmusokat, amelyek általában nincsenek jelen az állatok bélrendszerében, allochtonnak nevezik (például élesztőgombák), míg a normál esetben a GIT őshonos lakóiként jelenlévő mikroorganizmusokat autochton probiotikumoknak nevezik (például *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* nemzetségek képviselői) (Bajagai és mtsai, 2016).

A nagyüzemi sertéstenyésztésben a legtöbb stressz az elválasztáshoz és a választás utáni időszakhoz kapcsolódik. Stresszfaktort jelent az elválás a kocától, a laktációs immunitás vége, az átállás a tejről a növényi poliszacharidokon alapuló étrendre, valamint a szállítás egy termelő gazdaságba. Ezeket az időszakokat a takarmányfelvétel azonnali, de átmeneti csökkenése jellemzi, ami rontja az állatok növekedési teljesítményét. Mindezek a tényezők negatívan befolyásolhatják a sertések immunműködését és a bélmikrobióta egyensúlyát, ami a sertések fokozott érzékenységéhez vezet, például bélrendszeri rendellenességekhez, fertőzésekhez és hasmenéshez. A múltban az elválasztás és az elválasztás utáni időszak étrendje magában foglalta az antibiotikumok és fémek (réz és cink) megelőző használatát. A takarmányon belüli antibiotikumok teljes betiltását, valamint a réz és cink bekeverési szintjének Európai Unió általi drasztikus csökkentését követően folyamatosan kutatnak választás utáni rendellenességek kezelésére alkalmas alternatív anyagok után (Gaggia és mtsai, 2010).

Egyre több kutatás folyik a probiotikumok használatával kapcsolatban a kórokozó terhelés csökkentése és a sertések gyomor-bélrendszeri betegségek tüneteinek enyhítése érdekében. A legjobb potenciális probiotikumok azonosítására irányuló *in vitro* tesztek mellett számos *in vivo* vizsgálatot végeznek különböző probiotikus mikroorganizmusok felhasználásával (Gaggia és mtsai, 2010).

2.5.1. Az *Enterococcus faecium* probiotikus baktériumtörzs

A probiotikus *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (*E. faecium*) kocák és malacok engedélyezett takarmány-adalékanyaga az Európai Unióban, amiről kimutatták, hogy csökkenti a hasmenés előfordulását és súlyosságát az elválasztott malacoknál (Klingspor és mtsai, 2015).

A gasztrointesztinális fertőzések *in vivo* modelljei kimutatták, hogy a különböző probiotikus takarmány-adalékanyagok pozitív hatással vannak a bél funkcionális barrierjére. Ezeket az eredményeket alátámasztják az *in vitro* sejt kultúra fertőzési modellekből származó adatok, amelyekben a probiotikus törzsek megelőzik vagy enyhítik a hám integritásának patogén általi károsodását (Klingspor és mtsai, 2015). Emellett a humán gyógyászatban az *E. faeciumot* sikeresen alkalmazzák akut hasmenéses betegségek kezelésében és az antibiotikumokkal összefüggő hasmenés megelőzésében (Klingspor és mtsai, 2015).

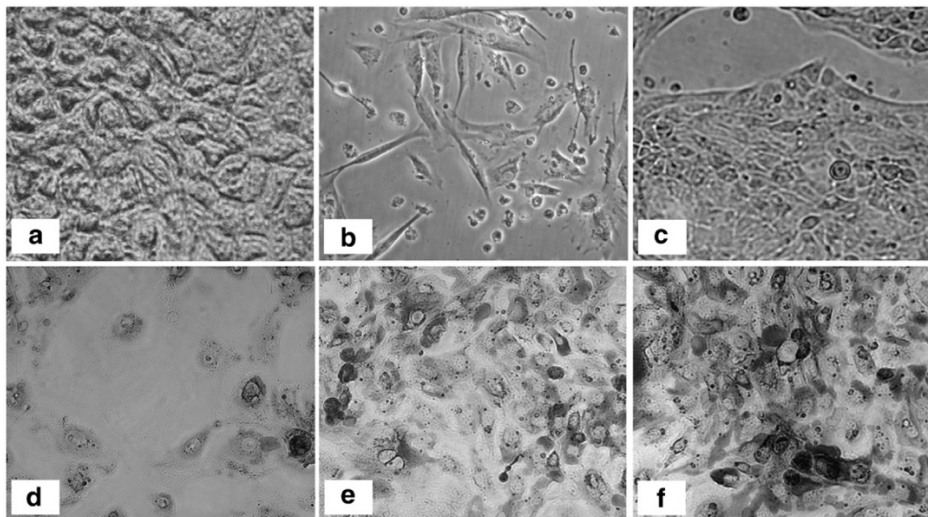
Az *Enterococcus* probiotikumoknak számos jótékony hatása van az állatokra és emberekre, de fontos azt is megemlíteni, hogy ezeket a baktériumokat számos emberi fertőzéssel és átvihető antibiotikum-rezisztenciát meghatározó tényezők jelenlétével is összefüggésbe hozták. Az *Enterococcus* nemzetségbe tartozó fajok, különösen az *E. faecalis* és az *E. faecium*, a közösségben és a kórházban szerzett fertőzésekkel járnak együtt, és az 1990-es években a kórházi fertőzések leggyakoribb okai közé tartoztak. Az *Enterococcus*ból számos virulenciafaktort azonosítottak, amelyek vagy kolonizációval, invázióval vagy kóros elváltozások kialakulásával járnak együtt. Ezek a baktériumok opportunista módon összefüggésbe hozhatók a húgyúti fertőzésekkel, az endokarditisszel és az *enterococcus* bakteriémiával is emberekben (Bajagai és mtsai, 2016).

2.6. *In vitro* modellek jelentősége

Az elmúlt évtizedekben *in vitro*, *ex vivo* és *in vivo* modelleket fejlesztettek ki a bélhám különböző funkcióinak és anyagcseréjének vizsgálatára, különösen gyulladásos állapot vizsgálatára (Ponce de León-Rodríguez és mtsai, 2019). Az állatkísérletek csökkentése érdekében olcsó és egyszerűen használható bélfunkciós sejtmodelleket hoztak létre az új anyagok toxicitásának és biológiai hozzáférhetőségének, valamint a gazdaszervezet, a kórokozók és a bél mikrobióta közötti kölcsönhatások tanulmányozására (CenciČ és Langerholc, 2010). Emellett az *in vitro* sejt kultúra-modellek alkalmazása is megnövekedett, mivel az állatmodellek használata meglehetősen drága és etikai problémákkal jár (Ponce de León-Rodríguez és mtsai, 2019).

Eredetileg a sejtvonalakat a rákkutatásban használták, de később a modellek egy részét tovább használták a fiziológiai mechanizmusok mélyreható vizsgálatára. Ezen túlmenően ko-kultúra modelleket fejlesztettek ki, hogy jobban utánozzák a bél barrier komplex funkcióját. A legtöbb jelenleg alkalmazott sejttenyésztési modellben kétdimenziós (2D) körülmények között végzik a kutatásokat. Ezen modellek belső korlátai vezérelték a háromdimenziós (3D) tenyésztési rendszerek fejlesztését. A technológiai fejlesztések eredményeként jelentősen megnőtt a 3D *in vitro* modellek alkalmazása az *in vivo* sejt-mikrokörnyezet helyreállítására (Ponce de León-Rodríguez és mtsai, 2019).

A bélrendszer *in vitro* sejtmodelljei funkcionálisan hasonlítanak az *in vivo* állapotokra. Mivel a bél egy összetett rendszer számos kölcsönhatásban lévő sejtípussal és mikrobiótával, a modelleknek e tényezők közül a lehető legtöbbet figyelembe kell venniük. Az epiteliális sejtek *in vivo* szorosan tömötten helyezkednek el, szelektíven permeabilis membránnal és mérhető transzepiteliális rezisztenciával (TER) rendelkeznek. A polarizálódó *in vitro* hámsejteknek ezeket a tulajdonságokat ki kell alakítaniuk, ha azokat mikroporózus membránon tenyésztik. Az epiteliális sejteknek, esetenként más sejtvonalakkal is kombinálva, reagálniuk kell a környezeti tényezőkre, például a citokinekre és a gyulladásozó molekulákra. Emellett a sejtvonalak eredete is fontos, hiszen a fiziológiás és patológiás állapotokat minden esetben az adott állatfajból származó sejttenyésztés képes a legteljesebb mértékben tükrözni (3. ábra).



3. ábra: Bélhámsejtvonalak: (a) Caco-2; b) HIEC; (c) H4; (d) IPEC-J2; (e) IPEC-J2-3; (f) IPEC-J2-9. 200× nagyítás. A Caco-2, HIEC és H4 humán eredetű sejtvonalak, míg az IPEC-J2-t sertésből izolálták. Bár az összes sejtet epiteliális osztályba sorolják, vannak közöttük morfológiai különbségek. A Caco-2 kivételével minden sejtvonal nem tumoros eredetű (Cencič és Langerholc, 2010).

A sejtmarkerek, receptorok jellemzése és a funkcionálisan fontos fehérjék expressziója szintén fontos a sejtvonal funkcionalitásának tisztázása és a differenciálódási vagy aktivációs státusz meghatározása szempontjából. Ezen információk alapján modelleket lehet felépíteni bizonyos helyzetek tanulmányozására (Cencič és Langerholc, 2010).

2.6.1. Az IPEC-J2 sejtvonal

A mechanizmusok és jelátviteli utak molekuláris vizsgálatához használt sertés sejtenyészetek csak akkor alkalmasak a kísérletekre, ha tulajdonságaik a lehető legnagyobb mértékben egyeznek a sertés vékonybél epitéliumának tulajdonságaival. Így a bél barrier működésének kutatásához a sejtmodelleknek specifikus fiziológiai követelményeknek kell megfelelniük: tükrözniük kell az epiteliális felépítést, megfelelő transzepiteliális rezisztenciával (TER) és transzport tulajdonságokkal kell rendelkezniük, továbbá expresszálniuk kell a TJ-t alkotó fehérjéket. Ha ezek az előfeltételek teljesülnek, a modellrendszer potenciálisan alkalmas lesz táplálkozással összefüggő vizsgálatokhoz (Zakrzewski és mtsai, 2013).

