

**Állatorvostudományi Egyetem**  
**Élettani és Biokémiai Tanszék**  
**Biokémiai Osztály**

***Bacillus* kivonatok hatásai csirke eredetű  
bél explant tenyészetben**

**Készítette:**

Dudás Réka

**Témavezetők:**

Dr. Tráj Patrik

Állatorvostudományi Egyetem, Élettani és Biokémiai Tanszék,  
PhD hallgató

Dr. Mátis Gábor

Állatorvostudományi Egyetem, Élettani és Biokémiai Tanszék,  
Egyetemi docens

**Budapest, 2023**

## Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	2
2. Bevezetés.....	3
3. Irodalmi áttekintés.....	5
3.1. A bél felépítése és védekező mechanizmusai, a mikrobióta szerepe.....	5
3.1.1. Mikrobióta.....	6
3.1.2. Bél explant modellek.....	6
3.2. A bélműködés befolyásolása.....	7
3.2.1. Probiotikumok.....	7
3.2.2. Prebiotikumok.....	8
3.2.3. Szimbiotikumok.....	8
3.3. Gyulladás.....	8
3.3.1. Citokinek.....	10
3.3.2. A kaszpáz-3 és az apoptózis.....	13
3.3.3. Az oxidatív stressz.....	14
3.4. A <i>Bacillus</i> nemzetség.....	14
3.4.1. <i>Bacillus licheniformis</i> .....	15
3.4.2. <i>Bacillus mojavensis</i> .....	15
4. Célkitűzések.....	17
5. Anyag és módszertan.....	18
5.1. A kísérlethez használt állatok, a szövetminta izolálása, az explantok kimetszése.....	18
5.2. <i>B. licheniformis</i> és <i>B. mojavensis</i> kivonatok.....	19
5.3. Az explantok tenyésztése és kezelése.....	19
5.4. Mérések.....	20
6. Eredmények.....	23
7. Megbeszélés.....	30
8. Összefoglalás.....	33
9. Summary.....	34
10. Irodalomjegyzék.....	35
11. Köszönetnyilvánítás.....	39

## 1. Rövidítések jegyzéke

AMP	Antimikrobiális peptid
CCR	Kemokin receptor
DAMP	Sejt- és szövetsérülés asszociált molekuláris mintázatok
DC	Dendritikus sejt
DNS	Dezoxiribonukleinsav
FADD	FAS-associated death domain protein
FAO	Food and Agriculture Organization
GALT	Gut-associated lymphoid tissue
HOCl	Hipoklórossav
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IL	Interleukin
JAK	Janus-kináz
LPS	Lipopoliszacharid
MAPK	Mitogén aktivált protein kináz
MyD88	Myeloid differentációs faktor 88
NF- $\kappa$ B	Nukleáris faktor $\kappa$ B
NK	Természetes ölósejt
PAMP	Patogén asszociált molekuláris mintázatok
poly I:C	Poliinozin-policitidilsav
PRR	Mintázat felismerő receptor
RANTES	Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted
RNS	Reaktív nitrogén gyökök
ROS	Reaktív oxigén gyökök
RS	Reaktív gyökök
SCFA	Rövid szénláncú zsírsavak
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
T <sub>h</sub>	T- helper limfocita
TLR	Toll-like receptor
TNF- $\alpha$	Tumor nekrosis faktor-alfa
T <sub>reg</sub>	T-regulator limfocita
WHO	World Health Organization

## 2. Bevezetés

Az állati eredetű élelmiszerek iránti kereslet a föld népességének növekedésével együtt világszerte rohamosan növekszik. Ezenkívül az emberek életmódja is változó tendenciát mutat, változnak az étkezési szokások, illetve az egy főre jutó átlagkereset is. A baromfihús a legolcsóbb állati fehérjeforrás, amely a sertéshús után másodikként hozzájárul a kereslet kielégítéséhez [1–3]. A baromfiiparnak egyre nagyobb mennyiségeket kell termelnie úgy, hogy mindeközben a minőség és a költséghatékonyság ne szenvedjen kárt, valamint az egyre szigorúbb élelmiszerhigiéniai elvárásoknak, a HACCP irányelveinek is meg kell felelnie [4].

Napjainkban fontos szempont a fogyasztók egészsége, melynek védelmét már az állattartásban el kell kezdeni, ugyanis az állati bélrendszerben előforduló kórokozók közül számos képes az élelmiszereken keresztül megbetegedést okozni az emberben. Ilyenek például egyes *Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria*, *Yersinia* nemzetségekbe tartozó fajok, illetve az *Escherichia coli*. Brojlercsirke esetében például a feldolgozott hús bakteriális szennyeződése számos forrásból eredhet, beleértve az élő brojlereket, az üzemi berendezéseket, a környezetet és az üzem alkalmazottait [5–7]. A baromfitartás során a brojlercsirkék általában számottevő stressznek vannak kitéve, különösen, ha nagy állománysűrűséggel nevelik őket, ami megviseli a szervezetet és az immunrendszer működési zavarát eredményezi [8]. Ez rossz egészségügyi állapothoz vezet, csökkenti az állatok növekedési erélyét, bélműködési zavarokat okoz és rontja a takarmányhasznosulást, ezáltal jelentősen növekednek az állattartó telepi költségek [9].

A hús minőségének és biztonságának megőrzése érdekében új állattenyésztési és állattartási módszereket vezetnek be, melyek figyelembe veszik az állatjólétet és a környezetvédelmet is. Az állati takarmányok és takarmánykiegészítők fontos részei ennek a rendszernek, szigorú kritériumoknak kell megfelelniük úgy, hogy lehetőség szerint az állattenyésztés költségeit ne növeljék. A nem túl távoli múltban széles körben elterjedt volt az antibiotikumok és más gyógyszerek használata, különböző megbetegedések megelőzésére, a mikrobióta szabályozására, valamint termelésnövelés és hozamfokozás céljából. Ezen gyakorlat alkalmazása eredményezte, egyes gyógyszerrezisztens mikroorganizmusok kialakulását, mely fokozott veszélyt jelent a fogyasztókra nézve. 2006. január 1-jén az Európai Unióban ezért betiltották az antibiotikumok hozamfokozó szerként való használatát. Ennek eredménye, hogy a termelés növelése és az állatok egészségének megőrzése érdekében a megelőzésen, a jó tartástechnológián, a higiénian és az alternatív,

hozamfokozásra alkalmas készítmények alkalmazásán van a hangsúly, és számos tudományos kutatás zajlik a témában [10–14].

Kutatásunk célja, hogy két lehetséges probiotikus hatású anyag, a *Bacillus licheniformis* és *Bacillus mojavensis* dextrózos kivonatait és azok hatékonyságát, valamint ártalmatlanságát vizsgáljuk csirke eredetű *ex vivo* modellrendszeren.

### **3. Irodalmi áttekintés**

#### **3.1. A bél felépítése és védekező mechanizmusai, a mikrobióta szerepe**

Az emésztőkészülék elsődleges feladata a táplálék megemésztése, a tápanyagok felszívása, az állat anyagcserefolyamatához. Mivel ezáltal állandó kapcsolatban van a külvilággal, ezért fontos immunológiai feladat is hárul rá, jelentős szerepe van a patogén kórokozók elleni küzdelemben. A kórokozó baktériumok képesek akár helyben, akár a bél sejtjein, azok receptorain keresztül, illetve a bélből a keringésbe jutva károsítani az állat egészségét [15].

A vékonybél felszívó felületének növelése érdekében a lumen felé a nyálkahártya nyúlványokat képez, ezek a bélbolyhok. A bélbolyhokat kefeszegéllyel rendelkező egyrétegű hengerhám borítja. A szövetet alkotó enterociták feladata a tápanyagok transzportja. A sejtek közt tight junction kapcsolat található, amely meggátolja, hogy a kórokozók a sejtek közt a szervezetbe jussanak. Az enterociták közt helyezkednek el a kehelysejtek. Az általuk termelt mucin egy olyan réteget hoz létre a sejtek felületén, mely védőgátat képez a lumen és az enterociták közt, ezáltal megnehezítve a kórokozók szervezetbe jutását, illetve megfelelő környezetet teremt a bélben lakó szimbióta mikroorganizmusoknak. A bélbolyhok alján, a Lieberkühn-féle kriptákban található a Paneth-sejtek, melyek szerepe jelentős a bél mikrobiótájának szabályozásában, a táplálékkal bejutó kórokozók elleni védekezésben. A baktériumok jelenléte ingereli a sejteket különböző emésztőenzimek, például lizozimek és foszfolipáz-A2, valamint antimikrobiális peptidek (AMP) termelésére, melyek aztán károsítják a kórokozót [16]. A bélbe jutó kórokozókkal szemben, nem csak az enterociták közötti tight junction kapcsolatok és a Paneth-sejtek által termelt enzimek nyújtanak védelmet, hanem a nyálkahártyában megtalálható limfoid szövetek is. A madaraknál a bélrendszerhez kapcsolódó, nyálkahártyában diffúzan elhelyezkedő nyirokszövet (GALT) jól fejlett. A limfoid sejtek megtalálhatók a hámsejtek közt, és a lamina propriaiban, valamint a Peyer-plakkokban és a vakbél mellett található tonsillákban. Az emlősökhöz hasonlóan a Peyer-plakkok a GALT aggregát, nyiroktüszőkből felépülő másodlagos nyirokszervei csirkében. Két hetes korig szemmel jól láthatók és a számuk a kor előrehaladtával folyamatosan nő. A GALT képezi az immunrendszer első vonalát a nyálkahártya felületén keresztül jutó kórokozókkal szemben. Az immunrendszer, miközben tolerálja a szervezet saját mikrobiótáját, képes gyorsan és hatékonyan fellépni a kórokozókkal szemben [17].

### 3.1.1. Mikrobióta

Minden emlős szervezetben mikroorganizmusok közössége él, mely elengedhetetlen a szervezet normális működéséhez. Ezek közt található baktériumok, archeák, gombák, protozoák és vírusok. Ezek a gazdaszervezettel szimbiózisban, dinamikus egyensúlyban élnek, így egy élőlény többfajú hibrid szervezetként is felfogható. Ez egy olyan folyamatosan változó rendszer, melyre a gazdaszervezet élete alatt bekövetkező változások, mint a környezetváltozás, takarmányozás és a megbetegedések is mind hatással vannak [18, 19]. A mikrobiótának számos különböző funkciót tulajdonítanak. Részt vesz a bélbarrier integritásának fenntartásában, megakadályozza a patogén szervezetek megtelepedését [20]. A bélmikrobióta a gazdaszervezettel együtt fejlődik, és részt vesz a tápanyagok emésztésében, javítja a bélrendszer fejlődését és egészségét, szabályozza a szervezet anyagcseréjét, energiaháztartását és az immunrendszer működését is befolyásolja [21, 22].

### 3.1.2. Bél explant modellek

Az explant modelleket az állat és a sejtenyészet közti köztes megoldásnak fejlesztették ki, így lehetővé vált a célszerv és -szövet fiziológiás működésének és kóros állapotainak tanulmányozása [23]. Az első explantok, *ex vivo* modellek múltja az 1950-es évekig nyúlik vissza, amikor a tápanyagok felszívódásának mechanizmusát tanulmányozták kimetszett bélszakaszokon. Kezdetben a szövet- és szervtenyésztés teljes mértékben embrionális szövetekre korlátozódott, míg 1959-ben Trowell először tenyésztett érett szöveteket szintetikus médiumokban [24, 25]. Tíz évvel később Browning és Trier sikeresen hozott létre vékonybél nyálkahártya *ex vivo* kultúrát Trowell módszere alapján [26]. Napjainkban számos, mind humán, mind állati kutatás alkalmaz bél explantokat. A modell lehetővé teszi különböző anyagok hatásának vizsgálatát. Így például explant tenyészeteken írták le a gliadin oktani szerepét az emberi cöliákia hátterében, illetve a modell jelentősen előmozdította a bélben zajló gyulladásos válasz megértését más betegségek, mint például az IBD esetében is [23].

Az explantok készítése során adott bélszakaszból mintát veszünk. Erről a mintáról tetszés szerint eltávolítható az *adventitia*, *muscularis mucosae* és a *submucosa*, hogy csak a hámréteg maradjon. A megtisztított darabokból bélexplantot készítenek biopsziás körkések segítségével, majd ezt különféle médiumokban tartják fent. Ennek a módszernek az előnye, hogy a létrehozott tenyészet jobban modellezi a bélre jellemző sejt-sejt kölcsönhatásokat, a hámsejteken kívül jelen vannak limfoid sejtek és egyéb sejtek, amik szerepet játszanak a bél fiziológiás működésében. A modell jelentős hátránya, hogy a szövet rendkívül gyorsan

degenerálódik [23]. A tenyésztés legkritikusabb pontja az oxigéndús környezet, illetve a folyadék, a szövet és a levegő határfelületeinek a viszonya, ugyanis a sejtnekrózist elsősorban az anoxia okozza [27]. Szintén hátrány, hogy explantokat alkalmazva nem alakítható ki nagyszámú kezelési csoport. A tenyésztés hátrányainak leküzdésére megoldás lehet a szövetminták méretének csökkentése [28, 29].

