

Állatorvostudományi Egyetem



Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

*Lactobacillus rhamnosus* probiotikus  
baktériumtörzs hatásának *in vitro*  
vizsgálata sertés bélfertőzés modellben

**Készítette:** Somogyi Fanni

**Témavezetők:**

Dr. Farkas Orsolya Ph.D.

ÁTE Gyógyszertani és Méregtani Tanszék,

Tudományos főmunkatárs

Palkovicsné Pézsa Nikolett

ÁTE Gyógyszertani és Méregtani Tanszék,

Tudományos segédmunkatárs

Budapest, 2022

# Tartalom

|  |    |
|--|----|
| Rövidítések jegyzéke.....  | 3  |
| 1. Bevezetés.....  | 4  |
| 2. Szakirodalmi áttekintés .....   | 6  |
| 2.1. A bélbarrier felépítése és funkciója.....   | 6  |
| 2.2. Az oxidatív stressz és szerepe a bélfertőzésben .....                             | 7  |
| 2.3. A sertés <i>E. coli</i> és <i>S. Typhimurium</i> okozta bélgyulladás .....        | 8  |
| 2.4. Antibiotikum-rezisztencia .....   | 10 |
| 2.5. <i>In vitro</i> modellek, az IPEC-J2 sejtvonal.....                               | 11 |
| 2.6. Probiotikumok .....   | 12 |
| 2.7. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....  | 13 |
| 3. Célkitűzések .....  | 15 |
| 4. Anyag és módszer .....  | 16 |
| 4.1. Az IPEC-J2 sejttenyészetek létrehozása .....                                      | 16 |
| 4.2. Felhasznált baktériumtörzsek és vegyületek .....                                  | 16 |
| 4.3. A sejtek életképességének vizsgálata .....  | 17 |
| 4.4. Intracelluláris redox állapot vizsgálata.....                                     | 18 |
| 4.4. A bélhámsejtek paracelluláris permeabilitásának vizsgálata .....                  | 19 |
| 4.5. A tapadás gátlásának vizsgálata .....   | 20 |
| 4.6. Statisztikai számítások .....   | 20 |
| 5. Eredmények.....   | 21 |
| 5.1. A <i>L. rhamnosus</i> hatása az intracelluláris ROS mennyiségére.....             | 21 |
| 5.2. A <i>L. rhamnosus</i> hatása a bélhámsejtek paracelluláris permeabilitására ..... | 23 |
| 5.3. A <i>L. rhamnosus</i> tapadásgátló hatása .....                                   | 24 |
| 6. Megbeszélés .....   | 26 |
| 7. Összefoglalás.....  | 29 |
| 8. Summary .....   | 30 |
| 9. Irodalomjegyzék.....  | 31 |
| 10. Köszönetnyilvánítás .....  | 38 |

## Rövidítések jegyzéke

AJ – adherens junction (zonula adherens)

AMR – antimikrobiális rezisztencia

CFU – colony forming unit

DCF – 2',7'-diklorofluoreszcein

DCF-DA – diklorofluoreszcein-diacetát

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

EGF – epidermális növekedési faktor

EPEC - enteropatogén *Escherichia coli*

ETEC – enterotoxikus *Escherichia coli*

FBS – főtális borjúsavó

FITC-D, FD-4 – fluoreszcens izotiocianát-dextrán

GIT – gasztrointesztinális traktus

IL-10 – interleukin-10

IL-1 $\alpha$  – interleukin 1-alfa

IL-6 – interleukin-6

INF- $\gamma$  – interferon gamma

MAPK – mitogén-aktivált protein kináz

MDR – multirezisztens

PBS – foszfáttal pufferolt sóoldat

RNS – reaktív nitrogén származékok

ROS – reaktív oxigén származékok

T3SS – III-as típusú szekréciós rendszer

TJ – tight junction (zonula occludens)