Mielőtt *in vitro* sejtenyészet modellt *in vivo* helyettesítőként használnánk, funkcionálisan, morfológiailag és molekuláris szinten is jellemezni kell (Zakrzewski és mtsai, 2013). Az IPEC-J2 sejtvonal egy nem transzformált bélsejtvonal, amely eredetileg újszülött malacból izolált jejunális epitéliumból származik (Schierack és mtsai, 2006). Bár az IPEC-J2 tenyészet mindössze egy sejtrétegből áll, ezzel együtt megfelelően tükrözi a sertés jejunum fiziológiás tulajdonságait és felépítését. Ez szükséges ahhoz, hogy a transzepiteliális transzportot és a paracelluláris bél barrier funkcióját sertésekkel kapcsolatos kutatásokban alkalmazni lehessen (Zakrzewski és mtsai, 2013).

3. Célkitűzések

Nagyüzemi tartási körülmények között a sertések számos stresszhatásnak és betegségre hajlamosító tényezőnek vannak kitéve, emiatt gyakran fordul elő náluk bakteriális bélfertőzés. Az *E. coli* és a *S. Typhimurium* patogén baktériumok által okozott fertőzés teljesítménycsökkenést és így az állomány szétnövését, hasmenést, dehidrációt és akár elhullást is okoz, az ebből eredő gazdasági kár pedig jelentős lehet. Mivel az antibiotikumok használata csak súlyos tünetek esetén indokolt, megelőzésre való használatuk pedig növelné az antimikrobiális rezisztenciát, alternatív táplálékkiegészítőkre van szükség, amelyek támogatják a bélrendszer egészséges barrier funkcióját, patogének bejutása esetén pedig hozzájárulnak a gyulladás és az oxidatív stressz csökkentéséhez.

A probiotikumok használata a sertéstartásban napjainkra már elterjedté vált, azonban a pozitív hatásuk pontos hatásmechanizmusa nem minden esetben ismert, ezeknek a felderítésére *in vitro* kísérletek szükségesek. Kísérletünkben modellként az IPEC-J2 sertés eredetű bélhám-sejtvonalat használtuk, melynek számos kedvező tulajdonsága lehetővé teszi a baktérium- bélhámsejt interakciók tanulmányozását.

Kutatásunk célja annak felderítése volt, hogy az *Enterococcus faecium* probiotikus baktérium képes-e protektív hatást kifejteni a bélhámsejtekre *E. coli* és *S. Typhimurium* okozta bélfertőzés esetén. Először meghatároztuk azt a koncentrációt, amelyben az *E. faecium* nem károsítja a sejteket, majd azt vizsgáltuk, hogy mennyire járul hozzá a patogén baktériumok által kiváltott oxidatív stresszt csökkentéséhez, és mennyire képes megelőzni a bakteriális kolonizáció okozta barrier károsodást és permeabilitás növekedést.

Hipotézisünk az volt, hogy az *E. faecium* képes csökkenteni a bélhámsejtekben *E. coli* és *S. Typhimurium* fertőzés hatására termelődött intracelluláris ROS-ok mennyiségét, segít fenntartani a bél barrier integritását, és megakadályozza a patogén baktériumok tapadását az enterocitákhoz.

4. Anyag és módszer

4.1. A sejttenyésztés körülményei és folyamata

Kutatásunkhoz az IPEC-J2-t, újszülött sertés jejunumából izolált sejtvonalat a North Carolina State University (Department of Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, Raleigh, NC, USA) egyetemről kaptuk. A sejtek szaporításához és fenntartásához a Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) és a Ham's F12 Nutrient Mixture 1:1 arányú keverékét használtuk (DMEM/F12). Ezt a következő anyagokkal egészítettük ki: 5%-os főtális borjúsavó (FBS), 5 µg/ml inzulin, 5 µg/ml transferrin, 5 ng/ml szelén, 5 ng/ml epidermális növekedési faktor (EGF) és 1% penicillin-sztreptomycin. A kísérletek során kiegészítőktől mentes, ún. „plain” tápfolyadékot (pDMEM/F12) használtunk.

A kísérletek megkezdéséig az IPEC-J2 sejteket folyékony nitrogénben tároltuk. A felhasznált sejtek maximális passzázsszáma 54 volt. A sejteket a szaporításhoz sejttenyésztő flaskában 37°C-on inkubáltuk, 5% CO₂-t tartalmazó párasított levegő jelenlétében, és kétnaponta tápfolyadékot cseréltük rajtuk. Ezután 6, illetve 96 lyukú tenyésztőedényekbe, valamint 12 lyukú tenyésztőedénybe helyezett poliészter membrán inzertre helyeztük át a sejteket, és addig tenyésztettük őket, ameddig ki nem alakították az egysoros sejtréteget TJ kapcsolatokkal. A sejttenyésztés állapotát naponta ellenőriztük fénymikroszkóppal.

4.2. Baktériumtenyésztés körülményei

Kutatásunkhoz háromféle baktériumtörzset használtunk. A probiotikumként szolgáló, sertésből izolált *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 probiotikus törzset a Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézetől szereztük be. Az *E. coli* és a *S. Typhimurium* törzsek fertőzött sertésekből, hazai klinikai mintákból származtak (ÁTE Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék). Az *E. coli* törzset 2019-ben izolálták, rendelkezik F4 antigénnel, valamint termel hőstabil (STa és STb) és hőlabilis (LT) enterotoxinokat is. A *S. Typhimurium* izolátumot szintén magyarországi klinikai mintából nyerték ki 2009-ben. Mindhárom baktériumtörzset -80 °C-on tároltuk Microbank gyöngyökön. A baktérium szuszpenziók elkészítéséhez a gyöngyöket pDMEM/F12 tápfolyadékban szuszpendáltuk, majd 18-24 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on, egy 5% CO₂-ből és 95% levegőből álló gázkeverék jelenlétében, hogy az IPEC-J2 sejtek tenyésztési körülményeit utánozzuk. Korábbi tanszéki kísérletek során már meghatároztuk, hogy ezen körülmények között tenyésztve mindhárom baktériumtörzs 10⁸ CFU/ml koncentrációt ér el. A sejtek

életképességének mérésére 10^8 , 10^6 , 10^4 CFU/ml *E. faecium* szuszpenziót használtunk. Az elő-, egyidejű- és utókezelési oldatokban az alkalmazott *E. faecium* koncentrációja 10^7 és 10^8 CFU/ml, az *E. coli* és *S. Typhimurium* koncentrációja pedig 10^8 CFU/ml volt. Az összes baktériumszuszpenziót a törzsoldatokból (*E. faecium* 10^8 CFU/ml, *E. coli* 10^6 CFU/ml, *S. Typhimurium* 10^6 CFU/ml), hígítóreagensként pedig sima (antibiotikumoktól mentes) DMEM/F12 táptalajt használva hígítottuk. A kutatáshoz felhasznált reagenseket és a sejtek tenyésztéséhez szükséges anyagokat és tápfolyadékokat a Merck Magyarország Kft.-től (Merck, Darmstadt, Németország) szereztük be.

4.3. A sejtek életképességének vizsgálata

Az *E. faecium* esetleges citotoxikus hatását az IPEC-J2 sejteken a Neutral Red próbát alkalmazva vizsgáltuk. A Neutral Red egy vörös festék, amelyet csak az élő sejt tud felvenni aktív bekebelezéssel, az elpusztult sejtbe pedig nem jut be, tehát a sejtekbe jutott festék mennyisége arányos az élő sejtek számával. A sejttenyészethez feleslegben hozzáadott Neutral Red lemosása után az élő sejtekben felhalmozódott mennyiséget savas-alkoholos extrakcióval szabadítottuk fel.

Különböző koncentrációjú *E. faecium* szuszpenziókat állítottunk elő a fent leírtak szerint. Az életképességi vizsgálathoz az *E. faecium* különböző koncentrációjú (10^8 , 10^6 és 10^4 CFU/ml) kezelőoldatait használtuk. Az IPEC-J2 sejteket 96 lyukú lemezre oltottuk, és 1, 2, 4 és 24 órán keresztül ($37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2) az *E. faecium* szuszpenziókkal inkubáltuk. A kísérletben 1 órás sima tápközeggel végzett kezelést használtunk kontrollként. Az IPEC-J2 sejtek életképességét 24 óra után mértük.

Korábbi kísérleteink során, más probiotikus baktériumtörzseket alkalmazva a 10^7 és 10^8 koncentráció biztonságosnak és hatékonyan bizonyult az IPEC-J2 sejtek kezelésében. A baktériumszuszpenziót a törzsoldatból pDMEM/F12 antibiotikum-mentes tápfolyadék segítségével készítettük. A 96 lyukú tenyésztőedénybe oltott sejtekhez foszfát pufferes (PBS) mosás után $100\text{-}100\text{ }\mu\text{l}$ -t adtunk a baktériumot tartalmazó kezelőoldatokból, a kontrollcsoporthoz pedig $100\text{ }\mu\text{l}$ pDMEM/F12 tápfolyadékot pipettáztunk, és 24 órán keresztül inkubáltuk a sejttenyészeteiket. Összesen 6 párhuzamos mérést végeztünk. Az inkubációs idő leteltével a kezelőoldatokat fenolvörösmentes tápfolyadékokra cseréltük, majd $100\text{ }\mu\text{l}$ Neutral Red oldatot tettünk a sejtekre, melyet 2 órás inkubáció követett. Az inkubációs idő letelte után eltávolítottuk a feleslegben maradt festéket és PBS-sel mostuk a tenyészeteket. Ezután $50\text{ }\mu\text{l}$, 50%-ban 96%-os etanolt, 49%-ban desztillált vizet és 1%-ban koncentrált ecetsavat tartalmazó oldatot pipettáztunk a tenyészetekre és 20 percig körkörös

irányban történő rázatás után kinyertük a bennük felhalmozódott festékanyagot. A felülúszó oldatok abszorbanciáját Spectramax iD3 spektrofotométerrel (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) 540 nm-en határoztuk meg. Az abszorbancia értékek arányosak a felvett festék mennyiségével, így ez alapján a kezeletlen sejtekhez viszonyítva következtetni tudtunk a különböző koncentrációjú oldatokkal kezelt csoportok túlélő sejtjeinek arányára.