## **3.2. A bélműködés befolyásolása**

### **3.2.1. Probiotikumok**

Az első, aki észrevette, hogy léteznek bizonyos mikroorganizmusok és anyagok, melyek hozzájárulnak a bélcsatorna mikrobiális egyensúlyához Metchnikov volt 1907-ben [30]. A probiotikum szót 1960-ban alkották meg, a latin eredetű „*pro*” és a görög eredetű „*bios*” szavakból, melynek jelentése „az életért” [31]. Később, 1989-ben Fuller pontosította az addigi definíciókat és a probiotikumokat úgy nevezte: „élő mikrobiális takarmány kiegészítő, mely jótékony hatással van a gazdaszervezetre és javítja a bélrendszer egyensúlyát [32]. A napjainkban alkalmazott fogalom meghatározást a FAO és a WHO hozta létre 2001-ben: „élő mikroorganizmusok, melyek megfelelő mennyiség bevitele esetén pozitív egészségügyi hatással vannak a gazdaszervezetre” [33, 34].

A probiotikumok képesek javítani a baromfi növekedési erélyét, a takarmányfelvételt és a takarmány hasznosulást, valamint ezek által a vágóhídon a hús hozamát és minőségét. A takarmányozás jelenti a legjelentősebb költséget a baromfihús termelés során, így a takarmány hasznosulásának javulása számottevően növelheti a termelés gazdaságosságát [35–39]. Ezen felül a probiotikus készítmények képesek megelőzni és kontrollálni az enterális megbetegedéseket okozó patogén kórokozókat, mint a *Salmonella* és *Campylobacter* fajokat. Egy másik nagy probléma, amire potenciális megoldást jelenthet a probiotikumok alkalmazása, az antibiotikumok túlzott használata miatt kialakult antibiotikum-rezisztencia [40–42]. A probiotikumok AMP-eket, köztük bakteriocineket termelnek, valamint rövid szénláncú zsírsavakkal (SCFA) látják el a szervezetet. A kórokozó baktérium törzsekkel szemben antimikrobiális és antiadhéziós hatással bírnak, képesek modulálni a gastrointestinális rendellenességeket [43]. Mindezen felül bizonyított hatásuk van a baromfi egyéb enterális megbetegedéseiben, mint például a necrotikus enteritisben és a kokcidiózisban, melyek nagy gazdasági károkat képesek okozni a baromfiiparban [44, 45].



### 3.2.2. Prebiotikumok

A probiotikumok mellett a prebiotikumok is fontos takarmány-adalékanyagok. A prebiotikumokat először 1995-ben definiálták, mint „olyan élelmiszer-összetevők, melyek nem emészthetők, jótékony hatással vannak a gazdaszervezetre azáltal, hogy szelektíven stimulálják a bélben egy vagy több baktériumfaj növekedését és/vagy aktivitását, és ezáltal valóban javítják a gazdaszervezet egészségét” [46].

A jelenleg használt definíciót az International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics alkotta meg 2016-ban. Ez alapján a probiotikumok nem csak szénhidrátok, hanem például polifenolok vagy többszörösen telítetlen zsírsavak is lehetnek [47]. A gazdaszervezet számára emészthetetlen anyagok eljutnak a vastagbélbe, ahol a különböző baktériumok fermentációval SCFA-á alakítják őket. Mivel ezek a tápanyagok a mikroflóra számára értékesek, és a különböző mikroorganizmusok más-más tápanyagok felhasználását preferálják, ezért befolyásolható a mikroflóra összetétele, valamint aktivitása [48].

### 3.2.3. Szimbiotikumok

A prebiotikumok fogalmával együtt született meg a szimbiotikumok fogalma is 1995-ben. A szimbiotikumok pro- és prebiotikumok keverékei, amelyek javítják a mikrobiális étrendkiegészítők hatékonyságát és javítják a túlélését a béltraktusban azzal, hogy szelektíven segítik a mikroorganizmusok aktivitását és szaporodását, ezáltal jótékony hatásuk van a gazdaszervezetre [46]. Tehát a megfelelő kombinációban alkalmazva a pro- és prebiotikumot együtt sokkal hatásosabbak, mint külön [49].

## 3.3. Gyulladás

A gyulladásról szóló mai tudás az ókorban gyökerezik. Már az ókori egyiptomiak is leírták ezt a jelenséget, ám először Aulus Cornelius Celsus, római író fogalmazta meg a négy alapvető tünetét, melyek: *rubor* (vörösség), *tumor* (duzzanat), *calor* (melegség), *dolor* (fájdalom). Ezt később, 1858-ban Rudolf Virchow egészítette ki az ötödik fő tünettől, mely a *functio laesa* (csökkent működés). Az orvostudomány a mai napig ezeket a tüneteket használja a gyulladás diagnosztizálására [50]. A gyulladás egy összetett patológiai folyamat, egy veleszületett, nem specifikus védekező mechanizmus. Célja a szervezetet veszélyeztető, annak egyensúlyát felborító, sejteket károsító hatásoktól megszabadulni, mint például különböző endogén vagy exogén ágensek, nekrotikus sejtek és szövetek. A gyulladással válasz ezeknek a káros hatásoknak a megszüntetésére, illetve az egyensúlyi rendszer helyreállítására, a károk minimalizálására törekszik [51].

A sejtek a szöveti sérülések hatására hisztamin és szerotonin termelésébe kezdenek, ezek kikerülnek az extracelluláris térbe. A létrejövő mikrovaskuláris zavarok elindítanak egy kaskádrendszert, mely még több mediátor felszabadulását idézi elő, mint hisztamin, prosztaglandinok, különböző szabadgyökök, szerotonin és leukotriének. Ezek eredményezik az érfal permeabilitásának megnövekedését a plazma és a fehérjék kiáramlását a szövetek közé. Ez a gyulladás exudatív fázisa [52]. A következő, sejtés fázisban a fehérvérsejtek (neutrofil/bazofil/eozinofil granulociták, monociták, limfociták, hízósejtek és természetes ölősejtek (NK)) kemotaxis hatására vándorolnak a gyulladás helyére, majd kilépnek a keringési rendszerből és a szövetek közt fagocitózisba, valamint kemokinek és citokinek termelésébe kezdenek [50]. Ezeknek a molekuláknak a szerepe még több fehérvérsejtet odavonzani, illetve a gyulladás, az immunválasz és a gyulladáscsökkentő folyamatok szabályozása, bonyolult, különböző receptorokon mediált jelátviteli utakon keresztül [53, 54].

A sérülés során felszabaduló sejt- és szövetsérülés asszociált molekuláris mintázatok (DAMP), valamint a kórokozóból származó patogén asszociált molekuláris mintázatok (PAMP) szabadulnak fel, mint a lipopoliszacharid (LPS), a peptidoglikán és a lipoteichosav, melyeket a fehérvérsejtek a felületükön levő mintázatfelismerő receptorokkal (PRR) és Toll-like receptorokkal (TLR) ismernek fel. A receptorok a bekötő agonisták hatására aktiválódnak, és elindul egy transzmembrán jelátviteli útvonal. Extracelluláris kórokozó esetén myeloid differenciáló 88 faktor (MyD88) fehérje mediált kaskád lép működésbe, míg intracelluláris kórokozó esetén MyD88 fehérje független jelátvitel következik be, ami nukleáris faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) aktivációhoz és mitogén aktivált protein kináz (MAPK) jelátvitelhez vezet, ezáltal szabályozza a géntranszkripciót. A NF- $\kappa$ B családba tartozó transzkripciós faktorok elindítják a géntranszkripciót és translációt, ami számos sejtfolymatra és sejtés válaszra hatással van, mint például a sejtproliferáció, a sejtek differenciálódása, apoptózis, stresszre és külső kórokozókra adott válaszok. Az NF- $\kappa$ B és a MAPK ezután leukociták általi fagocitózist, dendritikus sejt (DC) aktivációt, gyulladásos citokinek és kemokinek felszabadulását, valamint a veleszületett és adaptív ( $T_{h1}$ ,  $T_{h2}$ ,  $T_{h17}$ ,  $T_{reg}$  aktivitás) immunrendszerek aktiválását idézi elő. A gyulladás lezajlásának fő regulátorai a T-limfociták. A  $T_{h1}$  felelős az intracelluláris kórokozók eliminációjáért, a  $T_{h2}$  a parazitás és allergiás reakciók lezajlásáért, a  $T_{h17}$  pedig az extracelluláris kórokozók, baktériumok és gombák eliminálásáért, végül a  $T_{reg}$  sejtek az immunválaszt mérséklék, az előbbi folyamatokat gátolják. Mindezeket a felsorolt sejtek citokinek és kemokinek termelésén keresztül érik el [50].

### 3.3.1. Citokinek

A citokinek sokféle sejttípus, mint például makrofágok, endothelsejtek, granulociták, limfociták, hízósejtek, hámsejtek és különféle kötőszöveti sejtek által termelt kis molekulatömegű fehérjék. Számos külső és belső inger kiválthatja a termelésüket [50]. Egy adott citokint több különböző sejt is termelhet, és egy fajta sejt több különböző citokint is termelhet. Hatásukat receptorokhoz kötve fejtik ki. Szabályozhatják egy adott sejtpopuláció fejlődését, progresszióját, érését és érzékenységét, valamint képesek a sejtalapú és humorális immunválasz közötti egyensúlyt befolyásolni [55, 56].

Funkciójuk alapján négy nagyobb csoportba sorolhatjuk a citokineket:

- vérképzőszervi és növekedési faktorok
- gyulladássos mediátorok, amelyek akut fázis reakciókat és a természetes immunitást aktiválják
- kemotaktikus citokinek (kemokinek)
- T-limfocita proliferációs, aktivációs és differenciációs citokinek

A citokin által aktivált receptor intracelluláris jelátviteli útvonalakat indít el. A sejtben különböző gének és azok transzkripciója aktiválódik vagy gátlódik, és ez vezet további citokinek termeléséhez, valamint sejtre specifikus biológiai válaszok kialakulásához **(1.táblázat)** [57].

1.táblázat: A bél gyulladásos folyamataiban szerepet játszó fontosabb citokinek, azokat termelő sejtek és hatásaik [50, 56, 58].

Citokin	Termelő sejtek	Hatás
IL-2	NK, T <sub>h1</sub>	Aktiválja az NK, T <sub>c</sub> és T <sub>h1</sub> sejteket, serkenti az osztódásukat, valamint elősegíti a sejtthalált a FAS-on keresztül.
IL-4	Eozinofil és bazofil granulocita, hízósejt, T <sub>h2</sub>	Aktiválja a fagocita és B-sejteket, elősegíti az izotípusváltást. Elősegíti a T <sub>h2</sub> sejtek proliferációját és adhézióját.
IL-5	T <sub>h2</sub> , hízósejt	T <sub>h2</sub> és B-sejtek aktiválása, izotípus váltás IgE irányba.
IL-6	Makrofág, hízósejt, DC, T <sub>h17</sub>	Serkenti az akut gyulladást, fokozza az őssejtek proliferációját, valamint az ellenanyag termelést, felelős a láz kialakulásáért.
IL-10	Makrofág, DC, T <sub>h2</sub> , T <sub>reg</sub>	Gyulladásgátló hatású, immunszuppresszív, elősegíti a tolerancia kialakulását és felelős annak fenntartásáért.
IL-12	Makrofág, DC	Gyulladásos citokin, fokozza a celluláris immunválaszt, indukálja a T <sub>h1</sub> és T <sub>h2</sub> sejteket.
IL-13	NK, makrofág, hízósejt, bazofil granulocita, T <sub>h2</sub>	Növeli a bél permeabilitását, fokozza a nyálka és kollagéntermelést. Indukálhatja az enterociták differenciálódását és apoptózisát. Aktiválja a B-sejteket, segíti az izotípus váltást IgE irányba.
IL-17	NK, T <sub>h17</sub>	Indukálja további gyulladásos citokinek termelődését, szabályozza a vérésejtképzést és az angiogenezist. Neutrofilek és monociták vonzása, így kórokozók eliminálása a nyálkahártyák, köztük a bél felszínéről. Számos autoimmun kórkép, köztük az IBD patogenezisében is van szerepe.
IL-21	NK, T <sub>h2</sub> , T <sub>h17</sub>	Aktiválja a B-sejteket, fokozza a plazmasejtté alakulásukat, szabályozza az angiogenezist.
IL-22	NK, T <sub>h17</sub>	Szövetregeneráció elősegítése a sejtosztódás indukálásával és az apoptózis gátlásával.
IL-23	Makrofág, DC	Gyulladásos citokin, fokozza a humorális immunválasz kialakulását, a T-sejtek aktivitását és az IL-17 termelődését.
TNF- $\alpha$	Makrofág, hízósejt, DC, eozinofil granulocita, T <sub>h1</sub>	Gyulladást indukáló központi citokin, amely elősegíti a mátrix metalloproteinázok termelődését, ezáltal az enterociták apoptózisát indukálja az alaphártya emésztésével. Összekapcsolja a veleszületett és az adaptív immunválaszokat.
TNF- $\beta$	T <sub>reg</sub>	Fokozza az érfalak permeabilitását, apoptózist indukál.
IFN- $\gamma$	NK, DC, T <sub>h1</sub>	Indukálja az enterocita apoptózist, gátolja a humorális immunválaszt, aktiválja az NK és makrofág sejteket és fokozza azok TNF- $\alpha$ termelését.

### **Az IL-1 $\beta$ mint gyulladáscitokin**

A gyulladás folyamán az IL-1 $\beta$ , az IL-1-receptorhoz kapcsolódva, már a nagyon korai szakaszban helyi, majd szisztémás válaszreakciót indukál, és lázat vált ki [59]. Bizonyított hatása van a tumor angiogenezisben és a reumatoid arthrititis kialakulásában [60, 61]. A nagy biológiai hatása és hatékonysága miatt a szervezetben a termelése szigorúan szabályozott. A citokin előformáját a kaspáz-1 aktiválja, és így lesz aktív IL-1 $\beta$ , mely a NF- $\kappa$ B aktiválása révén fokozza a sejt gyulladáscitokin termelését (**1.ábra**) [62, 63].