TNF- $\alpha$  – tumor nekrosis faktor  $\alpha$

# 1. Bevezetés

Az antibiotikumok felfedezése hatalmas mérföldkőnek számít az orvostudomány történetében, hiszen lehetővé tette számos, azelőtt sokszor halálos kimenetelű betegség gyógyítását. A penicillin és származékai a második világháború idején terjedtek el, napjainkban pedig már számos különböző antibiotikum csoportot ismerünk, és rengeteg készítmény áll rendelkezésünkre mind a humán, mint az állatgyógyászat területén. Az antibiotikumok helytelen és túlzott mértékű használata azonban hosszú távon súlyos következményekkel jár. Az 1950-es években számos haszonállattartó kezdte rutinszerűen alkalmazni ezeket a szereket növekedési hormonokkal és szteroidokkal együtt szubklinikai dózisban annak érdekében, hogy fokozza az állatok teljesítményét és testsúlygyarapodását, valamint, hogy visszaszorítsa a bakteriális fertőzések előfordulását. Ez a rendszeres, kis dózisban történő alkalmazás azonban szelekciós nyomást gyakorolt a baktériumokra, és elősegítette az antibakteriális rezisztencia kialakulását. Az Európai Unió, felismerve, hogy a rezisztencia fokozódása globális közegészségügyi veszélyt jelent, 2006-ban betiltotta az antibiotikumok hozamfokozás céljából történő használatát. 2022-ben további jogszabályok léptek életbe, melyek szigorúan szabályozzák az antibiotikumok felhasználásának módját az állatgyógyászatban.

A probiotikumok bélrendszerre gyakorolt jótékony hatásait már hosszú idő óta ismerik. Képesek védelmet nyújtani a patogén baktériumok ellen azáltal, hogy felhasználják az azok számára szükséges tápanyagokat, anyagcsere-termékeikkel megváltoztatják a bél lumenének körülményeit, és megtelepednek a bél nyálkahártyáján, kiszorítva onnan a kórokozókat. Emellett antimikrobiális anyagokat és vitaminokat termelnek, befolyásolni tudják a mikrobióta összetételét és interakcióba lépnek a gazdaszervezet immunrendszerével, a gyulladással kapcsolatos folyamatok és az oxidatív stressz szempontjából lényeges jelátviteli utakat befolyásolva. Ennélfogva a probiotikumoknak jelentős szerepe van az emésztőtraktus egészségének megőrzésében. A probiotikumok takarmánykiegészítőként történő adagolása hozzájárulhat az antibiotikum felhasználás csökkentéséhez és ezáltal az antibiotikum-rezisztencia növekedésének visszaszorításához. A probiotikus baktériumtörzsek hatásáról számos adat áll rendelkezésre, de ezen baktériumok hatásának háttérében álló mechanizmusok még nem teljesen feltérképezettek. Továbbá, a probiotikumok egyes hatásai a különféle állatfajokban különbözőek lehetnek. A sertés gazdasági szempontból különösen jelentős haszonállat, így módon a probiotikumok sertések emésztőrendszerében betöltött szerepére irányuló kutatások széles körű érdeklődésre tarthatnak igényt.

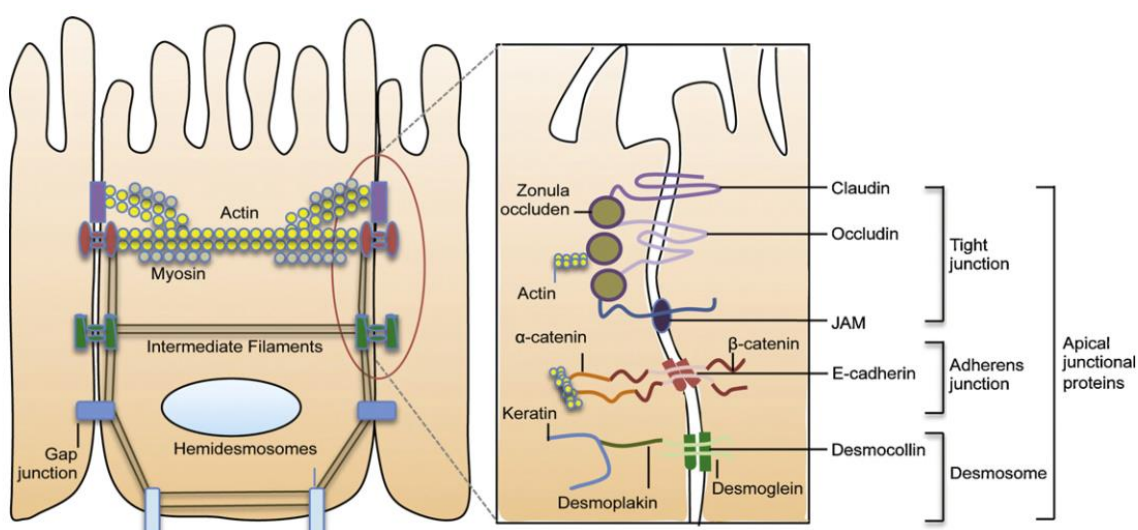
Jelen dolgozatban egy sertésből izolált probiotikus baktériumtörzs, a *Lactobacillus rhamnosus* hatását vizsgáltuk sertés bélhámsejtekből álló sejttenyészetben. Kísérleteink során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy képes-e a kiválasztott baktériumtörzs ellensúlyozni egyes bélbeli patogén baktériumok által kiváltott oxidatív stresszt, a bélbarrier paracelluláris permeabilitásának növekedését és a patogének bélhámsejtekhez való tapadását.