Az *E. coli* és *S. Typhimurium* IPEC-J2 sejteken biztonságosan alkalmazható koncentrációját (10^6 CFU/ml) már tanszékünk korábbi kísérleteiből ismerjük, ezért kísérleteink során ezzel a koncentrációval dolgoztunk.

4.4. Az intracelluláris redox állapot jellemzése

A sejtekben termelődött ROS-ok mennyiségét nem specifikus módon vizsgáltuk diklorofluorescein-diacetát (DCFH-DA) segítségével. A DCFH-DA önmagában nem fluoreszkáló vegyület, amely ROS jelenlétében molekuláris átalakuláson megy keresztül; acetát csoportját elveszíti és fluoreszkáló 2',7'-diklorofluoresceinné (DCF) alakul. A mérhető fluoreszcencia intenzitása ennek következtében arányos a sejtekben lévő ROS mennyiségével.

A kísérlethez az IPEC-J2 sejteket 6 lyukú tenyésztőedényben szaporítottuk el, amíg egységes réteget nem alkottak. Ezalatt elkészítettük a baktériumokat tartalmazó szuszpenziókat: az *E. coli*t és *S. Typhimurium*ot tartalmazó oldatokat 10^6 CFU/ml, az *E. faecium*ot tartalmazót 10^7 és 10^8 CFU/ml koncentrációban. A kezelések megkezdése előtt a sejtenyészeteket PBS-sel mostuk.

Háromféle kezelést alkalmaztunk: elő-, egyidejű és utókezelést (1. táblázat). Az előkezelés során először az *E. faecium*ot tartalmazó tápfolyadékkal kezeltük a sejteket, majd 1 óra inkubációs idő után leszívtuk a probiotikumot tartalmazó oldatot, rápipettáztuk az *E. coli*t vagy a *S. Typhimurium*ot tartalmazó oldatot és ismét 1 órán keresztül inkubáltuk a sejteket. Az egyidejű kezelés során egyszerre adtuk hozzá a sejtekhez a kétféle (*E. faecium*ot és *E. coli*t vagy *S. Typhimurium*) kezelőoldatot és 1 órán át inkubáltuk azokat. Az utókezelés során először az *E. coli*t vagy a *S. Typhimurium*ot tartalmazó oldatot raktuk a sejtekre, 1 óra inkubációs idő után eltávolítottuk a felülúszót és ráhelyeztük a sejtekre az *E. faecium*ot tartalmazó oldatot, ezt ismét 1 óra inkubációs idő követte. A negatív kontrollként szolgáló sejtekhez tápfolyadékot, a pozitív kontroll sejtekhez pedig csak *E. coli*t vagy *S. Typhimurium*ot tartalmazó tápfolyadékot adtunk.

Az inkubációs idők letelte után a felülúszót eltávolítottuk, és kiegészítőket tartalmazó DMEM/F12 tápfolyadékot adtunk a sejtekhez. Huszonnégy óra várakozás után leszívtuk

róluk a tápfolyadékot, és PBS-mosást végeztünk. Elsötétített laborban a DCFH-DA festéket feloldottuk kiegészítő- és fenolvörösmentes tápfolyadékban, ezt utána a sejtekre helyeztük, majd 1 órán át inkubáltuk őket. Ezalatt a DCF a sejtekbe jutva reakcióba lépett a reaktív oxigénszármazékokkal. Az inkubáció után kétszeres PBS-mosás következett, majd sejtkaparó segítségével felszedtük a sejteket, minden lyukat egységesen 30 másodpercig kaparva. A felkapart sejttörmeléket Eppendorf csövekbe pipettáztuk, majd centrifugáltuk, és a felülúszóból 100-100 µl-t 96 lyukú sejttenyésztő edényre adagoltunk. Ezt az edényt a fluoreszcens spektrofotométerbe helyeztük, és két hullámhosszt állítottunk be. Az egyik hullámhossz volt felelős azért, hogy a keletkezett termék gerjesztett állapotba kerüljön, a másikkal pedig detektálni tudtuk a termék által kibocsátott fényt, amikor visszatért az alapállapotba. A kezeletlen kontrollhoz képest meghatároztuk, hogy a patogéneket tartalmazó mintákban mennyire nőtt meg a ROS-szint, majd ez utóbbihoz képest mértük, hogy az egyes kezelés- kombinációknál csökkent-e a reaktív oxigén származékok mennyisége.

A kezelés típusa	A hozzáadott probiotikus baktérium és mennyisége	A hozzáadott patogén baktérium és mennyisége
<i>E. faecium</i> + <i>E. coli</i> előkezelés	<i>E. faecium</i> 10 ⁷ vagy 10 ⁸ CFU/ml a patogén előtt	<i>E. coli</i> 10 ⁶ CFU/ml
<i>E. faecium</i> + <i>E. coli</i> egyidejű kezelés	<i>E. faecium</i> 10 ⁷ vagy 10 ⁸ CFU/ml a patogénnel egy időben	<i>E. coli</i> 10 ⁶ CFU/ml
<i>E. faecium</i> + <i>E. coli</i> utókezelés	<i>E. faecium</i> 10 ⁷ vagy 10 ⁸ CFU/ml a patogén után	<i>E. coli</i> 10 ⁶ CFU/ml
<i>E. faecium</i> + <i>S.</i> <i>Typhimurium</i> előkezelés	<i>E. faecium</i> 10 ⁷ vagy 10 ⁸ CFU/ml a patogén előtt	<i>S. Typhimurium</i> 10 ⁶ CFU/ml
<i>E. faecium</i> + <i>S.</i> <i>Typhimurium</i> egyidejű kezelés	<i>E. faecium</i> 10 ⁷ vagy 10 ⁸ CFU/ml a patogénnel egy időben	<i>S. Typhimurium</i> 10 ⁶ CFU/ml
<i>E. faecium</i> + <i>S.</i> <i>Typhimurium</i> utókezelés	<i>E. faecium</i> 10 ⁷ vagy 10 ⁸ CFU/ml a patogén után	<i>S. Typhimurium</i> 10 ⁶ CFU/ml

1. táblázat: a DCFH-DA próba során alkalmazott kezelések összetétele. A további kísérletek során ugyanezt az elrendezést alkalmaztuk.

4.5. A bélhámsejtek paracelluláris permeabilitásának vizsgálata

A barrier funkció sérülésének mértékét FD4 (fluoreszcein izotiocianát-dextrán) próbával vizsgáltuk. Ehhez 0,4 µm poliészter membrán inzerteken (Transwell, Corning) szaporítottuk el az IPEC-J2 sejteket, egészen addig, amíg a membránon egyrétegű bélhámsejtréteg alakult ki, és létrejöttek a szoros sejtkapcsolatok. A sejtek alá és fölé is kiegészítőket tartalmazó DMEM/F12 tápfolyadékot rétegeztünk (pDMEM/F12), így szimulálva az apikális (luminális), illetve a bazolaterális teret. Ha a sejtek alkotta barrier intakt, az apikális térből csak transzcellulárisan juthatnak át anyagok a bazolaterális térbe, ha viszont sérül a barrier, a transzport paracellulárisan is megvalósul.

A baktériumokkal történő elő-, egyidejű és utókezelés a redox vizsgálatához hasonlóan zajlott, mindig apikális irányból. Szintén apikálisan adtuk a sejtekhez az FD4 (fluoreszcein izotiocianát-dextrán, 4 kDa) fluoreszcens jelölőmolekulát tartalmazó, fenolvörös-mentes, pDMEM tápfolyadékot. Az FD4 csak paracellulárisan tud átjutni az IPEC-J2 sejtrétegen, így abból, hogy mennyi jelölőmolekula jutott át a bazolaterális térbe, következtetni lehet arra, hogy a patogén *E. coli* vagy *S. Typhimurium* baktériumok milyen mértékben károsították a TJ-eket, és ezt a hatást az *E. faecium* mennyire képes megelőzni vagy gátolni. A bazolaterális folyadékából 24 óra elteltével mintát vettünk, és fluoreszcens spektrofotométerrel detektáltuk az FD4 jelölőmolekula mennyiségét. Az eredmények értékelése során a minták fluoreszcencia értékeit a kontroll sejtekben tapasztalható fluoreszcenciához képest határoztuk meg (gerjesztési hullámhossz: 485 nm, emissziós hullámhossz: 535 nm).