### **Az IFN- $\gamma$ szerepe a gyulladásban**

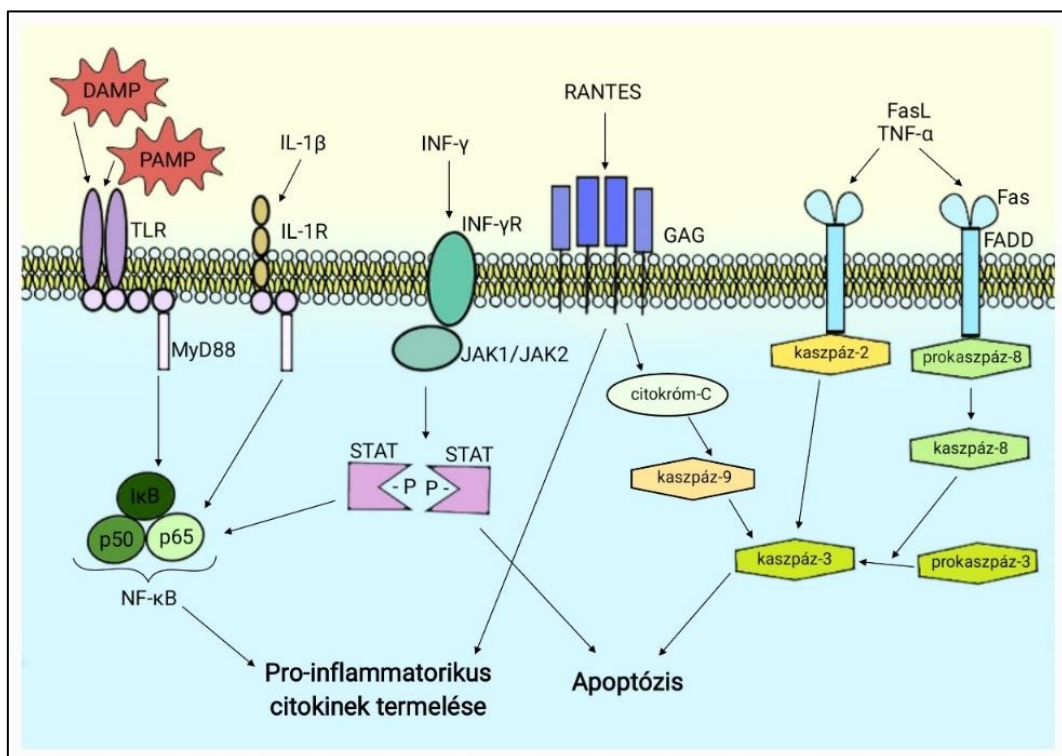
Az IFN- $\gamma$  egy erős, az immunrendszer működését sok téren befolyásoló glikoprotein citokin. A szervezet sejtjei vírusok, vírussal fertőzött sejtek és paraziták jelenléte esetén termelik [50]. Aktiválja az NK-sejteket, és makrofágok aktivitásának szabályozója, az adaptív és a veleszületett immunrendszeren keresztül. Fokozza az antigénprezentációt a T-limfociták számára, valamint képes apoptózist indukálni és gátolni is a sejtekben [64]. Az IFN- $\gamma$  receptorhoz kapcsolódva a JAK1 és JAK2, valamint STAT1 jelátviteli útvonalakon keresztül a T<sub>h1</sub> és T<sub>h17</sub> limfociták válaszát váltja ki. Számos tanulmány kimutatta, hogy az IFN- $\gamma$  képes meggátolni a sejtek daganatos proliferációját, illetve a NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonalon keresztül a sejtben a transzkripciós folyamatokat befolyásolva, hatni annak citokin termelésére és az apoptotikus gének átíródására (**1.ábra**) [50].

### **A RANTES szerepe a gyulladásban**

A Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted (RANTES) kemokin, egy klasszikus kemotaktikus citokin, melyet főképp a CD8<sup>+</sup> T-limfociták és makrofágok termelnek [65]. Ez egy gyulladást elősegítő kemokin, melynek két hatásmechanizmusa ismert. Alacsony koncentráció esetén a saját, specifikus a CCR1, CCR3, CCR4 és CCR5 G-protein kapcsolt transzmembrán receptorhoz kapcsolódva kemotaktikus hatást vált ki. Nagy koncentrációban viszont a sejtek felszínén található glükózaminoglikánokhoz kapcsolódik és apoptózist indukál vagy mitogénként működik: elősegíti a fehérvérsejtek proliferációját, illetve a gyulladáscitokinek termelését. A RANTES által közvetített apoptózis a citoplazmában felszabaduló citokróm-C által a kaspáz-9 és kaspáz-3 aktiválás útján következik be (**1.ábra**) [66–69].

### 3.3.2. A kaszpáz-3 és az apoptózis

Az apoptózis programozott sejthalál, mely akkor megy végbe, ha a sejtet valamiféle káros behatás éri, de még képes a programozott pusztulásra. A kaszpázok az IL-1 $\beta$  konvertáló enzimeszaládba tartozó, aszpartát-specifikus cisztein-proteázok. Ezek az enzimek az adott fehérjékben célzottan az aszpartát mellett hasítanak. A sejtben proenzim formájában vannak jelen, aktivációjukhoz két helyen kell hasítani őket. Szerepük a sejthalál génjeinek aktiválása. A kaszpázok mediálta sejthalálnak két fő útvonala van, az úgy nevezett halál-receptorok mediálta útvonal és a mitokondriális út. A kaszpáz-3-nak az előbbiben van szerepe [70]. A sejtmembránon található halálreceptorokhoz kötődik a TNF- $\alpha$  és a Fas-associated death domain (FADD), melynek hatására a receptor aktiválódik és katalizálja a prokaspáz-8 átalakulását kaszpáz-8-á, mely a kaszpáz-3 aktiválását végzi. A kaszpáz-8 a nem limfoid jellegű sejtekben nem tud elegendő mértékben aktiválódni, hogy aktiválja a kaszpáz-3-at. Ebben az esetben a halál-receptorokon át érkező ingerre a kaszpáz-2 aktiválja a kaszpáz-3-at. A kaszpáz-3 aktiválja a halál szubsztrátokat, melyek különböző, a sejthalált végrehajtó fehérjék, és ezáltal végbemegy az apoptózis (**1.ábra**) [71–73].



1.ábra: A citokinek hatásmechanizmusai, jelátviteli útvonalai (A szerző saját ábrája) [50, 57, 69, 71].

### 3.3.3. Az oxidatív stressz

Az oxidatív stressz a szervezet egy olyan állapota, mely akkor alakul ki, ha a reaktív gyökök (RS) felhalmozódnak. Ezek lehetnek reaktív oxigén gyökök (ROS) vagy reaktív nitrogén gyökök (RNS), melyek természetesen is képződnek a szervezetben folyó biokémiai folyamatok során. Ha fokozottan képződnek a szervezetben, és az antioxidáns védőmechanizmusok nem képesek eliminálni őket, akkor a szervezt redox egyensúlya felborul, és kialakul az oxidatív stressz [74, 75].

Fiziológiásan a fagocita sejtek, a patogének fagocitózisa után, a fagoszómában erős oxidáló hatású anyagokat, szabadgyököket alkalmazva pusztítják el a kórokozókat. A sejtek a felvett oxigént NADPH-oxidáz enzimmal hidrogén-peroxiddá alakítják, és ez lép a halogenidionokkal egy myeloperoxidáz katalizált reakcióba. Ennek folyamán HOCl keletkezik, mely jelentős antibakteriális hatással bír. Ez a folyamat a respiratory burst. A sejtek degranulációja során a keletkezett anyagok a szövetek közé jutnak, és ott károsítják a patogének alkotóelemeit. Ha a HOCl és egyéb RS túlzott mennyiségben keletkeznek, az már a szervezet saját sejtjeinek fehérjéit, lipidjeit és nukleinsavait is képes károsítani [76, 77]. A tartósan fennálló oxidatív stressz patológiás folyamattá alakul. A RS túltermelődése idült gyulladás során felelőssé tehető krónikus betegségek kártételéért. A folyamatos gyulladás a fehérjék, lipidek és nukleinsavak irreverzibilis oxidációját okozza. A szabadgyökök a sejtek transzkripciós folyamatait befolyásolva közvetítik a stresszválaszt, mediálják az immunválaszt és az apoptózist [78].

### 3.4. A *Bacillus* nemzetség

A *Bacillus* nemzetségbe tartozó baktériumok Gram-pozitív, pálcika alakú, aerob körülmények között spórát képző és csillós baktériumok (kivéve a *Bacillus anthracis*). Széles körben előfordulnak a környezetben, többek közt a talajban, levegőben, természetes vizekben valamint a növények felületén. Ezen kívül az élőlények természetes mikrobiótájának is részei, így jelen vannak az állati és emberi bőr felszínén, valamint a bélcsatornában is. A számos faj közül, amely a nemzetségbe tartozik nem jelentős a patogén fajok száma. A *Bacillus anthracis*, a lépfene kórokozója bír a legnagyobb jelentőséggel, ezen kívül csupán néhány ízeltlábú kórokozó sorolható ide. Nagyobb jelentőséggel bírnak a többségben levő szaprofita baktériumok, melyek különböző és nagyszámú antibiotikumot és AMP-t termelnek [79].

### 3.4.1. *Bacillus licheniformis*

A *Bacillus licheniformis* (*B. licheniformis*), egy savval és magas hőmérséklettel szemben ellenálló baktérium. Ezek a tulajdonságai teszik alkalmassá arra, hogy az állattenyésztésben felhasználják. Spórái szintén rendkívül ellenállóak, képesek túlélni a takarmánygyártás különböző folyamatait, de az állat szervezetébe kerülve a gastrointestinalis traktusban, megfelelő körülmények közt növekedésnek indulnak [80]. A *B. licheniformis* számos biológiailag aktív anyagot, antimikrobiális peptidet termel, melyeknek több különböző hatása ismert. Bevitelét összefüggésbe hozták a bél mikrobióta összetételének modulálásával, antimikrobiális aktivitással, növekedésserkentő, gyulladáscsökkentő és immunstimuláló hatásokkal, valamint a stressz csökkentésével. Bár önálló probiotikumként is jótékony lehet, más probiotikus mikroorganizmusokkal kombinálva, például *B. subtilis*-sel, szinergista kölcsönhatások révén jobb hatás érhető el [81].

A *B. licheniformis* növeli a bélbarrier integritását, fokozza a mucintermelést, csökkenti a bélpermeabilitását a tight junction kapcsolatok génexpressziójának fokozásával. Ezentúl a mikrobióta összetételét is szabályozza, fenntartja és képes helyreállítani a bél homeosztázisát. Ezen mechanizmusok által meggátolja, hogy fakultatív és obligát patogén mikroorganizmusok, mint a *Clostridium*, *Salmonella*, *Streptococcus* nemzetségekbe tartozó fajok, *Chlamydia psittaci* és *Escherichia coli* megtelepedjenek a bélben, ott gyulladást okozzanak, vagy bejussanak a szervezetbe [82–84]. Növekedésserkentő tulajdonsága az általa termelt enzimekből, proteáz, lipáz és amiláz, fakad, melyek segítik a tápanyagok lebomlását és felszívódását, növeli a takarmányozás hatékonyságát, a takarmány értékesülését [85]. Ezen kívül a mikrobióta sokféleségére, is hatással van, azt pozitív irányba befolyásolja, serkenti a *Lactobacillus* és a *Firmicutes* fajok szaporodását [86].

### 3.4.2. *Bacillus mojavensis*

A *B. mojavensis*, egy sivatagi talajmintából azonosított baktérium, melyről kiderült, hogy szoros rokonságban áll a *B. subtilis*-el, annak egy külön törzse. A két baktérium zsírsavösszetétele és DNS szekvenciája csupán minimális különbséget mutat, metabolikus jellemzőik megegyeznek [87]. Mivel a két törzs rendkívül hasonló, feltételezhető, hogy a *B. mojavensis* is hasonló biológiai tulajdonságokkal rendelkezik, mint a *B. subtilis*, ezért az általa termelt biológiailag aktív másodlagos metabolitok ígéretesnek tűnnek a mezőgazdaságban, élelmiszeriparban, valamint az állattenyésztésben is. A jelenlegi kutatások a *B. mojavensis* által termelt másodlagos anyagcseretermékek kutatására, azok



biokémiai tulajdonságaira irányulnak. Számos baktérium fajhoz hasonlóan a *B. mojavensis* is képes többféle lipopeptid tenzidek termelésére, mint például a surfactin, az iturin és a fengycin. Ezek olyan felületaktív anyagok, melyek képesek megbontani a foszfolipid membránok szerkezetét, ebből adódóan erős gomba-, baktérium- és vírusellenes hatással bírnak. Ezen felül képesek megelőzni a biofilmek kialakulását, vagy a már meglévő biofilmeket megbontani [88].

A *B. mojavensis*, több *Bacillus* fajhoz hasonlóan képes egy nattokináz nevű enzim termelésére. Ez egy lúgos szerin-proteáz, amelyet a hagyományos japán fermentált élelmiszerben, a nattóban fedeztek fel. *In vivo* egér kísérletekben kimutatták, hogy az enzim képes a reaktív oxigén gyökök termelődésének szabályozására és gyulladáscsökkentésre, a makrofágok TLR receptorainak expressziója csökkentése által [89, 90].