## 2. Szakirodalmi áttekintés

### 2.1. A bélbarrier felépítése és funkciója

A gasztrointesztinális traktus (GIT) egy komplex és dinamikus szervrendszer, mely az emésztés és a felszívás feladatának ellátása mellett fizikai és immunológiai barrierként is funkcionál a szervezet és a külső környezet között. Mivel folyamatos kapcsolatban van a külvilággal, nap mint nap érik külső (pl. takarmány, patogének) és belső (mikrobióta) hatások, amelyekre a megfelelő szintű védekezéssel vagy toleranciával kell reagálnia (Pluske és mtsai, 2018).

A béltraktus lumenét határoló barrier számos funkcionális rétegből épül fel. A legkülső réteget a bélben élő mikroorganizmusok (baktériumok, gombák, vírusok) alkotják, ezt követi egy kettős mucinréteg, melyben IgA és antimikrobiális peptidek is megtalálhatók. A harmadik réteg az egymáshoz szorosan kapcsolódó bélhámsejtekből áll, ez teremti meg a fő fizikai akadályt a belső és a külső környezet között. A bélhámsejtek alatti lamina propriában pedig a veleszületett és az adaptív immunrendszer sejtjei (dendritikus sejtek, makrofágok, B- és T-sejtek, plazmasejtek stb.) találhatóak (Natividad és Verdu, 2013).



1. ábra: a bélhámsejtek közötti szoros kapcsolatok struktúrája (Natividad és Verdu, 2013)

A bélhámsejtek közötti szoros kapcsolatot citoplazmatikus és a sejtmembránba ágyazódó fehérjék sokasága alkotja (“apical junctional proteins”, 1. ábra). Négy fő struktúrát lehet elkülöníteni luminálistól bazális irányba haladva. Az első, a tight junction (TJ) transzmembrán (okkludin és kladinok) és citoplazmatikus (zonula occludens, ZO) fehérjékből áll. Ezután következik az adherens junction (AJ), amelyet kateninek és E-kadherin építenek fel. Ezt követi a dezmoszóma (macula adherens), amelyet sokféle fehérje alkot (pl. dezmoplakin és

dezmoglein), majd a gap junction zárja a sort. A sejt két oldalán lévő apikális fehérje-komplexeket a citoplazmán átívelő aktin, miozin és intermedier filamentumok kötik össze és stabilizálják (Natividad és Verdu, 2013; Hartsock és Nelson, 2008).

Ezen apikális fehérjék által létrehozott szoros sejtkapcsolatok szigorúan szabályozzák a paracelluláris transzportot és így a bélhám permeabilitását. Egyfelől átengedik a szervezet számára fontos vizet, elektrolitokat és tápanyagokat, másfelől viszont gátat alkotnak a baktériumok, vírusok, toxinok és egyéb káros antigének számára (Zheng és mtsai, 2021), csak kis mennyiséget engedve át belőlük, hogy azok információul szolgálhassanak az immunrendszer számára (Natividad és Verdu, 2013).