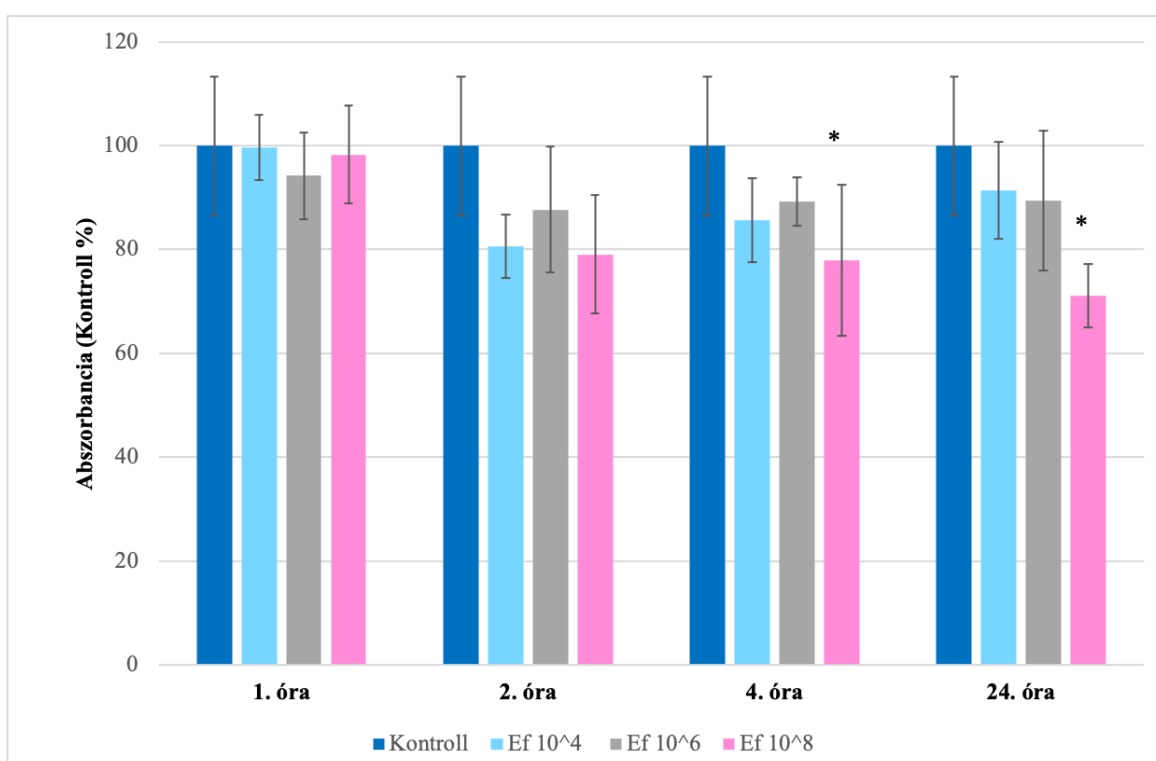
4.6. Statisztikai számítások

A statisztikai számításokat R 3.3.2 (2016) programmal végeztük el. A torzító pontok kizárására, valamint a reziduumok normál eloszlásának megállapítására diagnosztikai analízist használtunk. A csoportátlagok összevetésére egytényezős varianciaanalízist (ANOVA) végeztünk. A csoportok közötti eltérések vizsgálatánál a szignifikancia szintet 5%-ban ($p \leq 0,05$) határoztuk meg.

5. Eredmények

5.1. A sejtek életképességének vizsgálata

Az *E. faecium* szuszpenziók IPEC-J2 sejtek életképességére gyakorolt hatásának meghatározására a Neutral red módszert alkalmaztuk. A 10^8 CFU/ml koncentrációjú *E. faecium* szuszpenziók szignifikánsan csökkentették az IPEC-J2 sejtek életképességét, ha 4 és 24 órán keresztül alkalmaztuk őket (1. diagramm). Más kezelési koncentrációk és kezelési idők nem okoztak szignifikáns változást az IPEC-J2 sejtek életképességében a kontrollhoz képest. Az *E. coli* és a *S. Typhimurium* citotoxikus hatását korábban teszteltük, az optimális kezelési koncentráció 10^6 CFU/ml, az optimális kezelési idő pedig 1 óra.



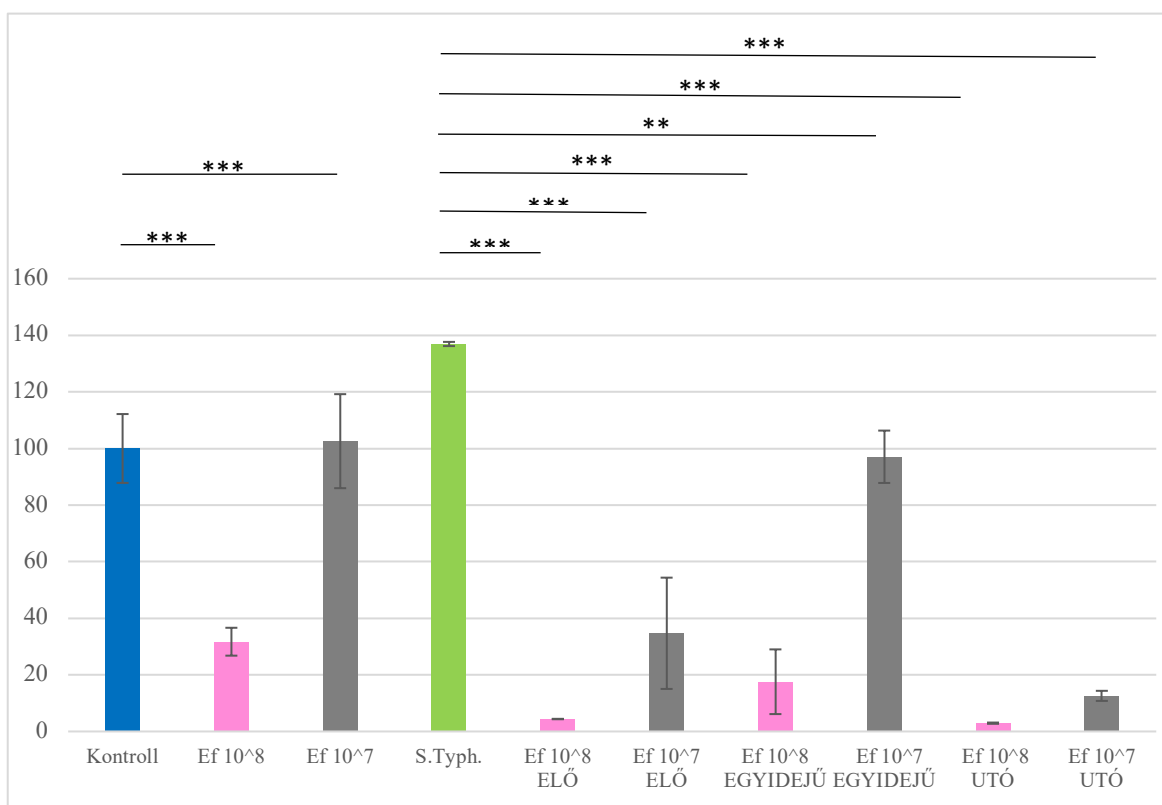
1. diagramm: IPEC-J2 sejtek életképessége *E. faecium* NCIMB 10415-tel történő kezelés után különböző időpontokban.

Kontroll: kezelés mentes sejtenyészet 1 óra után; **1. óra Ef 10^4 :** a sejtek 1 órás kezelése 10^4 CFU/ml szuszpenzával; **1. óra Ef 10^6 :** a sejtek 1 órás kezelése 10^6 CFU/ml szuszpenzával; **1. óra Ef 10^8 :** a sejtek 1 órás kezelése 10^8 CFU/ml szuszpenzával; **2. óra Ef 10^4 :** a sejtek 2 órás kezelése 10^4 CFU/ml szuszpenzával; **2. óra Ef 10^6 :** a sejtek 2 órás kezelése 10^6 CFU/ml szuszpenzával; **2. óra Ef 10^8 :** a sejtek 2 órás kezelése 10^8 CFU/ml szuszpenzával; **4. óra Ef 10^4 :** a sejtek 4 órás kezelése 10^4 CFU/ml szuszpenzával; **4. óra Ef 10^6 :** a sejtek 4 órás kezelése 10^6 CFU/ml szuszpenzával; **4. óra Ef 10^8 :** a sejtek 4 órás kezelése 10^8 CFU/ml szuszpenzával; **24. óra Ef 10^4 :** a sejtek 24 órás kezelése 10^4 CFU/ml szuszpenzával; **24. óra Ef 10^6 :** a sejtek 24 órás kezelése 10^6 CFU/ml szuszpenzával; **24. óra Ef 10^8 :** a sejtek 24 órás kezelése 10^8 CFU/ml szuszpenzával;

*: szignifikáns különbségeket jelez ($p \leq 0,05$) a kontrollhoz képest.

5.2. Belső redox állapot vizsgálat eredményei

Az IPEC-J2 sejtek intracelluláris redox állapotának jellemzésére a DCFH-DA módszert alkalmaztuk. A *S. Typhimurium*-mal végzett kezelés a fluoreszcencia növekedését okozta a kontrollhoz képest (2. diagramm). Mindhárom kezelési kombináció (azaz előkezelés, együttes kezelés és utókezelés *S. Typhimurium*mal és *E. faecium*mal két különböző koncentrációban) a ROS mennyiségének csökkenését eredményezte. Amikor az IPEC-J2 sejteket csak 10^8 CFU/ml és 10^7 CFU/ml *E. faecium*mal kezeltük, a fluoreszcencia csökkenése volt megfigyelhető a kontrollhoz képest.