## 4. Célkitűzések

A nagyüzemi állattartásban a probiotikumok szakszerűen alkalmazva képesek megelőzni a betegségeket, befolyásolni az immunrendszer működését és javítani a termelési mutatókat. Egyes *Bacillus* fajokat gyakran használnak ilyen célokra. Hatásukat számos *in vivo* kísérlet bizonyította, de pontos hatásmechanizmusuk megismerése érdekében további vizsgálatok szükségesek.

Vizsgálatunk a Biovéd 2005 Kft. *B.licheniformis* és a *B.mojavensis* kivonatai hatásainak megismerésére irányul. Munkánk során csirke ileum eredetű explant modelleket használtunk, melyeket dextrózzal kiegészített DMEM F12 tápfolyadékban tenyésztettük, valamint kombinált kezelési csoportokat kialakítva poly I:C-t, virális nukleinsav-analógot adtunk a tápfolyadékhoz, a gyulladós folyamatok imitálására. A baktériumtörzsek potenciális gyulladáscsökkentő hatását pro-inflammatorikus citokinek, az IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  és RANTES koncentráció mérésével követtük nyomon. Emellett a sejtek metabolikus aktivitását a termelt NADH+H<sup>+</sup>, a sejtmembrán épségét az LDH aktivitás, a gyulladás által kiváltott oxidatív stressz mértékét az MDA és a gyulladás kiváltotta apoptózist a kaszpáz-3 koncentrációjának mérésével vizsgáltuk, hogy pontosabb képet kapjunk a kivonatok hatásairól esetleges későbbi élő állatokon történő alkalmazást megelőzően.

## 5. Anyag és módszertan

### 5.1. A kísérlethez használt állatok, a szövetminta izolálása, az explantok kimetszése

A kutatáshoz három hetes, hímvivarú Ross-308 brojler hibridet használtunk. Az állatok kezelése az Európai Unió állatjóléti jogszabályainak és intézményi szabályzatának megfelelően, valamint a Budapesti Állatorvostudományi Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának jóváhagyásával történt. A madarakat a ROSS Technology útmutatásai szerint tartottuk és takarmányoztuk. A kísérletet a Kormányhivatal, Élelmiszerlánc-biztonsági, Növényvédelmi és Talajvédelmi Igazgatóság engedélyezte (engedélyszám: GK-419/2020).

A madarakat CO<sub>2</sub>-os kábítást követően dekaptáltuk, elvéreztettük, majd hátfekvésben rögzítettük. Ezt követően a testüreget aszeptikusan megnyitottuk, felkerestük a Meckel-divertikulumot és attól körülbelül 10 cm-re disztálisan kimetszettünk 15 cm-t az ileális bélszakaszból. A bélszakasz felületéről kézzel távolítottuk el a zsírszövetet, majd penicillin és sztreptomycin oldattal 1%-ban kiegészített foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS + Pen-Strep) (Gibco, Waltham, MA, USA) mostuk át az eltávolított bélszakaszt mindkét irányból. A bélszakaszt hosszirányban kettévágtuk a mesenterialis oldal mentén, majd három egymást követő alkalommal átmostuk PBS + Pen-Strep oldattal. Ezt a lépést addig ismételtük, míg a szemel látható fizikai szennyeződések el nem távolítottuk, és utána hosszanti irányba négy részre vágtuk. A kimetszett szakaszokat friss, jégen tartott PBS + Pen-Strep oldatba helyeztük. Mielőtt kimetszettük az explantokat egy 96 lyukú tenyésztőedényt készítettünk elő (Greiner Bio-One Hungary Kft. Mosonmagyaróvár, Magyarország), melyet már előzetesen I. típusú kollagénnel (10 g/cm<sup>2</sup>) vontunk be. A lemezen a szükséges lyukakat 200 µl tápfolyadékkal töltöttük fel. A kísérlet során a Dulbecco's Minimal Essential Medium-F12 (DMEM F12) tápoldatát használtuk, amit kiegészítettünk 2,5% főtális borjúsavóval (FBS), 1% glutaminnal, 1% penicillin és sztreptomycin oldattal és egy adagnyi HCM TM SingleQuots™ Kit-tel (BIOCENTER Laboratóriumi Szolgáltató Kft., Szeged, Magyarország). A kit aszkorbinsavat, szarvasmarha szérumalbumint, transferrint, humán epidermális növekedési faktort (hEGF), inzulint, gentamicint és amfotericin-B-t tartalmaz.

Az egyik bélszakaszt jéggel hűtött üveglapra helyeztük nyálkahártyával felfelé, majd ezt egyenletesen kiterítettük és végül az adhézións erőt kihasználva két tárgylemez segítségével a két rövidebbik oldalánál az üveglaphoz rögzítettük. A minták kimetszése közben a kihelyezett bélszakasz felületét rendszeresen locsoltuk jéghideg PBS + Pen-Strep oldattal, hogy nedvesen tartsuk a szövetet. Az explantok kimetszését biopsziás körkésekkel (MDE GmbH, Heidelberg, Németország) végeztük. A körkést merőlegesen a bélszakaszra

nyomva, körkörös mozdulatokkal végeztük a kimetszést, majd a kinyert darabot az eszköz dugattyújával közvetlenül az előkészített, 200 µl tápoldattal feltöltött lyukakba tettük. A mintavevő körkést a 10. minta vétele után lecseréltük. Az explantokat 37 °C-on tenyésztettük 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében. Az explantok kimetszéséhez és tenyésztéséhez használt vegyszereket és eszközöket a Merck KGaA-tól (Darmstadt, Németország) szereztük be, egyéb esetben azok forrását külön feltüntettük.

## **5.2. *B. licheniformis* és *B. mojavensis* kivonatok**

A formulázott baktérium kivonatok a Biovéd 2005 Kft. pinkamindszenti laboratóriumában kerültek előállításra. Ezek elkészítése során használt *Bacillus* törzsek a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében (NCAIM) az alábbi azonosító számok alatt vannak nyilvántartva:

1. *Bacillus mojavensis* (NCAIM 497/2020 törzs)
2. *Bacillus licheniformis* (NCAIM 334/2017 törzs)

A folyamat a Biovéd 2005. Kft. formulázási eljárása szerint zajlik, így azt töredékes formában ismertetjük. A vállalat egy magas telepképző egység számú baktérium szuszpenzióból készített szárított porból végzi a kivonat előállítását, mely por a felszaporított baktérium sejteket, egy szilikát tartalmú hordozóanyagot és a fermentlé szárazanyag tartalmát is magába foglalja. A port feloldva 70%-os etanol oldatban, a nyert szuszpenziót keverésnek és rázatásnak teszik ki. A nyert kivonatot 2 µm-es pórusnagyságú szűrőn szűrik át, majd a nyert oldatból centrifugálással ülepítik ki a visszamaradt baktérium sejteket. A végső oldatot dextróz-monohidrátra szárítják rá, majd a kapott anyagot megőrlik, így jutnak a formulázott, a baktérium kivonatot tartalmazó végső termékhez. Erre a dolgozatban az egyszerűség kedvéért kivonat néven hivatkozunk.

## **5.3. Az explantok tenyésztése és kezelése**

Az 1,5 mm átmérőjű explantokat 96 lyukú lemezen, 200 µl tápoldatba helyeztük. A kísérlet során egy 0,6 m/m % és 3 m/m % dextrózzal kezelt kontroll csoportot (C2, C3) hoztunk létre, valamint kialakítottunk egy-egy 0,6 m/m % és 3 m/m % dextrózos *B. licheniformis* (LIC2, LIC3) kivonattal, illetve 0,6 m/m % és 3 m/m % dextrózos *B. mojavensis* (MOJ2, MOJ3) kivonattal kezelt csoportot. A többi csoportnál gyulladáskeltő kezelést is használtunk, 50 µg/ml poly I:C-vel kezeltük az explantokat. Így jöttek létre a 0,6 m/m % és 3 m/m % dextrózzal és poly I:C-vel kezelt gyulladáscsökkentő kontroll csoportok (PC2, PC3), valamint a 0,6 m/m % és 3 m/m % dextrózos *B. licheniformis* kivonat és

poly I:C kezelt (PLIC2, PLIC3), és 0,6 m/m % és 3 m/m % dextrózos *B. mojavensis* kivonat és poly I:C kezelt (PMOJ2, PMOJ3) kombinált csoportok. 12 óra után a tápfolyadékot eltávolítottuk és mintaként -80°C-on tároltuk a további mérések elvégzéséig.

Az egyes dextrózos kivonatokkal végzett kezelések kontrolljaként vegytiszta dextróz szolgált, hogy a dextróz kiváltotta biológiai hatást elkülönítsük a baktérium anyagcseretermékek és alkotók kiváltotta hatástól. A LIC2, MOJ2, PLIC2, PMOJ2 kezeléseknél a tápfolyadék 0,6 m/m %-ban tartalmaz dextrózos kivonatot, kontrollként a C2 dextrózos csoport szolgál, mely 0,6 m/m % dextrózt tartalmaz. A LIC3, MOJ3, PLIC3, PMOJ3 kezeléseknél a tápfolyadék 3 m/m %-ban tartalmaz dextrózos kivonatot, kontrollként a C3 dextrózos csoport szolgál, mely 3 m/m % dextrózt tartalmaz. Az egyszerűség kedvéért a továbbiakban m/m % helyett az oldatok koncentrációját % jellel jelöljük.

## 5.4. Mérések

### Metabolikus aktivitás mérése

Az explantok metabolikus aktivitását CCK-8 teszttel mértük (Cell counting Kit-8, Dojindo Molecular Technologies, Rockville, MD, USA). Az explantokra 10:1 arányban friss szintelen DMEM F12 tápoldatot pipettáztunk CCK-8 reagenssel kiegészítve. A reakció alapja, hogy a képződött NAD(P)H+H<sup>+</sup> a CCK-8 reagensben található WST-8-at (Water Soluble Tetrasolium Salt) formazánná redukálja, és ez narnacssárga színreakciót hoz létre. A celluláris katabolikus folyamatok intenzitására, azaz metabolikus aktivitására tudunk következtetni, mivel a képződött formazán mennyisége egyenesen arányos a termelődő NAD(P)H+H<sup>+</sup> mennyiségével, tehát a színintenzitás is ennek megfelelő. Egy óra tenyésztési körülmények közt való inkubálás után egy üres 96 lyukú lemezre 100 µl-t pipettáztunk ki a tápoldatból, majd a gyártó utasításainak megfelelően 340 nm-en megmértük az abszorbanciát, Multiskan GO 3.2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok) készüléket használva.

### Extracelluláris laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitás mérése

Az LDH mérés adataiból tudunk következtetni a sejtmembrán állapotára. Ha a membrán károsodik, akkor az intracelluláris enzimek felszabadulnak, és a tápoldatba kerülnek. Ennek vizsgálatára a tápoldatmintákból az extracelluláris LDH enzimaktivitás fotometriás mérését végeztük el (Diagnosticum Kft., Budapest, Magyarország). 10 µl tápoldat mintához 200 µl LDH reagens oldatot adtunk (56 mM foszfát puffer, pH 7,5; 1,6 mM piruvát és 240 µM NADH+H<sup>+</sup>), majd a kapott elegy abszorbanciáját egymás után

hat alkalommal mértük, 340 nm-en, egy perces időközökkel, Multiskan GO 3.2 készülékkel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

### **Malondialdehid-koncentráció (MDA) meghatározása**

A sejtlizátum hígítását és centrifugálását követően mértük az intracelluláris MDA koncentrációt. Ez a módszer a lipidperoxidáció mértékének meghatározására szolgál, kolometriás teszttel végezhető el. 300 µl tiobarbitursavat kevertünk a lizátum mintáink felülúszójának 100 µl-éhez, és a gyártó utasításának megfelelően 95°C-on 1 óráig inkubáltuk, majd 10 percig jégen hűtöttük. Ezt követően 532 nm-en mértük a minta abszorbanciáját Multiskan GO 3.2 készülékkel.

### **Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) koncentráció meghatározása**

Az interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) koncentrációját csirkespecifikus szendvics ELISA kit felhasználásával (MyBioSource, San Diego, CA, USA) határoztuk meg a gyártó előírásainak megfelelően. Az ELISA próba elveinek megfelelően, a lemez felszínén jelen lévő ellenanyaghoz kötődött a vizsgált interleukin. A reakció specifitása érdekében egy biotinnal konjugált másodlagos ellenanyagot vittünk fel a lemezre, majd rámértük az avidinnel kapcsolt konjugátumot. Ezt követően a hozzáadott színreagens színes terméket ad. A szín intenzitása 450 nm-en fotometriásan mérhető. A mérést Multiskan GO 3.2 készülékkel végeztük.

### **Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) és RANTES koncentráció meghatározás**

Az interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) és a RANTES koncentrációjának meghatározását Dr. Kemény Ágnes végezte a Pécsi Tudományegyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetében Luminex xMAP módszerrel. Az egyes fehérjék koncentrációjának mérésére Milliplex Chicken Cytokin/Chemokin panelt (Kat.szám: GCYT1–16 K, Merck KGaA, Darmstadt, Németország) használt, betartva a gyártó utasításait. A fluoreszcenciát Luminex MAGPIX® műszerrel (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) mérte. A nyers adatok feldolgozása a Luminex xPonent 4.2 szoftver segítségével történt.