A sejtkapcsolatok alkotta barrier állapotát sokféle tényező befolyásolja: különféle patogének jelenléte és betegségek megléte, valamint az életkor és a takarmányozás (Mullin és mtsai, 2002; Sander és mtsai, 2005). Ha a barrier sérül és megnő a bélhám permeabilitása, toxinok, allergének és patogén baktériumok juthatnak nagy mennyiségben a keringésbe, és gyulladással választhatnak ki (Asmar és mtsai, 2002; Arrieta és mtsai, 2006). A barrier funkció integritása ennél fogva kritikus fontosságú a bakteriális fertőzések megelőzése céljából.

## **2.2. Az oxidatív stressz és szerepe a bélfertőzésben**

Az oxidatív stressz kifejezést először Helmut Sies használta 1985-ben. A mai definíció szerint oxidatív stressz akkor áll fenn, ha a szervezetben felborul az egyensúly a szabad gyökök keletkezése és eliminálása között (Daenen és mtsai, 2019). A szabad gyökök kisméretű, könnyen diffundáló molekulák, ionok vagy atomok, melyek párosítatlan elektronnal rendelkeznek, ezért instabilak és kémiaiag nagyon aktívak. Két csoportjukat különböztetjük meg: a reaktív oxigén gyököket (ROS) és a reaktív nitrogén gyököket (RNS). Fontos megjegyezni, hogy nem csak szabad gyökök játszanak szerepet az oxidatív stressz kialakulásában, hanem olyan molekulák is, amelyek nem rendelkeznek párosítatlan elektronnal, de reaktivitásuk a szabad gyökökhöz hasonló (pl. hidrogén-peroxid). A ROS és RNS kifejezést ezért tágabb értelemben reaktív oxigén, illetve nitrogén származékként is használjuk (Miller és mtsai, 1990).

Az egészséges szervezetben folyamatosan keletkeznek szabad gyökök külső hatásokra (sugárzás, mutagén vegyületek, toxinok), valamint élettani biokémiai reakciók intermedier termékeiként, a peroxiszómákban, valamint a mitokondriumban zajló reakciók, a peroxiszómák működése, valamint a CYP450 és különböző oxidáz-enzimek által katalizált reakciók során. A szervezet ezeket folyamatosan igyekszik eliminálni enzimek (szuperoxid-dizmutáz, kataláz,

glutation-peroxidáz és vitaminok), valamint a táplálékkal bevitt mikroelemek és antioxidáns anyagok segítségével. Fiziológias körülmények között a két folyamat között dinamikus egyensúly áll fenn (Hao és mtsai, 2021). A reaktív oxigén származékok szerepet játszanak a patogének elleni védekezésben, egyes jelátviteli utakban és bioszintézis-reakciókban (Brieger és mtsai, 2012).

Ha a káros hatások felerősödnek, a szervezet antioxidáns rendszere nem tudja időben eltávolítani a keletkezett nagy mennyiségű szabad gyököt. A sejtekben felgyülemelő ROS és RNS károsítja a membránokat, a fehérjék, a lipideket és a DNS-t, így sérülnek a jelátviteli utak, az energia-metabolizmus zavart szenved, és génmutációk léphetnek fel. Az oxidatív stressz tehát az egész szervezetre káros hatással van. A nagyüzemi körülmények között tartott sertések a számos stresszhatás és az intenzív növekedés miatt különösen ki vannak téve az oxidatív stressz veszélyének. Hajlamosító tényezők a születés és a választás időszaka, valamint a hő- vagy hidegstressz, mikotoxint tartalmazó takarmány fogyasztása, szállítás, zsúfoltság, egymás közötti harcok, rossz higiénia és a különböző fertőzések. Az oxidatív stressz eliminálására a szervezet energiát fordít, melyet a növekedéstől von el, ezért termelés-csökkenést és emiatt gazdasági károkat okoz. (Hao és mtsai, 2021).