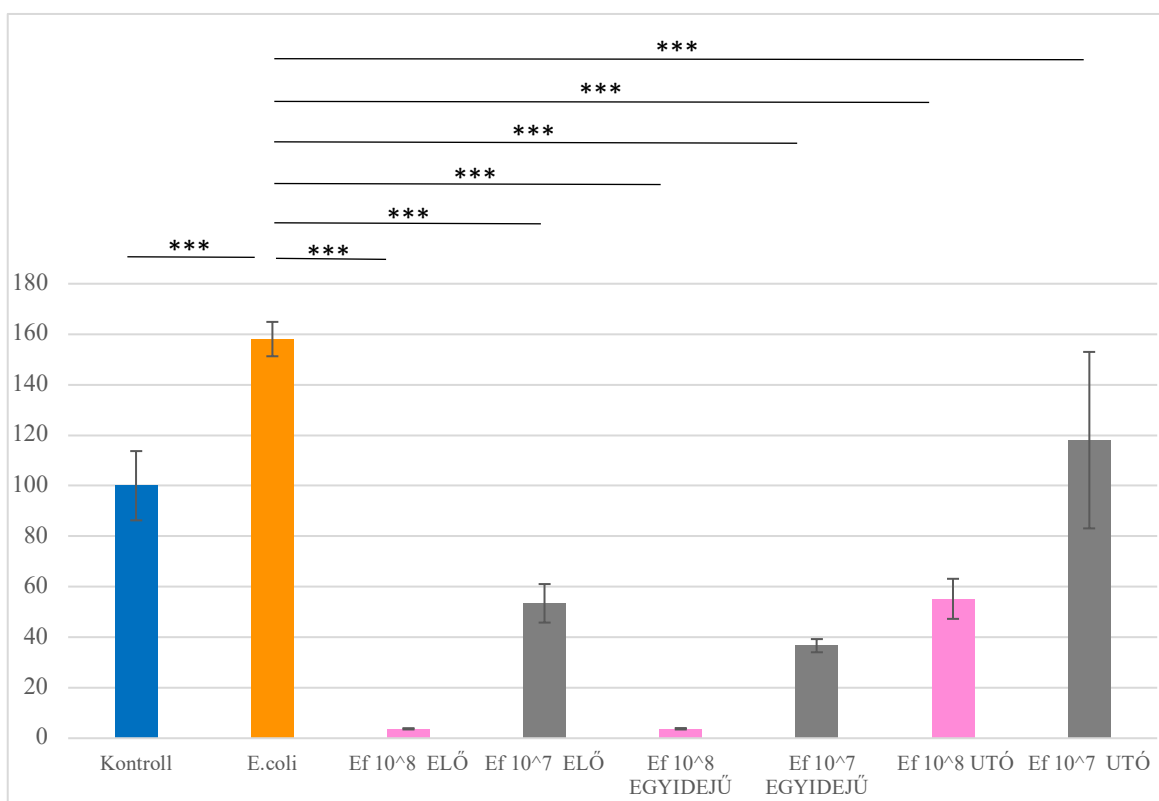
2. diagramm: Az intracelluláris ROS mennyisége *E. faecium*mal, *S. Typhimurium*mal és ezek kombinációjával. Az *E. faecium*ot 1 órával a *S. Typhimurium* hozzáadása előtt (előkezelés), egyidejűleg (társkezelés) vagy utána (utókezelés) adtuk hozzá. Az *E. faecium*ot 10^8 CFU/ml vagy 10^7 CFU/ml koncentrációban adtuk hozzá.

Kontroll: kezelés mentes sejtenyészet; **Ef 10⁸:** *E. faecium* 10^8 CFU/ml; **Ef 10⁷:** *E. faecium* 10^7 CFU/ml; **S. Typh.:** *Salmonella Typhimurium* 10^6 CFU/ml; **Ef 10⁸ ELŐ:** előkezelés *E. faecium*mal 10^8 CFU/ml + *S. Typhimurium* 10^6 CFU/ml; **Ef 10⁷ ELŐ:** előkezelés *E. faecium*mal 10^7 CFU/ml + *S. Typhimurium* 10^6 CFU/ml; **Ef 10⁸ EGYIDEJŰ:** előkezelés *E. faecium*mal 10^8 CFU/ml + *S. Typhimurium* 10^6 CFU/ml; **Ef 10⁷ EGYIDEJŰ:** előkezelés *E. faecium*mal 10^7 CFU/ml + *S. Typhimurium* 10^6 CFU/ml; **Ef 10⁸ UTÓ:** előkezelés *E. faecium*mal 10^8 CFU/ml + *S. Typhimurium* 10^6 CFU/ml; **Ef 10⁷ UTÓ:** előkezelés *E. faecium*mal 10^7 CFU/ml + *S. Typhimurium* 10^6 CFU/ml

** : $p \leq 0,01$

*** : $p \leq 0,001$

Az *E. coli* kezelés a fluoreszcencia növekedését okozta a kontrollhoz képest (3. diagramm). Az *E. faeciummal* végzett előkezelés jelentősen csökkentette a ROS mennyiségét a sejtekben a csak *E. colival* kezelt mintákhoz képest. Mindkét alkalmazott *E. faecium* koncentráció (10^8 CFU/ml és 10^7 CFU/ml) a ROS szignifikáns csökkenését eredményezte. Ugyanez volt megfigyelhető az egyidejű- és utókezelések esetében is.



3. diagramm: Az intracelluláris ROS mennyisége *E. faeciummal*, *E. colival* és ezek kombinációjával. Az *E. faeciumot* 1 órával az *E. coli* hozzáadása előtt (előkezelés), egyidejűleg (társkezelés) vagy utána (utókezelés) adtuk hozzá. Az *E. faeciumot* 10^8 CFU/ml vagy 10^7 CFU/ml koncentrációban adtuk hozzá.

Kontroll: kezelés mentes sejtenyészet; **E. coli:** *E. coli* 10^6 CFU/ml; **Ef 10⁸ ELŐ:** előkezelés *E. faeciummal* 10^8 CFU/ml + *E. coli* 10^6 CFU/ml; **Ef 10⁷ ELŐ:** előkezelés *E. faeciummal* 10^7 CFU/ml + *E. coli* 10^6 CFU/ml; **Ef 10⁸ EGYIDEJŰ:** előkezelés *E. faeciummal* 10^8 CFU/ml + *E. coli* 10^6 CFU/ml; **Ef 10⁷ EGYIDEJŰ:** előkezelés *E. faeciummal* 10^7 CFU/ml + *E. coli* 10^6 CFU/ml; **Ef 10⁸ UTÓ:** előkezelés *E. faeciummal* 10^8 CFU/ml + *E. coli* 10^6 CFU/ml; **Ef 10⁷ UTÓ:** előkezelés *E. faeciummal* 10^7 CFU/ml + *E. coli* 10^6 CFU/ml

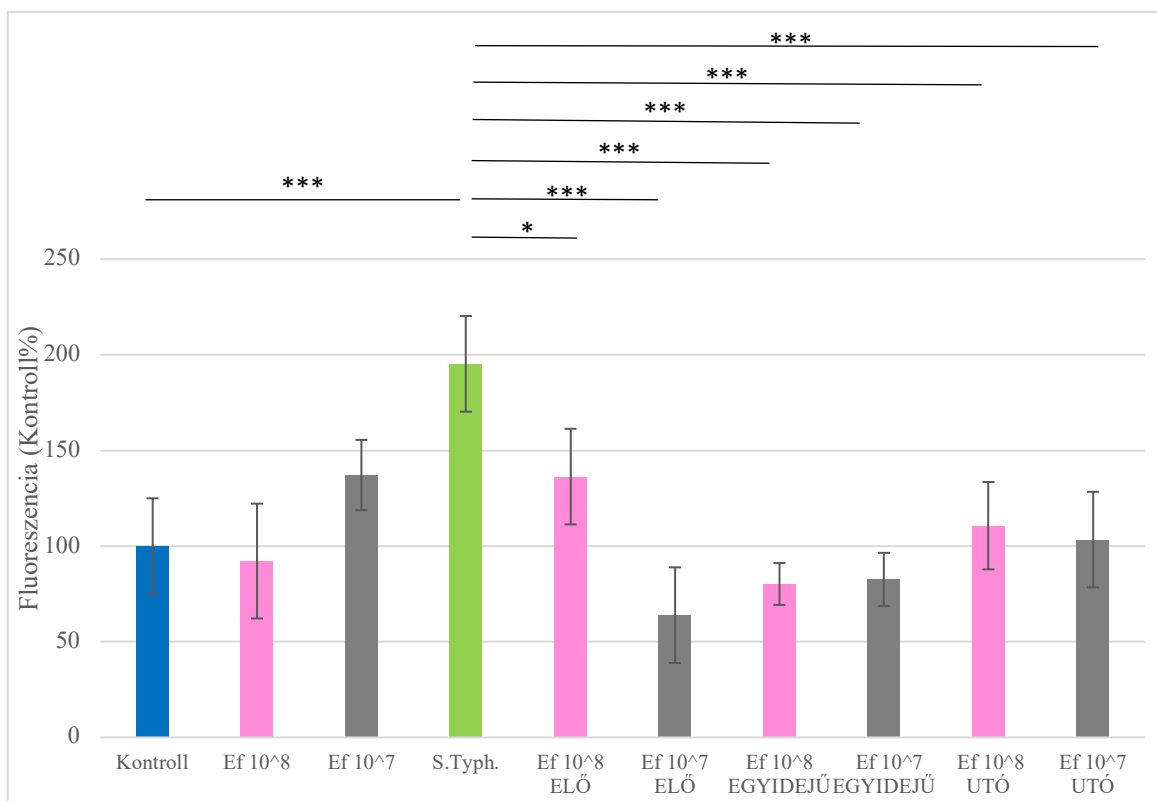
** : $p \leq 0,01$

*** : $p \leq 0,001$

5.3. Paracelluláris permeabilitás vizsgálata

Egy órás kórokozó expozíció után az epiteliális sejtréteg részben megszakadt. A bazolaterális kompartmentben mért fluoreszcencia intenzitás szignifikánsan megnövekedett (a kezeletlen kontroll mintákhoz képest), amikor az IPEC-J2 sejteket *S. Typhimuriummal* (4. diagramm) vagy *E. colival* (5. diagramm) kezeltük. Az *E. faeciummal* végzett kezelés

önmagában, két különböző koncentrációban (10^8 CFU/ml vagy 10^7 CFU/ml) nem eredményezett intenzitás változást (4. diagramm). Az *E. faeciummal* végzett elő-, egyidejű- és utókezelés szignifikánsan csökkentette az FD4 nyomjelző jelenlétét a bazolaterális kamrában, amikor a sejteket *S. typhimurium*-nak tették ki (4. diagramm). Ugyanez a hatás figyelhető meg, amikor az IPEC-J2-t *E. coli* fertőzte meg.