A 0,6% és 3% dextrózos *B. mojavensis* (MOJ2, MOJ3) kivonattal kezelt csoport, valamint a 0,6% és 3% dextrózos *B. mojavensis* kivonat és poly I:C kezelt (PMOJ2, PMOJ3) kombinált csoport mintáinak vizsgálatát az IFN- $\gamma$  és RANTES koncentráció meghatározása során nem ítéltük szükségesnek, mivel az általunk mért paraméterek esetében nem mutattak gyulladáscsökkentő, antioxidáns, illetve antiapoptotikus hatást.

### **A kaszpáz-3 koncentráció meghatározása**

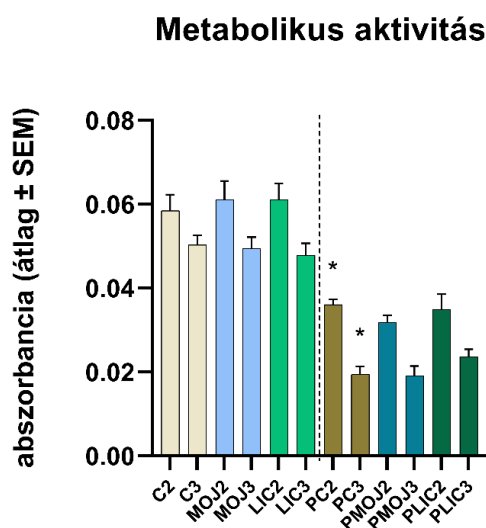
Az apoptózis mértékének vizsgálatához az aktív kaszpáz-3 koncentrációját a sejtlizátum mintákból határoztuk meg. Csirkespecifikus kaszpáz-3 ELISA kitet használtunk (MyBioSource, San Diego, CA, USA) a gyártó utasításai szerint. Az abszorbanciát 450 nm-en mértük, Multiskan GO 3.2 olvasóval.

### **Statisztika**

A statisztikai elemzést az R core Team program 4.0.4-es verziójával (R Core Team, 2020) végeztük. Az LDH aktivitást hat egymást követő időpontban végzett abszorbancia mérésével számítottuk ki, úgy, hogy átlagoltuk az egymást követő időpontok közötti különbséget. Az eredményeket oszlopdiaagrammon ábráztuk a GraphPad Prism szoftver alkalmazásával, átlagértékként és az átlag standard hibájaként (SEM). A kapott adatok eloszlását Q-Q plottal vizsgáltuk. A *B. licheniformis* (LIC2, LIC3) és *B. mojavensis* (MOJ2, MOJ3) kivonattal kezelt csoportokat a csak dextrózzal kezelt csoportok (C2, C3) átlagához hasonlítottuk, míg a poly I:C kezelt csoportok (PC2, PC3) szolgáltak a poly I:C-vel és *B. licheniformis* kivonattal (PLIC2, PLIC3), valamint a poly I:C-vel és *B. mojavensis* kivonattal (PMOJ2, PMOJ3) kezelt kombinált kezelési csoportok kontrolljaként. A csoportok átlagainak összehasonlítására Wilcoxon-féle rangpróbát alkalmaztunk. A középértékek közötti eltérést szignifikánsnak tekintettük abban az esetben, ha a p-érték 0,05, vagy kisebb volt.

## 6. Eredmények

50 µg/ml koncentrációban a poly I:C-t a tápfolyadékhoz adva az explantok metabolikus aktivitása szignifikánsan ( $p=0,012$ ) csökkent 0,6% és 3% dextróz kiegészítés esetében is. A *Bacillus* kezelések egyik esetben sem befolyásolták szignifikánsan a metabolikus aktivitást (2.ábra).

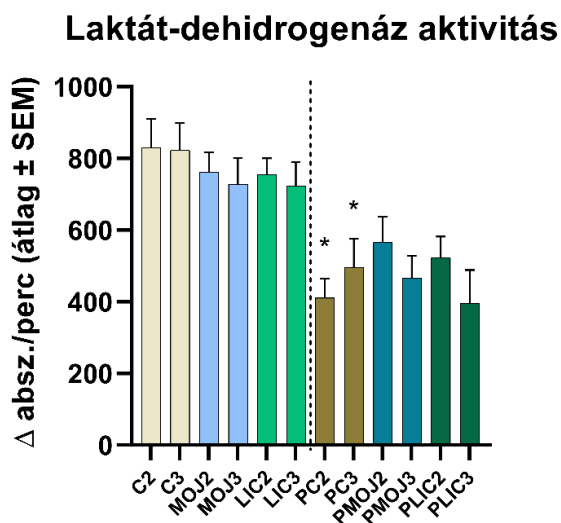


2.ábra: A metabolikus aktivitás vizsgálata CCK-8 tesztel. C2=kontroll 0,6% dextróz, C3=kontroll 3% dextróz, MOJ2= *B. mojavensis* kivonat 0,6%, MOJ3= *B. mojavensis* 3%, LIC2= *B. licheniformis* 0,6%, LIC3= *B. licheniformis* 3%, PC2= poly I:C (50 µg/ml) és dextróz 0,6%, PC3= poly I:C (50 µg/ml) és dextróz 3%, PMOJ2= poly I:C (50 µg/ml) és *B. mojavensis* 0,6%, PMOJ3= poly I:C (50 µg/ml) és *B. mojavensis* 3%, PLIC2= poly I:C (50 µg/ml) és *B. licheniformis* 0,6%, PLIC3= poly I:C (50 µg/ml) és *B. licheniformis* 3%.

Átlag ± standard hiba (SEM), \* $p<0,05$

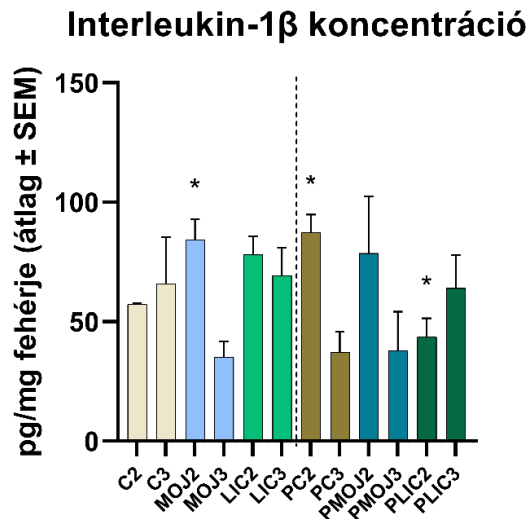


A sejtmembrán károsodása során felszabaduló extracelluláris laktát-dehidrogenáz aktivitását az 50 µg/ml koncentrációban alkalmazott poly I:C kezelés 0,6% (p=0,016) és 3% (p=0,032) dextróz mellett egyaránt szignifikánsan csökkentette. A *Bacillus* kezelések esetében nem figyeltünk meg szignifikáns változást (3.ábra).



3.ábra: Az extracelluláris laktát-dehidrogenáz aktivitásának vizsgálata kinetikus fotometriás teszttel. C2=kontroll 0,6% dextróz, C3=kontroll 3% dextróz, MOJ2= *B. mojavensis* kivonat 0,6%, MOJ3= *B. mojavensis* 3%, LIC2= *B. licheniformis* 0,6%, LIC3= *B. licheniformis* 3%, PC2= poly I:C (50 µg/ml) és dextróz 0,6%, PC3= poly I:C (50 µg/ml) és dextróz 3%, PMOJ2= poly I:C (50 µg/ml) és *B. mojavensis* 0,6%, PMOJ3= poly I:C (50 µg/ml) és *B. mojavensis* 3%, PLIC2= poly I:C (50 µg/ml) és *B. licheniformis* 0,6%, PLIC3= poly I:C (50 µg/ml) és *B. licheniformis* 3%. Átlag ± standard hiba (SEM), \*p<0,05

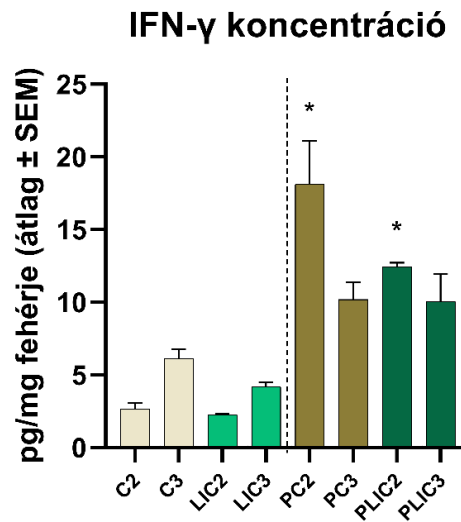
Az IL-1 $\beta$  gyulladáscsökkentő citokin koncentrációját 0,6% dextróz kiegészítés mellett a *B. mojavensis* kivonat szignifikánsan emelte ( $p=0,032$ ), míg 50  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációban a tápfolyadékhoz adott poly I:C is emelő hatással bírt ( $p=0,029$ ). A poly I:C-vel kezelt kontrollhoz képest a poly I:C-vel kombinált kezelésben alkalmazott 0,6%-os *B. licheniformis* kivonat az IL-1 $\beta$  koncentrációját szignifikánsan csökkentette ( $p=0,016$ ) (4.ábra).



4.ábra: Az IL-1 $\beta$  koncentráció mérése szendvics ELISA módszerrel. C2=kontroll 0,6% dextróz, C3=kontroll 3% dextróz, MOJ2= *B. mojavensis* kivonat 0,6%, MOJ3= *B. mojavensis* 3%, LIC2= *B. licheniformis* 0,6%, LIC3= *B. licheniformis* 3%, PC2= poly I:C (50  $\mu\text{g/ml}$ ) és dextróz 0,6%, PC3= poly I:C (50  $\mu\text{g/ml}$ ) és dextróz 3%, PMOJ2= poly I:C (50  $\mu\text{g/ml}$ ) és *B. mojavensis* 0,6%, PMOJ3= poly I:C (50  $\mu\text{g/ml}$ ) és *B. mojavensis* 3%, PLIC2= poly I:C (50  $\mu\text{g/ml}$ ) és *B. licheniformis* 0,6%, PLIC3= poly I:C (50  $\mu\text{g/ml}$ ) és *B. licheniformis* 3%.

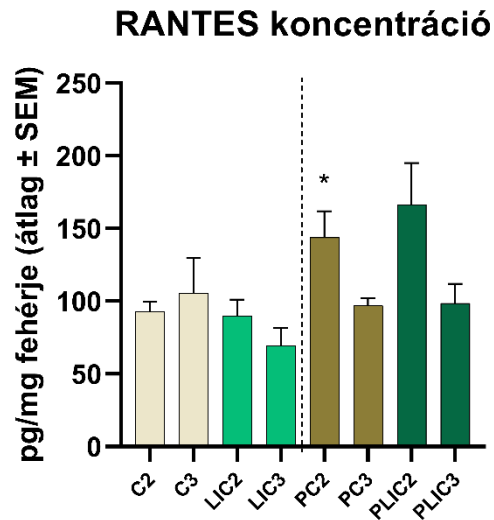
Átlag  $\pm$  standard hiba (SEM), \* $p < 0,05$

Az IFN- $\gamma$  koncentrációjában szignifikáns növekedés ( $p= 0,016$ ) volt megfigyelhető 0,6% dextróz kiegészítés mellett alkalmazott poly I:C kezelés esetében. Ezen gyulladásos kontrollhoz viszonyítva a 0,6%-ban alkalmazott *B. licheniformis* kivonat szignifikáns csökkenést ( $p= 0,032$ ) okozott a tápfolyadék IFN- $\gamma$  koncentrációjában (5.ábra).



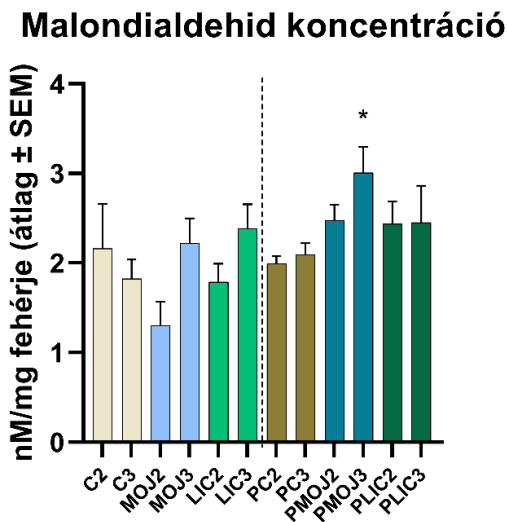
5.ábra: Az IFN- $\gamma$  koncentráció vizsgálata Luminex módszerrel. C2=kontroll 0,6% dextróz, C3=kontroll 3% dextróz, LIC2= *B. licheniformis* 0,6%, LIC3= *B. licheniformis* 3%, PC2= poly I:C (50  $\mu\text{g/ml}$ ) és dextróz 0,6%, PC3= poly I:C (50  $\mu\text{g/ml}$ ) és dextróz 3%, PLIC2= poly I:C (50  $\mu\text{g/ml}$ ) és *B. licheniformis* 0,6%, PLIC3= poly I:C (50  $\mu\text{g/ml}$ ) és *B. licheniformis* 3%. Átlag  $\pm$  standard hiba (SEM), \* $p<0,05$

A tápfolyadék RANTES koncentrációja szignifikáns növekedést ( $p=0,029$ ) mutatott a poly I:C és 0,6% dextrózkiegészítés mellett tenyésztett explantok esetében. A többi kezelés esetében nem volt szignifikáns változás (6.ábra).