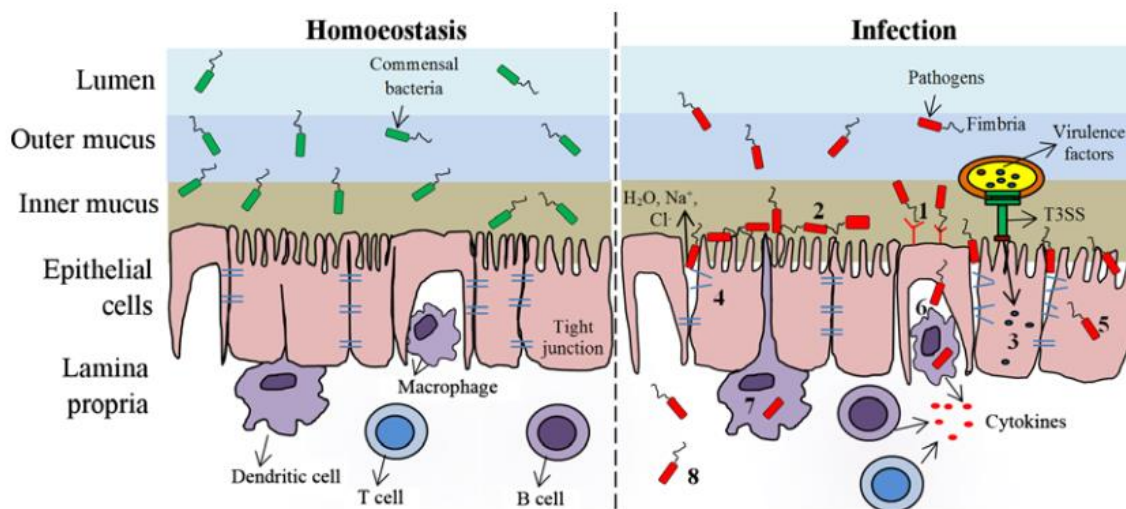
Mivel a GIT állandóan ki van téve a külvilágból érkező patogéneknek, ezért kulcsfontosságú ROS forrás (Bhattacharyya és mtsai, 2014). Bélfertőzés esetén gyorsan kialakul az oxidatív stressz, amely barrier diszfunkciót okoz, aktiválja az immunrendszert és gyulladást vált ki (Han és mtsai, 2016). A fertőzés helyére siető neutrofil granulociták és makrofágok ROS-termelése súlyosbítja az oxidatív stresszt, öngerjesztő ciklus alakul ki, amelyet nehéz kordában tartani. Az oxidatív stressz és a gyulladás következménye többek között a bél élettani struktúrájának felbomlása, a felszívódás romlása és így az energiaellátás zavara, a bélhámsejtek apoptózisa és rendellenes proliferációja és a diszbiózis (Wang és mtsai, 2020).

### **2.3. A sertés *E. coli* és *S. Typhimurium* okozta bélgyulladása**

A sertés colibacillózist két fő *Escherichia coli* patotípus okozza: az enterotoxikus *E. coli* (ETEC) és az enteropatogén *E. coli* (EPEC), melyek közül az előbbi bír nagyobb jelentőséggel. Az ETEC újszülött korban és választás után, az EPEC pedig szintén választáskor okoz súlyos, hasmenéssel járó és akár halálos kimenetelű bélbetegséget (Fairbrother és Gyles, 2012). A halálozási ráta újszülöttkori hasmenés esetén elérheti a 70%-ot, választás utáni hasmenés esetén pedig 25%-os is lehet (Martelli és mtsai, 2013).



A *Salmonella enterica* serovar. Typhimurium (*S. Typhimurium*) a sertésben leggyakrabban izolált Salmonella-szerotípus Európában. Hasmenéssel, dehidrációval és súlyos esetben elhullással járó enterokolitist okoz. Hajlamosító tényezők az egyéb betegségek megléte, a választás időszaka és a rossz telepi higiénia. Gyógyulás után sok sertés hordozó marad és hónapokig üríti a kórokozót, valamint humán-egészségügyi szempontból fontos megemlíteni, hogy a baktériummal szennyezett sertéshús emberi fertőzéseket okozhat (Carlson és mtsai, 2012).



2. ábra: *E. coli* és *S. enterica* bélhámsejt-kolonizációja és patogén hatásai a gazdaszervezetben (Tran és mtsai (2016), Sansonetti (2004) és Kalita és mtsai (2014) után): a baktériumsejtek adhéziója a bélhámsejtek apikális felszínéhez fehérje-receptorok által (1); bakteriális biofilm keletkezése (2); virulencia-faktorok bejutása a bélhámsejtbe a III-as típusú szekréciós rendszeren (T3SS) keresztül (3); a bélhámsejtek közötti TJ-ök felbomlása (4); a patogén baktériumok megjelenése a bélhámsejtekben (5), a makrofágokban (6), a dendritikus sejtekben (7) és a lamina propriában (8).