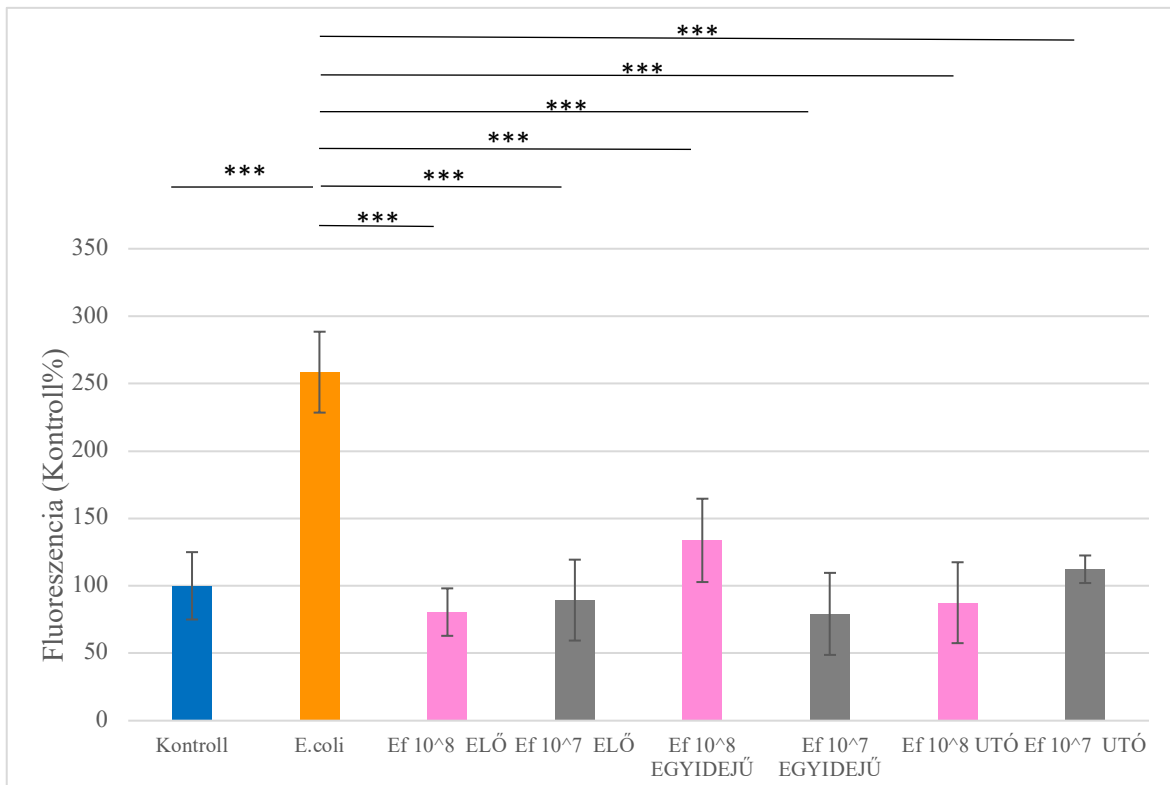


4. diagramm: *E. faeciummal*, *S. Typhimuriummal* és ezek kombinációjával kezelt IPEC-J2 sejtek paracelluláris permeabilitásának vizsgálata. Az *E. faeciumot* 1 órával a *S. Typhimurium* hozzáadása előtt (előkezelés), egyidejűleg (társkezelés) vagy utána (utókezelés) adtuk hozzá. Az *E. faeciumot* 10^8 CFU/ml vagy 10^7 CFU/ml koncentrációban adtuk hozzá.

Kontroll: kezelés mentes sejtenyészet; **Ef 10^8 :** *E. faecium* 10^8 CFU/ml; **Ef 10^7 :** *E. faecium* 10^7 CFU/ml; **S. Typh.:** *Salmonella Typhimurium* 10^6 CFU/ml; **Ef 10^8 ELŐ:** előkezelés *E. faeciummal* 10^8 CFU/ml + *S. Typhimurium* 10^6 CFU/ml; **Ef 10^7 ELŐ:** előkezelés *E. faeciummal* 10^7 CFU/ml + *S. Typhimurium* 10^6 CFU/ml; **Ef 10^8 EGYIDEJŰ:** előkezelés *E. faeciummal* 10^8 CFU/ml + *S. Typhimurium* 10^6 CFU/ml; **Ef 10^7 EGYIDEJŰ:** előkezelés *E. faeciummal* 10^7 CFU/ml + *S. Typhimurium* 10^6 CFU/ml; **Ef 10^8 UTÓ:** előkezelés *E. faeciummal* 10^8 CFU/ml + *S. Typhimurium* 10^6 CFU/ml; **Ef 10^7 UTÓ:** előkezelés *E. faeciummal* 10^7 CFU/ml + *S. Typhimurium* 10^6 CFU/ml

*: $p \leq 0,05$

***: $p \leq 0,001$



5. diagramm: *E. faeciummal*, *E. colival* és ezek kombinációjával kezelt IPEC-J2 sejtek paracelluláris permeabilitásának vizsgálata Az *E. faeciumot* 1 órával az *E. coli* hozzáadása előtt (előkezelés), egyidejűleg (társkezelés) vagy utána (utókezelés) adtuk hozzá. Az *E. faeciumot* 10⁸ CFU/ml vagy 10⁷ CFU/ml koncentrációban adtuk hozzá.

Kontroll: kezelés mentes sejttenyészet; ***E. coli*:** *E. coli* 10⁶ CFU/ml; **Ef 10⁸ ELŐ:** előkezelés *E. faeciummal* 10⁸ CFU/ml + *E. coli* 10⁶ CFU/ml; **Ef 10⁷ ELŐ:** előkezelés *E. faeciummal* 10⁷ CFU/ml + *E. coli* 10⁶ CFU/ml; **Ef 10⁸ EGYIDEJŰ:** előkezelés *E. faeciummal* 10⁸ CFU/ml + *E. coli* 10⁶ CFU/ml; **Ef 10⁷ EGYIDEJŰ:** előkezelés *E. faeciummal* 10⁷ CFU/ml + *E. coli* 10⁶ CFU/ml; **Ef 10⁸ UTÓ:** előkezelés *E. faeciummal* 10⁸ CFU/ml + *E. coli* 10⁶ CFU/ml; **Ef 10⁷ UTÓ:** előkezelés *E. faeciummal* 10⁷ CFU/ml + *E. coli* 10⁶ CFU/ml

***: $p \leq 0,001$

6. Megbeszélés

Jelen tanulmány célja volt, hogy megvizsgálja az *E. faecium* hatását a bélhám redox állapotára és barrier funkciójára abban az esetben, amikor bakteriális eredetű gyulladásnak, illetve oxidatív stressznek van kitéve. Annak vizsgálatára, hogy a probiotikus baktériumtörzs képes-e módosítani sertések gyakori emésztőrendszeri megbetegedéseit okozó patogének által kiváltott kóros folyamatokat, IPEC-J2 sertés eredetű bélhámsejt tenyészetből, valamint *E. coli*, illetve *S. Typhimurium* baktériumokból álló ko-kultúrát alakítottunk ki. Ebben a rendszerben teszteltük az *E. faecium* probiotikus baktériumtörzs hatását. Hipotézisünk az volt, hogy az *E. faecium* csökkentheti a reaktív oxigénszármazékok mennyiségét, és pozitív hatással van a patogének által károsított bélhám integritására. Kezeléseink során elő-, egyidejű- és utókezelés formában alkalmaztuk, hogy modellezzük a probiotikus törzs szerepét a betegségmegelőzésben, illetve a már kialakult fertőzés kezelésében.

Az *E. coli* és a *Salmonella* törzsek oxidatív stresszt indukáló hatásának pontos mechanizmusa nem tisztázott, de a kórokozók oxigént termelhetnek, hogy aerob környezetet hozzanak létre, ezáltal oxidatív stressz okozva a belekben (Wang és mtsai, 2021). Az *E. faecium* elő-, egyidejű- és utókezelésként történő alkalmazásának antioxidáns hatásának igazolására meghatároztuk a kezelési módszerek ROS-termelés mérséklő képességét. Az *E. coli* és az *S. Typhimurium* intracelluláris ROS emelkedést indukált IPEC-J2 sejtekben. A 10^8 CFU/ml vagy 10^7 CFU/ml *E. faeciummal* végzett elő-, egyidejű- és utókezelés jelentősen csökkentette az *E. coli* vagy *S. Typhimurium* által kiváltott ROS képződést. Ez a megállapítás arra utal, hogy az *E. faecium* mérsékelheti az *E. coli* és *S. Typhimurium* által okozott oxidatív stresszt. A Gyógyszertani és Méregtani Tanszék korábbi kutatásai során sor került az *E. faecium* által termelt, számos hatóanyagot tartalmazó felülúszó vizsgálatára. Az *E. faeciumból* származó anyagcseretermékek hatását különböző eredetű lipopoliszacharidok által kiváltott oxidatív stressz esetében vizsgálták. *S. Typhimurium* eredetű LPS által kiváltott oxidatív stressz esetén az *E. faecium* felülúszó jelentős mértékben csökkentette az intracelluláris ROS mennyiséget, azonban ez a pozitív hatás már nem volt tapasztalható kétféle *E. coli* eredetű LPS kezelés esetében. Sőt, az *E. coli* O111:B4 endotoxin és az *E. coli* O127:B8 endotoxin által kiváltott ROS szint emelkedéséhez képest még több intracelluláris reaktív oxigénszármazék jelenléte volt kimutatható az *E. faecium* felülúszóval kezelt mintákban. A tanszéki vizsgálatok során egyes probiotikus törzsek anyagcseretermékei csökkent ROS termelést, míg más törzsek felülúszói (pl. *Lactobacillus rhamnosus*) a

várakozással ellentétben ROS emelkedést eredményeztek (nem publikált eredmények). Ezek az eredmények, összevetve a teljes baktériumszuspenziókkal kapott eredményekkel arra utalnak, hogy a probiotikus baktériumok törzsspecifikus módon befolyásolhatják az IPEC-J2 sejtek intracelluláris ROS-termelését. Úgy tűnik, hogy az oxidatív stressz kiváltására használt baktérium, illetve bakteriális eredetű lipopoliszacharid típusa is befolyásoló tényező, ami arra utal, hogy a probiotikumok különböző stratégiákat alkalmaznak a különböző kórokozók káros hatásainak leküzdésére, továbbá az antioxidáns hatás sem feltétlenül a termelt anyagcseretermékek jótékony hatásához köthető.