6.ábra: Az RANTES koncentráció vizsgálata Luminex módszerrel. C2=kontroll 0,6% dextróz, C3=kontroll 3% dextróz, LIC2= *B. licheniformis* 0,6%, LIC3= *B. licheniformis* 3%, PC2= poly I:C (50  $\mu$ g/ml) és dextróz 0,6%, PC3= poly I:C (50  $\mu$ g/ml) és dextróz 3%, PLIC2= poly I:C (50  $\mu$ g/ml) és *B. licheniformis* 0,6%, PLIC3= poly I:C (50  $\mu$ g/ml) és *B. licheniformis* 3%. Átlag  $\pm$  standard hiba (SEM), \* $p<0,05$

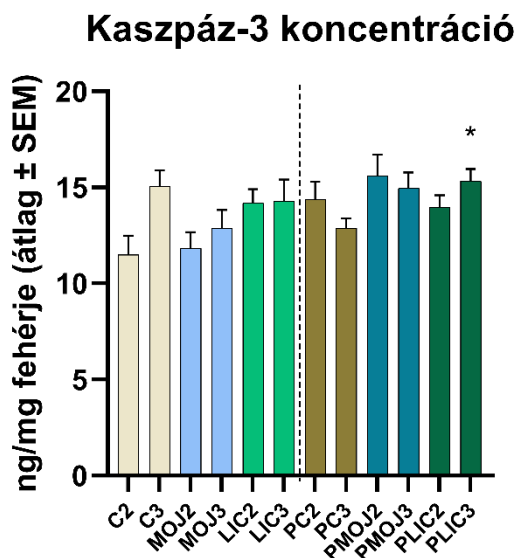
Az MDA koncentrációjában a 3% dextróz és poly I:C-vel kiegészített tápfolyadékkal kezelt kontroll csoporthoz képest, a poly I:C-vel kombinált kezelésben alkalmazott 3%-os *B. mojavensis* kivonat szignifikáns emelkedést ( $p=0,016$ ) eredményezett (7.ábra).



7.ábra: Malondialdehid koncentráció vizsgálata kolometriás teszttel. C2=kontroll 0,6% dextróz, C3=kontroll 3% dextróz, MOJ2= *B. mojavensis* kivonat 0,6%, MOJ3= *B. mojavensis* 3%, LIC2= *B. licheniformis* 0,6%, LIC3= *B. licheniformis* 3%, PC2= poly I:C (50 µg/ml) és dextróz 0,6%, PC3= poly I:C (50 µg/ml) és dextróz 3%, PMOJ2= poly I:C (50 µg/ml) és *B. mojavensis* 0,6%, PMOJ3= poly I:C (50 µg/ml) és *B. mojavensis* 3%, PLIC2= poly I:C (50 µg/ml) és *B. licheniformis* 0,6%, PLIC3= poly I:C (50 µg/ml) és *B. licheniformis* 3%.

Átlag ± standard hiba (SEM), \* $p<0,05$

A poly I:C-vel kezelt gyulladási kontrollcsoporthoz képest, a *B. licheniformis* 3%-ban alkalmazva szignifikánsan emelte ( $p=0,032$ ) az apoptotikus kaszpáz-3 koncentrációját a sejtekben (8.ábra).



8.ábra: A kaszpáz-3 intracelluláris enzim koncentrációjának vizsgálata ELISA módszerrel. C2=kontroll 0,6% dextróz, C3=kontroll 3% dextróz, MOJ2= *B. mojavensis* kivonat 0,6%, MOJ3= *B. mojavensis* 3%, LIC2= *B. licheniformis* 0,6%, LIC3= *B. licheniformis* 3%, PC2= poly I:C (50  $\mu\text{g/ml}$ ) és dextróz 0,6%, PC3= poly I:C (50  $\mu\text{g/ml}$ ) és dextróz 3%, PMOJ2= poly I:C (50  $\mu\text{g/ml}$ ) és *B. mojavensis* 0,6%, PMOJ3= poly I:C (50  $\mu\text{g/ml}$ ) és *B. mojavensis* 3%, PLIC2= poly I:C (50  $\mu\text{g/ml}$ ) és *B. licheniformis* 0,6%, PLIC3= poly I:C (50  $\mu\text{g/ml}$ ) és *B. licheniformis* 3%. Átlag  $\pm$  standard hiba (SEM), \* $p<0,05$

## 7. Megbeszélés

Munkánk során csirke ileum eredetű explantokon a poliinozin-policitidilsav (poly I:C, virális nukleinsav-analóg) alkalmazásával kiváltott gyulladásos és oxidatív folyamatokat vizsgáltuk, illetve azt, hogy e folyamatokra milyen hatása van a *B. licheniformis* és a *B. mojavensis* kivonatainak. Az explant modellek lehetővé teszik a célszerv és -szövet fiziológiás és kóros állapotainak vizsgálatát. Előnyük abban rejlik, hogy míg a különféle sejtenyészetek csupán egyfajta sejtből állnak, addig az explantokban a bélben jelen lévő sejtek mind fellelhetők [23]. Az Élettani és Biokémiai Tanszék Biokémiai Osztálya előzetes kísérletek során vizsgálta az 1 és 2 mm átmérőjű bélhám explantok tenyésztetőségét és eltarthatóságát. A vizsgálat során az explantok metabolikus aktivitását, laktát-dehidrogenáz aktivitását mérték, illetve hematoxilin-eozin és pancitokeratin immunhisztokémiai festést alkalmazva a szövetek épségét szövettannal is vizsgálták. Eredményeik szerint a kisebb méretű explantok tovább eltarthatók, ám a nagyobb explantok kinyerése és kezelése egyszerűbb. Így 1,5 mm átmérőjű explantokat alkalmazva vizsgálták 12 óra tenyésztés mellett a Toll-like receptor antagonisták hatását. 50 µg/ml koncentrációban a poly I:C megfelelőnek bizonyult a gyulladásos válasz kiváltására, így az ismertetett vizsgálatban is, ami a dolgozat tárgyát képezi ezt használtuk a gyulladás kiváltására [91]. A sejtek a virális nukleinsav-analógot a TLR receptorok, mint PAMP molekulák ismerik fel. A receptorok aktiválják a MyD88-független jelátviteli útvonalat, majd az NF-κB és MAPK faktorokat, melyek végül gyulladásos citokinek termeléséhez vezetnek a génexpresszió befolyásolásán keresztül [50].

Számos kutatás foglalkozik a *Bacillus* törzsek, mint probiotikumok gyulladáscsökkentő és antioxidáns hatásaival. Munkánk során a *B. licheniformis* és a *B. mojavensis* törzseinek hatását vizsgáltuk. Mivel a *B. mojavensis* a *B. subtilis* egy törzse, fenotípusos változata, biokémiai tulajdonságaik megegyeznek. A két baktérium hasonló tulajdonságokkal rendelkezik, és a *B. subtilis* probiotikus hatását már több kutatás is alátámasztotta, ezért megalapozott a feltételezés, hogy a *B. mojavensis* is jótékony hatású lehet [87].

Xu és munkatársai kimutatták, hogy a *B. licheniformis* és *B. subtilis* brojlercsirkéknél mint táplálékkiegészítő, *in vivo* kísérletekben csökkenti a szérum IL-6 és IL-1β proinflammatorikus citokinek koncentrációját és növeli a gyulladáscsökkentő hatású IL-10 koncentrációját. Ugyanezen kísérletben redox állapot vizsgálata során az MDA koncentráció jelentős csökkenését tapasztalták. A probiotikummal kezelt csoportok növekedési erélye szignifikánsan nagyobb volt a kezeletlen csoportokéhoz képest [92]. Az oxidatív stressz az

antioxidánsok és a szabadgyökök egyensúlyának zavarára utal, amely ROS felhalmozódáshoz, ezáltal a szövetek és fehérjék károsodásához vezet. A baromfiban az oxidatív stresszt számos ok kiválthatja, mint például a hőstressz, rossz takarmányminőség vagy fertőzés. Zhao és munkatársai kimutatták, hogy a *B. licheniformis* kiegészített takarmányt fogyasztó állatok esetében az ileumban alacsonyabb volt az MDA koncentrációja, illetve az antioxidáns enzimek, például szuperoxid dizmutáz és a glutation-peroxidáz aktivitása emelkedett [93]. A *B. licheniformis*, probiotikumként alkalmazva pozitív hatással van a madarak májában, vérében és bélrendszerében az antioxidáns kapacitásra, képes megkötni a szervezetben keletkezett szabadgyököket, így csökkentve az oxidatív stresszt. Előnyös a brojlerek számára, védelmet nyújt a hőstressz ellen és megelőzi a nekrotikus bélgyulladást [93, 94]. Han és munkatársai *B. licheniformis* hatását vizsgálták, mint potenciális hozamfokozóét, az antibiotikumok helyett. *In vivo* kísérletükben, brojlercsirkék takarmánykiegészítőként kapták a *B. licheniformis*, két különböző,  $1.0 \times 10^8$  CFU/kg és  $1.0 \times 10^9$  CFU/kg koncentrációban. Kutatásuk Xu és munkatársainak eredményeihez hasonlóan az IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  citokinek koncentrációjának szignifikáns csökkenését, valamint IL-10 citokin koncentrációjának emelkedését írták le. Ezen kívül a TLR-4 receptor és az NF- $\kappa$ B mediált transzkipciós utak aktivitásának csökkenéséről is beszámoltak. A *B. licheniformis* hatását az alkalmazott koncentrációtól függetlennek találták [95].

A szakirodalom főként a *B. mojavensis* növénytermesztési alkalmazásairól számol be. Etyemez Büyükdeveci és munkatársai írták le a *B. mojavensis* hatásait a nílusi tilápia halfaj esetében. Vizsgálataik során a probiotikum hatását vizsgálták a halak bélmorfológiájára és immunrendszerére. Eredményeik szerint a *B. mojavensis* a mikrobolyhok hosszának és sűrűségének növekedését, valamint az IL-10 gyulladáscsökkentő citokin expressziójának növekedését és az IL-1 $\beta$  csökkenését eredményezte [96]. Ezen kívül a mikroba által termelt nattokináz enzim antioxidáns hatásáról számolnak be a szakirodalomban. Az enzim képes a TLR receptorok expresszióját gátolja a makrofágokban, ezáltal gátolva a MAPK és a NF- $\kappa$ B aktiválását, így csökkentve a sejt ROS termelését [90]. A rendelkezésre álló szakirodalmi adat nem elégséges, azonban a meglévő tudományos ismeretek alátámasztják a Bacillus faj vizsgálatának létjogosultságát.

Jelen vizsgálataink bizonyítják a *B. licheniformis* pro-inflammatorikus IL-1 $\beta$  és IFN- $\gamma$  koncentrációjának csökkentésében tettenérhető, gyulladáscsökkentő hatását, viszont nagyobb koncentrációban alkalmazva a sejteket károsító gyulladással járó folyamatok során a kaspáz-3 intracelluláris enzim szintjének emelése révén képes elősegíteni a programozott



sejthalált. Ez az eredmény felfogható pozitív hatásként, ha figyelembe vesszük, hogy a sejtekben kevésbé szabályozott, szöveti szintén károsabb sejthalál folyamatok is bekövetkezhetnek. Ilyen például a piroptózis, melyet a poly I:C képes kiváltani. Ez egy típusa a programozott sejthalálnak, amit az NLR receptorcsalád pirin-domént kötő 3-as (NLRP3), intracelluláris mintázatfelismerő receptor és a kaszpáz-1 enzim aktivál. Ennek során a sejthalált a transzcelluláris pórusképződés okozza [97].

A *B. mojavensis* a nílusi tilápiában leírt gyulladáscsökkentő hatását nem tudtuk megerősíteni a csirke *ex vivo* modellünkön. Az antioxidáns tulajdonságokra irányuló vizsgálataink során szintén nem kaptunk szignifikáns eredményt a *B. licheniformis* kivonatait alkalmazva, ám a *B. mojavensis* 3% koncentrációban prooxidáns hatásúnak bizonyult.

Eredményeink alapján a *B. licheniformis* takarmánykiegészítő és probiotikumként való alkalmazása megalapozott lehet a brojler tenyésztésben, ám a gyulladást szabályzó és antioxidáns mechanizmusok további tanulmányozásra szorulnak, hogy az alkalmazott törzs hatékonysága igazolást nyerjen.

## 8. Összefoglalás

A brojlernevelés során a cél minél rövidebb idő alatt előállítani a piaci igényeknek megfelelő terméket. A rendkívül intenzív tartás megviseli az állatok szervezetét, az őket érő stressz összetett oktanú betegségek kialakulására hajlamosít. Mióta az Európai Unióban tilos az antibiotikumok alkalmazása profilaktikus és hozamfokozó célból a gazdasági haszonállatok esetében, több figyelmet kapnak az alternatív, természetes hozamfokozók. Ilyenek például a probiotikumok. Ezek az anyagok befolyásolják a mikrobióta összetételét, hatással vannak az immunrendszer patogénekre adott válaszára, valamint a gyulladási folyamatok lefolyására. Pontos hatásmechanizmusuk azonban sok esetben nem tisztázott. Vizsgálatunk során a *Bacillus licheniformis* és a *Bacillus mojavensis* egy-egy törzséből készült kivonatok (Biovéd 2005 Kft.) hatását vizsgáltuk csirke eredetű bél explantokon.