A két baktérium patogenezise nagymértékben hasonló folyamat (2. ábra). A kórokozó, miután bekerült a bél lumenébe, először megtapad a bél nyálkahártyáján, az *E. coli* fimbriák (Fairbrother és Gyles, 2012), a *S. Typhimurium* pedig csillók (Sakarya és mtsai, 2010) segítségével. Ennek hatására a mikrovillusok sérülnek, és csökken a felszívó felület (Croxen és mtsai, 2013). Ezután a baktériumok biofilmet képeznek, amely a továbbiakban metasztatikus centrumként szolgál (Stoodley és mtsai, 2002), és amelyben a baktériumok anyagcséréje lelassul, ezért rezisztensebbek lesznek az antimikrobiális szerekkel szemben (Stewart és Costerton, 2001). Ezt követően a kórokozók a III-as típusú szekréciós rendszerükön (type-III secretion system, T3SS) keresztül bakteriális effektor fehérjéket juttatnak a célsejtekbe (Negrate és mtsai, 2008). Ezek közé tartoznak az EPEC által termelt F-fehérjék (Mills és mtsai,

2008), melyek a TJ-fehérjéket károsítják, és így megnő a paracelluláris permeabilitás (Croxen és mtsai, 2013; Bao és mtsai, 2015), különböző immunszuppresszor fehérjék (Negrate és mtsai, 2008; Rahman és McFadden, 2011; Gao és mtsai, 2015), valamint az *E. coli* által termelt hőlabilis (LT) és hőstabil (ST) enterotoxinok, melyek szekréción hasmenést váltanak ki és ezáltal megbontják az intesztinális homeosztázist (Croxen és mtsai, 2013), valamint az ozmózis-viszonyok megváltoztatásával sejtlízist okoznak (Jacobsen és mtsai, 2008). Ezek a folyamatok profúz, vízserű vagy véres hasmenéshez és dehidrációhoz vezetnek, amely utóbbira a malacok különösen érzékenyek kis testméretük miatt (Toledo és mtsai, 2012; Guerra Ordaz, 2013). Súlyos esetben a toxinok és a baktériumok bejutnak a lamina propriába, onnan pedig betörnek a véráramba, szisztémás fertőzést okozva (Bhunja, 2008). A bélfertőzések okozta csökkenő takarmányfelvétel, a növekedésbeli visszamaradás, a magas mortalitás és a kezelések ára jelentős gazdasági károkkal járhat az állattartók számára.

## **2.4. Antibiotikum-rezisztencia**

Az antibiotikumokat már évtizedek óta használják az állatgyógyászatban (Kirchhelle, 2018). Az 1950-es években megnőtt az állati termékek iránti igény, ami arra készítette az ágazat résztvevőit, hogy fokozzák a termelést és fenntartsák a haszonállatok egészségét zűfolt körülmények között is (Brown és mtsai, 2017). Felfedezték, hogy az antibiotikumok serkentik az állatok, többet közt a sertések (Taylor és Gordon, 1955; Wahlstrom és mtsai, 1950) növekedését, és javítják a húsminőséget, a takarmányhasznosítás mértékét és az állatok egészségi állapotát (Chattopadhyay, 2014; Hao és mtsai, 2014). Ennek hatására elterjedt az antibakteriális szerek hozamfokozásra és betegségmegelőzésre való használata, főleg a takarmányhoz és ivóvízhez való adagolás formájában (Marshall és Levy, 2011).

Az élelmiszertermelő állatoknak való tömeges antibiotikum adagolást egyértelmű összefüggésbe hozták az egyre növekvő antimikrobiális rezisztenciával (AMR). Az állatok és emberek bakteriális fertőzéseinek kezelésére alkalmazott antibakteriális szerek sok esetben megegyeznek, ezért aggasztó az olyan antibiotikumokkal kapcsolatos növekvő rezisztencia, amelyeket súlyos emberi megbetegedéseknél is használnak, mint például a kolisztin, a fluorokinolonok és a harmadik, valamint negyedik generációs cefalosporinok (Van Boeckel és mtsai, 2019). Kiemelhetők az *E. coli* és a *Salmonella*, melyeknek sok multirezisztens (MDR) törzsét izolálták már haszonállatokból és állati termékekből (EFSA és ECDC, 2020).