A probiotikumok egyik hatásmechanizmusa valószínűleg a bél epiteliális barrierjének megerősítésén alapul. Az *E. coli* és a *S. Typhimurium* megbonthatják a barrier integritását, növelve ezzel a paracelluláris permeabilitás mértékét és a kórokozók bejutásának esélyét a véráramba (Yang és mtsai, 2015). Kísérleteink során az FD4 módszert alkalmaztuk az epiteliális barrier permeabilitás változásainak feltérképezésére. Kísérleteinkben az *E. faecium* önmagában nem volt szignifikáns hatással a bazolaterális kompartmentben mért FD4 festék mennyiségére. Ez az eredmény megegyezik azokkal a tanulmányokkal, amelyek szerint a probiotikumok használata önmagában nem befolyásolja az epiteliális gát az integritását és permeabilitását (Czerucka és mtsai, 2000; Lodemann és mtsai, 2015; Sherman és mtsai, 2005). Más *in vitro* vizsgálatok azonban azt mutatták, hogy a probiotikus baktériumok önmagukban történő alkalmazása is fokozhatja a barrier funkciót (Resta-Lenert és Barrett, 2003).

Az *E. coli* és a *S. Typhimurium* kezelés hatására a bazolaterális kompartmentben mért FD4 festék mennyiségének jelentős növekedését eredményezte a kísérleteink során, ami azt jelzi, hogy ezek a törzsek képesek voltak károsítani a sejtréteg integritását, összhangban a korábbi megállapításokkal (Geens és Niewold, 2010). A kórokozók indukálhatják az enterociták apoptózisát is, ami megnövekedett TER értékeket eredményez, jelezve, hogy a barrier funkció sérült. Feltételeztük, hogy az *E. faecium* képes ellensúlyozni a megnövekedett FD4 áramlást. A Caco-2- és T84-sejteken végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a probiotikus baktériumok képesek megakadályozni az *E. coli* barrier károsító hatását (Anderson és mtsai, 2010; Sherman és mtsai, 2005). Kísérleteink azt mutatták, hogy az *E. faeciummal* végzett elő-, egyidejű- és utókezeléssel is megelőzhető az *E. coli* vagy *S. Typhimurium* által indukált a káros hatás a barrier integritására, és jelentősen csökkent az FD4 mennyisége a bazolaterális kompartmentben.

Összességében az IPEC-J2 sejtek *E. faeciummal* való kezelése számos jótékony hatással van a sejtek integritására, a paracelluláris permeabilitásra és az intracelluláris ROS termelésre.

Az *E. faecium* ígéretes probiotikus kiegészítő lehet emberi és állati felhasználásra egyaránt. Takarmánykiegészítőként használni lehet olyan célból sertések számára, hogy erősítse a gyomor-bélrendszer egészségét és ezáltal közvetetten hozzájáruljon az antibiotikum felhasználás csökkentéséhez (Pézsai és mtsai, 2022). A jövőben további *in vitro* és *in vivo* kísérletek szükségesek a fenti eredmények validálására. A kísérleti modellt érdemes olyan irányban továbbfejleszteni, hogy egyidőben egyszerre több probiotikus törzs bélhámsejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata is lehetővé váljon.

7. Összefoglalás

Az *Escherichia coli* (*E. coli*) és *Salmonella* törzsek által okozott bélbetegségek jelentős gazdasági veszteséghez vezethetnek az élelmiszertermelő állatokban, és veszélyt jelenthetnek az emberi egészségre is. Az említett patogének oxidatív stresszt váltanak ki a bélrendszerben és a bél barrier funkcióját is károsítják. Ezek a hatások együttesen klinikai tünetek kialakulásához vagy akár elhulláshoz is vezethetnek.

A gasztrointesztinális betegségek leküzdésére és hozamfokozásra a sertéságazat nagyrészt az antibiotikumok profilaktikus alkalmazására támaszkodott. Az antibiotikum-rezisztencia miatti aggodalomra való tekintettel az Európai Unióban már lassan két évtizede betiltották az antibiotikumok növekedésserkentőként való használatát, illetve további, 2022-ben életbe lépett rendelkezésekkel szabályozzák az antibiotikumok felelős használatát az állatgyógyászatban. A gasztrointesztinális traktus egészségének megőrzésére alkalmas alternatív takarmánykiegészítők bevezetése a sertéságazat, és az emberi egészség szempontjából is fontos jelentőséggel bír. A probiotikumokat már hosszú ideje használják az állatgyógyászatban, de sok esetben még nem teljesen ismert a pozitív hatásukért felelős pontos hatásmechanizmus és a hatékonyságuk mértéke.

Jelen dolgozatban az *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) probiotikus baktérium IPEC-J2 sertés eredetű bélhámsejteken kifejtett védőhatását vizsgáltuk a patogén *E. coli* és *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) baktériumokkal szemben.

Neutral Red próbával meghatároztuk, hogy az IPEC-J2 sejtek életképességét az *E. faecium* 10^7 és 10^8 CFU/ml koncentrációban alkalmazva nem befolyásolja. A további kísérletekben ezeket a koncentrációkat alkalmaztuk. A sejtek intracelluláris redox állapotának vizsgálatához DCFH-DA próbát alkalmaztunk, melynek során három különböző kezelést alkalmazva (elő-, egyidejű és utókezelés) adtuk hozzá a sejtekhez az *E. faeciumot*, valamint a patogén baktériumokat. A probiotikus törzs hatását a bélhámsejtek paracelluláris permeabilitására FD4 fluoreszcens próbával teszteltük.

Kutatásunk eredményei azt bizonyítják, hogy az *E. faecium* jelentősen csökkenti a sertés-bélhámsejtekben az *E. coli* és *S. Typhimurium* által kiváltott oxidatív stresszt, és emellett képes mérsékelni a barrier funkció károsodását. További *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok szükségesek az *E. faecium* pozitív hatásának háttérében álló folyamatok felderítésére.

8. Summary

Intestinal diseases caused by *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Salmonella* spp can lead to significant economic losses in food producing animals and can also pose a risk to human health. These pathogens induce oxidative stress in the intestinal tract and impair the function of the intestinal barrier. Taken together, these effects can lead to the development of clinical symptoms or even death.

The pig industry has relied largely on the prophylactic use of antibiotics to combat gastrointestinal diseases and increase production. In response to concerns about antibiotic resistance, the use of antibiotics as growth promoters has been banned in the European Union for almost two decades, and further regulations were introduced in 2022 to control the responsible use of antibiotics in veterinary medicine. The introduction of alternative feed additives to maintain the health of the gastrointestinal tract is important for the pig sector and for human health. Probiotics have been used in veterinary medicine for a long time, but in many cases the exact mechanism of action responsible for their beneficial effects and the extent of their efficacy are not yet fully understood.

In the present study, the protective effect of the probiotic *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) on IPEC-J2 porcine enteric epithelial cells against pathogenic *E. coli* and *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) was investigated. The Neutral Red assay was used to determine that the viability of IPEC-J2 cells was not affected by *E. faecium* at concentrations of 10^7 and 10^8 CFU/ml. These concentrations were used in further experiments. To investigate the intracellular redox status of the cells, a DCFH-DA assay was applied, in which *E. faecium* and pathogenic bacteria were added to the cells using three different treatments (pre-, co-, and post-treatment). The effect of the probiotic strain on the paracellular permeability of the intestinal epithelial cells was tested using the FD4 fluorescent assay.

The results of our study demonstrate that *E. faecium* significantly reduces the oxidative stress induced by *E. coli* and *S. Typhimurium* in porcine intestinal epithelial cells and is also able to attenuate the damage of barrier function. Further *in vitro* and *in vivo* studies are needed to elucidate the processes underlying the positive effect of *E. faecium*.

9. Irodalomjegyzék

- Aviello, G., Knaus, U. G., (2017). ROS in gastrointestinal inflammation: Rescue Or Sabotage? In *British Journal of Pharmacology*, 174: 1704–1718.
<https://doi.org/10.1111/bph.13428>
- Az Európai Parlament és az Európai Tanács. (2018). *Az Európai Parlament és a Tanács (EU) 2019/ rendelete (2018. december 11.) az állatgyógyászati készítményekről és a 2001/82/EK irányelv hatályon kívül helyezéséről.*
<https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2019/6/oj>
Megtekintve: 2023.09.26
- Balamurugan, T., Jayaganthan, P., Perumal, P., Namagirilakshmi, S., Anitha, R., Selvaraj, P., Krupakaran, P., Jayachandran, S., (2013). *Application of Probiotics, Prebiotics and Synbiotics in Livestock.*
https://www.conference.bonfring.org/papers/gandhigram_psf2013/plp11.pdf
Megtekintve: 2023.09.20.
- Cencič, A., Langerholc, T. (2010). Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology - A review. In *International Journal of Food Microbiology*, 141 Suppl 1, S4-S14
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.026>
- David H. Francis, PhD, (2002). Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. *J Swine Health Prod.* 2002;10(4):171-175.
<https://www.aasv.org/shap/issues/v10n4/v10n4p171.pdf>
Megtekintve: 2023.08.15.
- D’Incau, M., Salogni, C., Giovannini, S., Ruggeri, J., Scali, F., Tonni, M., Formenti, N., Guarneri, F., Pasquali, P., Alborali, G. L., (2021). Occurrence of *Salmonella* Typhimurium and its monophasic variant (4, [5],12:i:-) in healthy and clinically ill pigs in northern Italy. *Porcine Health Management*, 7(1).
<https://doi.org/10.1186/s40813-021-00214-1>
- European Food Safety Authority, (2022). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020. *EFSA Journal*, 20(3), 9.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7209>