A kísérletben 3 hetes csirke ileumából nyert explantokat használtunk. Ezeket kontrollként 0,6 és 3% dextrózzal, valamint 0,6% és 3%-ban dextrózra szárított *Bacillus licheniformis* és *Bacillus mojavensis* kivonattal kiegészített DMEM F12 tápfolyadékban tenyésztettük 12 órán keresztül. Kombinált kezelési csoportokat alakítottunk ki az előbbi kezelésekk mellett 50 µg/ml poliinozin-policitidilsavval (poly I:C, virális nukleinsav-analóg) kezelve az explantokat. A kísérlet végeztével a sejtek metabolikus aktivitását CCK-8 teszttel vizsgáltuk. A tápfolyadékból mértük a laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitást, az interleukin-1β (IL-1β), interferon-γ (IFN-γ) és Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted (RANTES) citokinek koncentrációját, míg a sejtek lizátumából a malondialdehid (MDA) és a kaszpáz-3 koncentrációt határoztunk meg. A poly I:C szignifikánsan csökkentette az explantok metabolikus aktivitását és az LDH aktivitást a tápfolyadékban, azonban a *Bacillus* kezelésekk ezekre a paraméterekre nem volt hatása. A poly I:C-vel kezelt gyulladási csoporthoz képest a *Bacillus licheniformis* 0,6%-ban alkalmazva szignifikánsan csökkentette az IFN-γ és IL-1β citokinek szintjét, 3%-ban alkalmazva pedig szignifikánsan emelte a kaszpáz-3 koncentrációját a sejtekben. A poly I:C-vel kombinált *Bacillus mojavensis* 3%-os kezelés szignifikánsan emelte a MDA koncentrációját.

Az eredmények alapján az alkalmazott *Bacillus licheniformis* kivonat gyulladáscsökkentő hatású lehet, illetve sejtkárosító gyulladási folyamat során képes lehet elősegíteni a programozott sejthalált, míg a *Bacillus mojavensis* 3% koncentrációban prooxidánsnak bizonyult. A vizsgált *Bacillus* fajok, illetve törzsek hatásának pontosabb megértése érdekében további vizsgálatok elvégzése szükséges.

## 9. Summary

During broiler breeding, the main goal is to produce products that meet market demands in the shortest possible time. The extremely intensive farming practices can stress the animals, and predispose them to multifactorial diseases. Since the use of antibiotics for prophylactic and growth-promoting purposes in farm animals has been banned in the European Union, more attention has been given to alternative, natural growth promoters, including probiotics. These substances influence the composition of the microbiota and affect the response of the immune system to pathogens and inflammation. The exact mechanism of action of probiotics is not yet fully understood. The aim of our study was to examine the effects of extracts originating from two strains of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus mojavensis* (Biovéd 2005 Kft.) on chicken ileal explants isolated from 3-week-old broiler chicken.

The explants were cultured for 12 hours in DMEM F12 medium supplemented with 0.6% and 3% *Bacillus licheniformis* and *Bacillus mojavensis* extracts formulated with dextrose and dextrose control groups, respectively. To induce an inflammatory response, the cultures were treated with 50 µg/ml of polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C, viral nucleic acid analogue) combined with the previous treatments. At the end of the experiment, the metabolic activity of the cells was examined by CCK-8 assay. In addition, lactate dehydrogenase (LDH) activity, interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted (RANTES) cytokine concentrations were measured from the medium. Malondialdehyde (MDA) and caspase-3 concentrations were determined from cell lysates. The poly I:C treatment significantly reduced the metabolic activity of the explants and the LDH activity in the medium. *Bacillus* treatments had no effect on these parameters. Compared to the poly I:C-treated inflammatory group, *Bacillus licheniformis* at a concentration of 0.6% significantly reduced the levels of IFN- $\gamma$  and IL-1 $\beta$  cytokines and at a concentration of 3% significantly increased caspase-3 concentration of the cells. The combined treatment of poly I:C with *Bacillus mojavensis* at a concentration of 3% significantly increased the MDA level.

Based on the results, the applied *Bacillus licheniformis* extract had anti-inflammatory effect and could promote apoptosis of the cells under inflammation related cell damage. In contrast, *Bacillus mojavensis* at a concentration of 3% showed a prooxidant effect. Further studies are needed to gain a more precise understanding of the effects of the investigated *Bacillus* species and strains.

## 10. Irodalomjegyzék

1. Farrell D The role of poultry in human nutrition
2. Miles DM, Branton SL, Lott BD (2004) Atmospheric ammonia is detrimental to the performance of modern commercial broilers. *Poult Sci* 83:1650–1654
3. FAO [Food and Agriculture Organization of the United Nations] (2014) *Meat & Meat Products*
4. Pope MJ, Cherry TE (2000) An evaluation of the presence of pathogens on broilers raised on poultry litter treatment-treated litter. *Poultry Science* 79:1351–1355
5. Izat AL, Tidwell NM, Thomas RA, Reiber MA, Adams MH, Colberg M, Waldroup PW (1990) Effects of a Buffered Propionic Acid in Diets on the Performance of Broiler Chickens and on Microflora of the Intestine and Carcass. *Poultry Science* 69:818–826
6. DE Boer E, Hahné M (1990) Cross-contamination with *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* spp. from Raw Chicken Products During Food Preparation. *J Food Prot* 53:1067–1068
7. Jones FT, Axtell RC, Rives DV, Scheideler SE, Tarver FR, Walker RL, Wineland MJ (1991) A Survey of *Campylobacter jejuni* Contamination in Modern Broiler Production and Processing Systems. *J Food Prot* 54:259–262
8. Kridtayopas C, Rakangtong C, Bunchasak C, Loongyai W (2019) Effect of prebiotic and synbiotic supplementation in diet on growth performance, small intestinal morphology, stress, and bacterial population under high stocking density condition of broiler chickens. *Poultry Science* 98:4595–4605
9. Zhang R, Shi X, Chen Y, Liu J, Wu Y, Xu Y (2022) Multi-Omics Revealed the Protective Effects of Rhamnolipids in Lipopolysaccharide Challenged Broilers. *Front Immunol* 13:824664
10. Truszczyński M, Pejsak Z (2006) Wpływ stosowania u zwierząt antybiotyków na lekooporność bakterii chorobotwórczych dla człowieka
11. Biernasiak J, Sliżewska K, Libudzisz Z (2010) Negatywne skutki stosowania antybiotyków. *Postępy Nauk Rolniczych* 62:
12. Mehdi Y, Létourneau-Montminy M-P, Gaucher M-L, Chorfi Y, Suresh G, Rouissi T, Brar SK, Côté C, Ramirez AA, Godbout S (2018) Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. *Anim Nutr* 4:170–178
13. Roth N, Käsbohrer A, Mayrhofer S, Zitz U, Hofacre C, Domig KJ (2019) The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. *Poult Sci* 98:1791–1804
14. ESVAC (2017) Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2015. Trends from 2010 to 2015. European Medicines Agency, Seventh European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption report (EMA/184855/2017).
15. Johansson MEV, Ambort D, Pelaseyed T, Schütte A, Gustafsson JK, Ermund A, Subramani DB, Holmén-Larsson JM, Thomsson KA, Bergström JH, van der Post S, Rodriguez-Piñero AM, Sjövall H, Bäckström M, Hansson GC (2011) Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell Mol Life Sci* 68:3635–3641
16. Röhlich P (2014) Szövevény, 4. átdolgozott kiadás. Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió
17. Nochi T, Jansen CA, Toyomizu M, Eden WV (2018) The Well-Developed Mucosal Immune Systems of Birds and Mammals Allow for Similar Approaches of Mucosal Vaccination in Both Types of Animals. *Front Nutr* 5:60
18. Shreiner AB, Kao JY, Young VB (2015) The gut microbiome in health and in disease. *Curr Opin Gastroenterol* 31:69–75
19. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI (2007) The human microbiome project. *Nature* 449:804–810
20. Al-Asmakh M, Zadjali F (2015) Use of Germ-Free Animal Models in Microbiota-Related Research. *J Microbiol Biotechnol* 25:1583–1588
21. Li R, Hou G, Jiang X, Song Z, Fan Z, Hou D-X, He X (2019) Different dietary protein sources in low protein diets regulate colonic microbiota and barrier function in a piglet model. *Food Funct* 10:6417–6428
22. Han Y, Zhao Q, Tang C, Li Y, Zhang K, Li F, Zhang J (2020) Butyrate Mitigates Weanling Piglets From Lipopolysaccharide-Induced Colitis by Regulating Microbiota and Energy Metabolism of the Gut-Liver Axis. *Front Microbiol* 11:588666
23. Randall KJ, Turton J, Foster JR (2011) Explant culture of gastrointestinal tissue: a review of methods and applications. *Cell Biol Toxicol* 27:267–284
24. Wilson TH, Wiseman G (1954) The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. *J Physiol* 123:116–125
25. Trowell OA (1959) The culture of mature organs in a synthetic medium. *Experimental Cell Research* 16:118–147

26. Browning TH, Trier JS (1969) Organ culture of mucosal biopsies of human small intestine. *J Clin Invest* 48:1423–1432. <https://doi.org/10.1172/JCI106108>
27. Costa MO, Harding JCS, Hill JE (2016) Development and evaluation of a porcine in vitro colon organ culture technique. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 52:942–952
28. Bareiss PM, Metzger M, Sohn K, Rupp S, Frick JS, Autenrieth IB, Lang F, Schwarz H, Skutella T, Just L (2008) Organotypical tissue cultures from adult murine colon as an in vitro model of intestinal mucosa. *Histochem Cell Biol* 129:795–804
29. Neckel PH, Mattheus U, Hirt B, Just L, Mack AF (2016) Large-scale tissue clearing (PACT): Technical evaluation and new perspectives in immunofluorescence, histology, and ultrastructure. *Sci Rep* 6:34331
30. Miecznikow E. *O Naturze Ludzkiej* (1907) *Zarys Filozofii Optymistycznej* (translation F. Wermiński). Wydawnictwo Biblioteka Naukowa.
31. Lilly DM, Stillwell RH (1965) PROBIOTICS: GROWTH-PROMOTING FACTORS PRODUCED BY MICROORGANISMS. *Science* 147:747–748
32. Fuller R (1989) Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66:365–378
33. FAO (2002) Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the evaluation of probiotics in food
34. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization (2006) Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Food and Agriculture Organization of the United Nations : World Health Organization, Rome
35. Mookiah S, Sieo CC, Ramasamy K, Abdullah N, Ho YW (2014) Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens. *J Sci Food Agric* 94:341–348
36. Zhang ZF, Kim IH (2014) Effects of multistrain probiotics on growth performance, apparent ileal nutrient digestibility, blood characteristics, cecal microbial shedding, and excreta odor contents in broilers. *Poult Sci* 93:364–370
37. Lei X, Piao X, Ru Y, Zhang H, Péron A, Zhang H (2015) Effect of *Bacillus amyloliquefaciens*-based Direct-fed Microbial on Performance, Nutrient Utilization, Intestinal Morphology and Cecal Microflora in Broiler Chickens. *Asian-Australas J Anim Sci* 28:239–246
38. Abdel-Rahman HA, Shawky SM, Ouda H, Nafeaa AA, Orabi SH (2013) Effect of Two Probiotics and Bioflavonoids Supplementation to the Broilers Diet and Drinking Water on the Growth Performance and Hepatic Antioxidant Parameters
39. Shim YH, Ingale SL, Kim JS, Kim KH, Seo DK, Lee SC, Chae BJ, Kwon IK (2012) A multi-microbe probiotic formulation processed at low and high drying temperatures: effects on growth performance, nutrient retention and caecal microbiology of broilers. *Br Poult Sci* 53:482–490
40. Biloni A, Quintana CF, Menconi A, Kallapura G, Latorre J, Pixley C, Layton S, Dalmagro M, Hernandez-Velasco X, Wolfenden A, Hargis BM, Tellez G (2013) Evaluation of effects of EarlyBird associated with FloraMax-B11 on *Salmonella* Enteritidis, intestinal morphology, and performance of broiler chickens. *Poult Sci* 92:2337–2346
41. van den Bogaard AE, Stobberingh EE (2000) Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents* 14:327–335
42. Singer RS, Finch R, Wegener HC, Bywater R, Walters J, Lipsitch M (2003) Antibiotic resistance--the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *Lancet Infect Dis* 3:47–51
43. Liong M-T (2011) Probiotics: Biology, Genetics and Health Aspects
44. Bera AK, Bhattacharya D, Pan D, Dhara A, Kumar S, Das SK (2010) Evaluation of Economic Losses due to Coccidiosis in Poultry Industry in India. *Agricultural Economics Research Review Agricultural Economics Research Review*
45. Skinner JT, Bauer S, Young V, Pauling G, Wilson J (2010) An economic analysis of the impact of subclinical (mild) necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Dis* 54:1237–1240
46. Gibson GR, Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125:1401–1412
47. Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, Scott K, Stanton C, Swanson KS, Cani PD, Verbeke K, Reid G (2017) Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14:491–502
48. Mattila-Sandholm T, Myllärinen P, Crittenden R, Mogensen G, Fondén R, Saarela M (2002) Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal* 12:173–182
49. Panesar PS, Kaur G, Panesar R, et al. (2009) Synbiotics: potential dietary supplements in functional foods.
50. James F. Zachary (2016) *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, 6th Edition. Mosby
51. Cannon, W.B (1929) *Organization for physiological homeostasis*