A “One Health” (“Egy Egészség”) elv szerint az AMR-krízis nem egy izolált probléma, mivel az állatok és az emberek egészsége összefügg egymással, valamint a környezettel, amelyben

élnek, ezért az állategészségügyben és az élelmiszertermelő állatoknál használt gyógyszerek hatással vannak az emberek egészségére is (Kahn, 2017; Hernando-Amado és mtsai, 2019). Felismerve, hogy az antimikrobiális rezisztencia globális közegészségügyi problémává vált, az Európai Unió 2006-ban betiltotta az antibiotikumok hozamfokozás céljából való felhasználását, 2019-ben pedig olyan rendeletet adott ki, amely szigorú szabályokkal korlátozza ezen szerek profilaktikus és metafilaktikus használatát. A profilaxis csak egyedi kezelésben alkalmazható, ha súlyos fertőző betegség kockázata áll fenn. Metafilaxis céljából történő kezelés pedig csak egyéb alternatíva hiányában lehetséges, amennyiben magas a fertőzés terjedésének kockázata egy állatcsoporton belül. Az Unió nagy hangsúlyt helyezett az életveszélyes emberi fertőzések megelőzésére és kezelésére szolgáló antimikrobiális szerek használatának csökkentésére is.

Ennélfogva megnőtt az igény olyan alternatív takarmánykiegészítők iránt, amelyek nem járulnak hozzá az AMR terjedéséhez, és képesek az antibiotikumokhoz hasonló pozitív hatást elérni a haszonállat tartás folyamata során. Ezek közé tartoznak a probiotikumok, melyek hozamfokozó és egyéb pozitív hatásai bizonyítottak sertésben, szarvasmarhában és baromfiban is (Markowiak és Ślizewska, 2018).

## **2.5. *In vitro* modellek, az IPEC-J2 sejtvonala**

Napjainkban az állatkísérletekkel szemben támasztott követelményeket nagyban befolyásolják az állatjóléttel kapcsolatos elvek. Ezek egyike a 3R elv, amely három angol kifejezés kezdőbetűjének a rövidítése: tökéletesítés (refinement), csökkentés (reduction) és helyettesítés (replacement). Az elv egyik célja a kutatásokhoz szükséges kísérleti állatok számának csökkentése, vagyis a kísérleti modellek létrehozása során a lehető legkevesebb, de még statisztikailag reprezentatív számú állatot kell felhasználni. Az is fontos szempont, hogy a kutatásokban felhasznált állatoknak a kísérletek során a lehető legkisebb mértékű szenvedést és fájdalmat okozzák. Amennyiben pedig lehetséges, az állatkísérletek helyettesítendőik egyéb módszerek használatával (Russell és Burch, 1959).

Napjainkban elterjedt helyettesítő módszer az *in vitro* sejtmodellek használata, melyek segítségével számos állatfaj különféle sejt típusai tarthatók fenn mesterséges körülmények között. Ezek a tenyészetek lehetőséget adnak többek között a bélhámsejtek, bizonyos patogén mikroorganizmusok és a mikrobióta kapcsolatának tanulmányozására. Ezeket a sejt kultúrákat általában daganatos vagy transzformált sejt vonalak segítségével állítják elő, ilyenek például a Caco-2, HT-29 és T84 daganatos sejt vonalak, amelyeket humán bélhám modellezésre elterjedten használnak (Cencič és Langerholc, 2010). Tekintve az egészséges és daganatos

eredetű sejtek közti különbségeket (pl. megváltozott anyagcsere, morfológia, proliferáció), az utóbbiak kevésbé alkalmasak élettani, illetve olyan kórtani folyamatok jellemzésére, ami élettani, illetve nem daganatos kórtani folyamatokkal áll kapcsolatban.