- Európai Bizottság, (2005). *Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect.*
https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP_05_1687
Megtekintve: 2023.09.26.
- FAO/WHO, (2001). *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations.*
- Gaggia, F., Mattarelli, P., Biavati, B., (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. In *International Journal of Food Microbiology*, 141 Suppl
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031>
- Isaacson, R., Kim, H. B., (2012). The intestinal microbiome of the pig. In *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases* 13: 100–109.
<https://doi.org/10.1017/S1466252312000084>
- Klingspor, S., Bondzio, A., Martens, H., Aschenbach, J. R., Bratz, K., Tedin, K., Einspanier, R., Lodemann, U., (2015). Enterococcus faecium NCIMB 10415 Modulates Epithelial Integrity, Heat Shock Protein, and Proinflammatory Cytokine Response in Intestinal Cells. *Mediators of Inflammation*, 2015, 1–11.
<https://doi.org/10.1155/2015/304149>
- Markowiak, P., Ślizewska, K., (2018). The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. In *Gut Pathogens*, 10, 21 BioMed Central Ltd.
<https://doi.org/10.1186/s13099-018-0250-0>
- Natividad, J. M. M., Verdu, E. F., (2013). Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: Pathological and therapeutic implications. In *Pharmacological Research*, 69: 42-51.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.007>
- Oswald, I. P., (2006). Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of the pig intestine. *Veterinary Research*, 37(3), 359–368.
<https://doi.org/10.1051/vetres:2006006i>
- Pluske, J. R., Turpin, D. L., Kim, J. C. (2018). Gastrointestinal tract (gut) health in the young pig. In *Animal Nutrition* 4: 187–196.
<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.12.004>

- Ponce de León-Rodríguez, M. del C., Guyot, J. P., Laurent-Babot, C., (2019). Intestinal in vitro cell culture models and their potential to study the effect of food components on intestinal inflammation. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59(22): 3648–3666.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1506734>
- Röhlich Pál, (2006). *Szövezzet*, 4(13): 283–285. Semmelweis Kiadó.
- Schierack, P., Nordhoff, M., Pollmann, M., Weyrauch, K. D., Amasheh, S., Lodemann, U., Jores, J., Tachu, B., Kleta, S., Blikslager, A., Tedin, K., Wieler, L. H. (2006). Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochemistry and Cell Biology*, 125(3), 293–305.
<https://doi.org/10.1007/s00418-005-0067-z>
- Sommer, F., Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota-masters of host development and physiology. In *Nature Reviews Microbiology* 11(4): 227–238.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2974>
- Souto, M. S. M., Coura, F. M., Dorneles, E. M. S., Stynen, A. P. R., Alves, T. M., Santana, J. A., Pauletti, R. B., Guedes, R. M. C., Viott, A. M., Heinemann, M. B., Lage, A. P. (2017). Antimicrobial susceptibility and phylotyping profile of pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolates from calves and pigs in Minas Gerais, Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 49(1), 13–23.
<https://doi.org/10.1007/s11250-016-1152-0>
- Steven A. Carlson, Alison E. Barnhill, Ronald W. Griffith. (2012): Salmonellosis. *Diseases of swine*, edited by Jeffrey J. Zimmerman, Locke A. Kariker, Alejandro Ramirez, Kent J. Schwartz, Gregory W. Stevenson 10: 826-833.
- Stokes, C. R., Bailey, M., Haverson, K. (2001). Development and function of the pig gastrointestinal immune system. In *Digestive physiology of pigs. Proceedings of the 8th Symposium, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 20-22 June 2000* (59–66).
<https://doi.org/10.1079/9780851995175.0059>
- Sun, Y., Kim, S. W. (2017). Intestinal challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli* in pigs, and nutritional intervention to prevent postweaning diarrhea. *Animal Nutrition*, 3(4), 322–330.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.10.001>

- Van Boeckel, T. P., Pires, J., Silvester, R., Zhao, C., Song, J., Criscuolo, N. G., Gilbert, M., Bonhoeffer, S., Laxminarayan, R. (2019). Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- And middle-income countries. *Science*, 365(6459).
<https://doi.org/10.1126/science.aaw1944>
- Wang, Y., Chen, Y., Zhang, X., Lu, Y., Chen, H. (2020). New insights in intestinal oxidative stress damage and the health intervention effects of nutrients: A review. In *Journal of Functional Foods* (Köt. 75).
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104248>
- Yadav S Bajagai, Athol V Klieve, Peter J Dart, Wayne L Bryden. (2016). *Probiotics in animal nutrition*. 5–7.
- Zakrzewski, S. S., Richter, J. F., Krug, S. M., Jebautzke, B., Lee, I. F. M., Rieger, J., Sachtleben, M., Bondzio, A., Schulzke, J. D., Fromm, M., Günze, D. (2013). Improved cell line IPEC-J2, characterized as a model for porcine jejunal epithelium. *PLoS ONE*, 8(11).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079643>
- Zheng, L., Duarte, M. E., Sevarolli Loftus, A., Kim, S. W. (2021). Intestinal Health of Pigs Upon Weaning: Challenges and Nutritional Intervention. In *Frontiers in Veterinary Science* (Köt. 8).
<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.628258>

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Jerzsele Ákosnak, a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék vezetőjének, hogy támogatta a tudományos munkám és biztosította a kutatásunkhoz szükséges feltételeket.

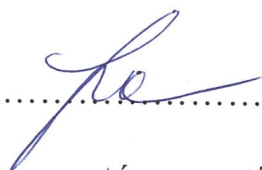
Legnagyobb köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Farkas Orsolyának és Dr. Palkovicsné Pézsa Nikolettnek, akik nélkül nem készülhetett volna el ez a dolgozat. Köszönöm, hogy szívesen fogadtak a tanszéken, és a munkám során mindig számíthattam a segítségükre és támogatásukra. Szeretném megköszönni a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék összes munkatársának, hogy hozzáállásukkal támogató szellemben segítették a munkámat.

Hálával tartozom a családomnak és barátaimnak, hogy minden nehézségben mellettem álltak és segítettek. Külön köszönettel tartozom Lengyel Diánának és Somogyi Fanninak a tanácsokért és bátorításért, amelyek sokat segítettek a dolgozatom megírása során.

Témavezetői nyilatkozat TDK dolgozathoz

Alulírott Dr. Farkas Orsolya és Dr. Palkócsné Péter Nikolett, mint témavezető nyilatkozom, hogy (név).....N.A.G.Y. ESTER.....VI évfolyamos hallgató „Enterococcus faecium ketajóval vizsgálata belbetegek - baktérium biometria” című dolgozatát átolvastam és jóváhagytam, részvételét támogatom az Állatorvostudományi Egyetem 2023. évi Tudományos Diákköri Konferenciáján. Továbbá nyilatkozom, hogy a feltöltött TDK dolgozat plágiumellenőrzésen sikeresen átesett és az esetlegesen feltárt egyezőség az Egyetemi iránymutatásoknak/szabályoknak megfelel.

Budapest, 2023 év.....10.....hó 19 nap.


.....

témavezető



Diplomamunka konzultációs lap állatorvostan hallgatók részére

A hallgató neve: Nagy Eszter
 Neptun-kódja: AKSNKY
 A témavezető neve és beosztása: Dr. Farkas Orsolya tud. tan., Pétervárosi Péterse, Nővér, tud. tan.
 Tanszék: Cyógyszertani és Mérési Tanszék
 A diplomadolgozat címe: Probiótus bakterium (E. faecium) hatáskör vizsgálata fertés bélbaktériumok

Konzultáció - 1. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2023	03	21	Élettanesej vizsgálata IPEC-pr széklet	
2.	2023	04	03	ROS mérés DCFU-DA	
3.	2023	04	06	ROS mérés Duplex	
4.	2023	05	08	EUSA mérés	
5.	2023	05	14	Eredmények megbeszélés	

Érdemjegy az első félév végén: jeles (5)

Konzultáció - 2. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2023	09	18	Iskolai előadás	
2.	2023	09	25	Eredmény, követelt.	
3.	2023	10	09	TDK dolgozat véglegesítés	
4.	2023	10	13	TDK dolgozat ellenőrzés	
5.	2023	10	27	Felkészítés prezentációra	

Érdemjegy a második félév végén: jeles (5)

A nyomtatvány a hallgatói és a tanszéki ügyintézői aláírás, valamint az átvétel dátuma nélkül nem érvényes. A konzultációs lap a diplomamunka mellékletét képezi!



A diplomamunka - a szakra vonatkozóan - a Tanulmányi- és Vizsgaszabályzatban, valamint az Útmutató a szakdolgozatok/diplomamunkák készítéséhez című mellékletében leírt követelményeknek megfelel.

A diplomamunka befogadható, védeésre alkalmasnak találtam.

Hallgató aláírása: *Magor*

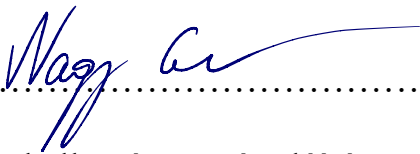
[Signature]
.....
témavezető aláírása

Tanszéki előadó aláírása: *[Signature]* Átvétel dátuma: *2023.10.26.*

Nyilatkozat

Alulírott Nagy Eszter nyilatkozom, hogy diplomamunkám, melynek címe Enterococcus faecium hatásának vizsgálata bélhámsejt - baktérium kokultúrán tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2023. évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2023.11.16.


.....
a hallgató neve és aláírása