52. Anwikar S, Bhitre M (2010) Study of the synergistic anti-inflammatory activity of *Solanum xanthocarpum* Schrad and Wendl and *Cassia fistula* Linn. *Int J Ayurveda Res* 1:167–171
53. Czaja AJ (2014) Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 20:2515–2532
54. Liu Z, Wang Y, Wang Y, Ning Q, Zhang Y, Gong C, Zhao W, Jing G, Wang Q (2016) Dexmedetomidine attenuates inflammatory reaction in the lung tissues of septic mice by activating cholinergic anti-inflammatory pathway. *Int Immunopharmacol* 35:210–216
55. Ibelgaufts, H (2013) Cytokines. In: *Cytokines & Cells Pathfinder Encyclopedia*
56. Valkó Anna, Lőrincz Márta (2020) *Immunológiai illusztrációk könyve*. Semmelweis Kiadó
57. Khan MM (2008) Role of Cytokines. In: Khan MM (ed) *Immunopharmacology*. Springer US, Boston, MA, pp 33–59
58. Kanai T, Mikami Y, Sujino T, Hisamatsu T, Hibi T (2012) ROR $\gamma$ t-dependent IL-17A-producing cells in the pathogenesis of intestinal inflammation. *Mucosal Immunology* 5:240–247. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.6>
59. Dinarello CA (1996) Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87:2095–2147
60. Dinarello CA (2009) Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 27:519–550
61. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier J-P, Fahmi H (2011) Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 7:33–42
62. Fenton MJ (1992) Review: transcriptional and post-transcriptional regulation of interleukin 1 gene expression. *Int J Immunopharmacol* 14:401–411
63. Keller M, Rüegg A, Werner S, Beer H-D (2008) Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* 132:818–831
64. (2008) Retraction of: Gattoni A, Parlato A, Vangieri B, Bresciani M, Derna R. *Clin Ter* 2006 Jul-Aug;157(4):377-86. *Clin Ter* 159:207
65. Schall TJ (1991) Biology of the rantes/sis cytokine family. *Cytokine* 3:165–183
66. Bacon KB, Szabo MC, Yssel H, Bolen JB, Schall TJ (1996) RANTES induces tyrosine kinase activity of stably complexed p125FAK and ZAP-70 in human T cells. *The Journal of experimental medicine* 184:873–882
67. Nieto M, Frade JMR, Sancho D, Mellado M, Martínez-A C, Sánchez-Madrid F (1997) Polarization of Chemokine Receptors to the Leading Edge during Lymphocyte Chemotaxis. *The Journal of Experimental Medicine* 186:153–158
68. Appay V, Brown A, Cribbes S, Randle E, Czaplewski LG (1999) Aggregation of RANTES Is Responsible for Its Inflammatory Properties. *Journal of Biological Chemistry* 274:27505–27512
69. Murooka TT, Wong MM, Rahbar R, Majchrzak-Kita B, Proudfoot AEI, Fish EN (2006) CCL5-CCR5-mediated Apoptosis in T Cells. *Journal of Biological Chemistry* 281:25184–25194
70. Launay S, Hermine O, Fontenay M, Kroemer G, Solary E, Garrido C (2005) Vital functions for lethal caspases. *Oncogene* 24:5137–5148
71. Wang Z-B, Liu Y-Q, Cui Y-F (2005) Pathways to caspase activation. *Cell Biol Int* 29:489–496
72. Fu Y-F, Fan T-J (2002) Bcl-2 family proteins and apoptosis. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 34:389–394
73. Read SH, Baliga BC, Ekert PG, Vaux DL, Kumar S (2002) A novel Apaf-1-independent putative caspase-2 activation complex. *J Cell Biol* 159:739–745
74. Sun N, Xue Y, Wei S, Wu B, Wang H, Zeng D, Zhao Y, Khalique A, Pan K, Zeng Y, Shu G, Jing B, Ni X (2023) Compound Probiotics Improve Body Growth Performance by Enhancing Intestinal Development of Broilers with Subclinical Necrotic Enteritis. *Probiotics Antimicrob Proteins* 15:558–572
75. Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239–247
76. Ulfig A, Leichert LI (2021) The effects of neutrophil-generated hypochlorous acid and other hypohalous acids on host and pathogens. *Cell Mol Life Sci* 78:385–414
77. Thomas DC (2017) The phagocyte respiratory burst: Historical perspectives and recent advances. *Immunol Lett* 192:88–96
78. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J (2006) NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol* 72:1493–1505
79. dr. Medveczky, István dr. Rusvai, Miklós dr. Varga, János dr. Tuboly, Sándor (1998) *Állatorvosi járványtan I. - Állatorvosi mikrobiológia, bakteriológia, virológia, immunológia*
80. Konieczka P, Nowicka K, Madar M, Taciak M, Smulikowska S (2018) Effects of pea extrusion and enzyme and probiotic supplementation on performance, microbiota activity and biofilm formation in the broiler gastrointestinal tract. *Br Poult Sci* 59:654–662

81. Wang X, Tian Z, Azad M a. K, Zhang W, Blachier F, Wang Z, Kong X (2021) Dietary supplementation with *Bacillus* mixture modifies the intestinal ecosystem of weaned piglets in an overall beneficial way. *J Appl Microbiol* 130:233–246
82. Zuo Z, Li Q, Guo Y, Li X, Huang S, Hegemann JH, He C (2020) Feed-borne *Bacillus cereus* exacerbates respiratory distress in chickens infected with *Chlamydia psittaci* by inducing haemorrhagic pneumonia. *Avian Pathol* 49:251–260
83. Haque MA, Wang F, Chen Y, Hossen F, Islam MA, Hossain MA, Siddique N, He C, Ahmed F (2021) *Bacillus* spp. Contamination: A Novel Risk Originated From Animal Feed to Human Food Chains in South-Eastern Bangladesh. *Front Microbiol* 12:783103
84. Zhou M, Zeng D, Ni X, Tu T, Yin Z, Pan K, Jing B (2016) Effects of *Bacillus licheniformis* on the growth performance and expression of lipid metabolism-related genes in broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. *Lipids Health Dis* 15:48
85. Rozs M, Manczinger L, Vágvölgyi C, Kevei F (2001) Secretion of a trypsin-like thiol protease by a new keratinolytic strain of *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiol Lett* 205:221–224
86. Chen Y-C, Yu Y-H (2020) *Bacillus licheniformis*-fermented products improve growth performance and the fecal microbiota community in broilers. *Poultry Science* 99:1432–1443
87. Roberts MS, Nakamura LK, Cohan FM (1994) *Bacillus mojavensis* sp. nov., Distinguishable from *Bacillus subtilis* by Sexual Isolation, Divergence in DNA Sequence, and Differences in Fatty Acid Composition. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44:256–264
88. Youcef-Ali M, kacem chaouche N, Laid D, Insaf B, Mounira A, Hlne C, Philippe T (2014) Antifungal activity and bioactive compounds produced by *Bacillus mojavensis* and *Bacillus subtilis*. *African Journal of Microbiology Research* 8:476–484
89. Li Y, Tang X, Chen L, Xu X, Li J (2022) Characterization of a Nattokinase from the Newly Isolated Bile Salt-Resistant *Bacillus mojavensis* LY-06. *Foods* 11:2403
90. Wu H, Wang Y, Zhang Y, Xu F, Chen J, Duan L, Zhang T, Wang J, Zhang F (2020) Breaking the vicious loop between inflammation, oxidative stress and coagulation, a novel anti-thrombus insight of nattokinase by inhibiting LPS-induced inflammation and oxidative stress. *Redox Biology* 32:101500
91. Tráj Patrik, Horváth Dávid Géza, Sebők Csilla, Mackei Máté, Márton Rege Anna, Varga Ilona, Kemény Ágnes, Neogrady Zsuzsanna, és Mátis Gábor (2022) Csirke vékonybél eredetű explant tenyészetek létrehozása a bél gyulladáshoz való válaszában vizsgálata
92. Xu Y, Yu Y, Shen Y, Li Q, Lan J, Wu Y, Zhang R, Cao G, Yang C (2021) Effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth performance, immunity, short chain fatty acid production, antioxidant capacity, and cecal microflora in broilers. *Poultry Science* 100:101358
93. Zhao Y, Zeng D, Wang H, Qing X, Sun N, Xin J, Luo M, Khalique A, Pan K, Shu G, Jing B, Ni X (2020) Dietary Probiotic *Bacillus licheniformis* H2 Enhanced Growth Performance, Morphology of Small Intestine and Liver, and Antioxidant Capacity of Broiler Chickens Against *Clostridium perfringens*-Induced Subclinical Necrotic Enteritis. *Probiotics & Antimicro Prot* 12:883–895
94. Knap I, Lund B, Kehlet AB, Hofacre C, Mathis G (2010) *Bacillus licheniformis* Prevents Necrotic Enteritis in Broiler Chickens. *Avian Diseases* 54:931–935
95. Han Y, Xu X, Wang J, Cai H, Li D, Zhang H, Yang P, Meng K (2023) Dietary *Bacillus licheniformis* shapes the foregut microbiota, improving nutrient digestibility and intestinal health in broiler chickens. *Front Microbiol* 14:1113072
96. Cengizler İ, Balcazar JL, Demirkale İ (2023) Effects of two host-associated probiotics *Bacillus mojavensis* B191 and *Bacillus subtilis* MRS11 on growth performance, intestinal morphology, expression of immune-related genes and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Streptococcus iniae*. *Developmental & Comparative Immunology* 138:104553
97. Tráj P, Herrmann EM, Sebők C, Vörösházi J, Mackei M, Gálfi P, Kemény Á, Neogrady Z, Mátis G (2022) Protective effects of chicoric acid on polyinosinic-polycytidylic acid exposed chicken hepatic cell culture mimicking viral damage and inflammation. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 250:110427

## 11. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, dr. Tráj Patriknak, aki szakmai tudásával, kitartó munkájával és végtelen türelmével segítette a TDK dolgozatom elkészülését.

Köszönöm Dr. Mátis Gábornak, aki rámutatott a biokémia szépségeire és az abban rejlő lehetőségekre, valamint lehetőséget biztosított a dolgozat elkészítéséhez. Köszönöm szépen az Élettani és Biokémiai Tanszék Biokémiai Osztály összes munkatársának, aki munkájával hozzájárult a kutatáshoz.

Hálás köszönet Dr. Kemény Ágnesnek és a Pécsi Tudományegyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetének a Luminex mérésekben nyújtott önzetlen segítségükért.

Köszönet illeti Dr. Bohárné Varga Krisztinát, Dr. Bohár Gyulát és a Biovéd 2005 Kft. dolgozóit, akik részt vettek a kivonatok elkészítésében és az együttműködéssel adódó többlet teendőket lelkiismeretesen végezték.

Ezúton kívánunk köszönetet mondani a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatalnak a kutatás pénzügyi támogatásáért [OTKA FK 134940; TKP2020-NKA-01; NVKDP C1747992].

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a családomnak és a barátaimnak, akik a háttérből végig támogattak és erőt adtak.



## Témavezetői nyilatkozat TDK dolgozathoz

Alulírott dr. Trájer Patrik....., mint témavezető nyilatkozom,  
hogy (név) Dudás Réka....., VI.... évfolyamos hallgató  
„Bacillus kivonatok Latisai csirke eredetű bélexplantát.....”  
című dolgozatát átolvastam és jóváhagytam, részvételét támogatom az  
Állatorvostudományi Egyetem 20... . 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

**HuVetA**  
**ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT\***

Név: DUDAS REKA  
Elérhetőség (e-mail cím): reka35591@gmail.com  
A feltöltendő mű címe: Bacillus kivonatok hatásai csirke eredetű  
bel. explant. tenyészetben  
A mű megjelenési adatai: TDK dolgozat 2023  
Az átadott fájlok száma: 1 db

---

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrészt mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg **(egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel)**:

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címekre) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, **nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:**



Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénytörtő módon visszaélne.

Budapest, 2013. év .....<sup>10</sup>.....hó .....<sup>19</sup>.....nap



aláírás  
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

---

**A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archivum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutjra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltatassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.**

*A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén*

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*



**Diplomamunka konzultációs lap állatorvostan hallgatók részére**

A hallgató neve: Dudás Réka

Neptun-kódja: PG0RY6

A témavezető neve és beosztása: Dr. Tráj Patrik, PhD hallgató

Tanszék: Élettani és Biokémiai Tanszék, Biokémiai Osztály

A diplomadolgozat címe: Bacillus kivonatok hatásai csirke eredetű bél explant tenyészetben

**Konzultáció - 1. félév**

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2022.	03.	07.	Témakijelölés	
2.	2022.	05.	25.	Bél explant tenyészetek készítése és kezelése	
3.	2023.	01.	30.	Dolgozat vázának áttekintése	
4.	2023.	02.	07.	Laboratóriumi munka, LDH aktivitás mérése	
5.	2023.	02.	21.	Laboratóriumi munka, ELISA teszt végzése	

**Érdemjegy az első félév végén: jeles (5)**

**Konzultáció - 2. félév**

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2023.	08.	21.	Eredmények áttekintése és megbeszélése	
2.	2023.	09.	22.	Szakirodalmi áttekintés javítása	
3.	2023.	10.	06.	Ábrák és hivatkozások beillesztése	
4.	2023.	10.	17.	Plágiumszűrés eredményének javítása	
5.	2023.	11.	10.	TDK felkészülés	

**Érdemjegy a második félév végén: jeles (5)**



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

A diplomamunka befogadható, védésre alkalmasnak találtam.

Hallgató aláírása: Pudás Réka .....  
Tanszéki előadó aláírása: [Signature] ..... Átvétel dátuma: 2023. 11. 15......

témavezető aláírása

## NYILATKOZAT

Alulírott DUDÁS RÉKA..... nyilatkozom, hogy diplomamunkám, melynek címe  
Bacillus kivonatok hatásai csirke  
eredetű bél explant tenyészetén..... tartalmi és formai  
szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2023 évi TDK konferencián  
szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2023. 11. 16.....

Dudás Réka.....

a hallgató neve és aláírása