Az IPEC-J2 (intestinal porcine epithelial cells – jejunum) egy nem transzformált, sertés jejunumból származó bélhámsejtekből álló sejtvonal, melyet újszülött malacokból izoláltak. A megfelelő körülmények között egy egyrétegű bélhámsejt-tenyészetet alakít ki. A sejtek rendelkeznek apikális mikrovillusokkal és a TJ-ket létrehozó klaudin-3 és klaudin-4 fehérjékkel, valamint okkludinnal, viszont hiányoznak belőlük a klaudin-14 és klaudin-16 fehérjék. A sejteknek nincs kimutatható mucintermelése, és nincsenek közöttük kehelysejtek. A hiányosságok ellenére az IPEC-J2 sejtvonal alkalmas a bélhámsejt-baktérium interakciót kutató kísérletekben való felhasználásra, például az *E. coli*- és *Salmonella*-fertőzés okozta patogenezis vizsgálatára (Schierack, 2006).

## 2.6. Probiotikumok

A „probiotikum” kifejezést először Lilly és Stillwell (1965) használták olyan, egysejtűek által termelt anyagokra, amelyek más egysejtűek növekedését serkentették. Azóta a fogalom nagyban bővült, és a kutatók az évek során számos definícióval álltak elő. A ma leginkább elfogadott meghatározás szerint a probiotikumok olyan élő mikroorganizmusok, amelyek megfelelő adagokban alkalmazva pozitív hatással vannak a gazdaszervezet egészségére (FAO/WHO, 2001).

Többféle csoportosítása létezik a probiotikumoknak. Egy adott probiotikus faj lehet baktérium, ez a leggyakoribb, vagy élesztő-, illetve egyéb gombafaj, és lehet spóráképző vagy nem spóráképző. Ha egy probiotikum autochthón, akkor normál körülmények között része a gazdafaj bél mikrobiótájának, ha pedig allochthón, akkor nem. Egy forgalmazott probiotikus készítmény tartalmazhat egy fajt (annak egy vagy több törzsét), illetve állhat több faj keverékéből is (FAO, 2016). A készítményekben leggyakrabban alkalmazott nemzetségek az alábbiak: *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Pediococcus* és *Streptococcus* (Markowiak és Śliżewska, 2018).

Ahhoz, hogy kereskedelmi forgalomba lehessen hozni, az adott probiotikus baktériumfajnak meg kell felelnie bizonyos biztonsági előírásoknak: nem lehet patogén vagy toxikus, valamint stabil génállománnyal és legalább egy tudományosan bizonyított pozitív hatással kell, hogy rendelkezzen. Ezen kívül ellenállónak kell lennie a gyomornedvvel és az epesavakkal szemben, hogy sértetlenül elérje a bél megfelelő szakaszát, és ott képes legyen megtelepedni a bél

nyálkahártyáján. Forgalmazási szempontból elengedhetetlen, hogy a probiotikus baktérium megőrizze tulajdonságait a feldolgozási és szállítási folyamatok alatt (Gaggia és mtsai, 2010).

A probiotikumoknak sokféle, tudományosan bizonyított pozitív hatása van a gazdaszervezetre. Többféle mechanizmuson keresztül képesek gátolni és befolyásolni a patogén baktériumok anyagcseréjét: baktericid és bakteriosztatikus anyagokat termelnek, például bakteriocineket (Mazmanian és mtsai, 2008), valamint hidrogén-peroxidot (amely képes gátolni a Gram-negatív baktériumok növekedését) és olyan fermentációs termékeket, amelyek csökkentik a lumen pH-értékét. Ezen kívül fizikailag is gátolni tudják a kórokozók megtelepedését a bél nyálkahártyáján azáltal, hogy elfoglalják a kötőhelyeket és felélik a kórokozók számára szükséges tápanyagokat (Gill, 2003), hozzájárulva ezzel a mikrobióta egészséges összetételének fenntartásához. Enyhíteni képesek a hasmenéssel járó kórképeket azáltal, hogy megkötik az endotoxinokat, antitoxinokat termelnek, és gátolják a patogének toxin-expresszióját. Befolyásolják a gazdaszervezet immunválaszát azáltal, hogy stabilizálják a barrier funkciót (Salminen és mtsai, 1996), serkentik a nyálkatermelést, és erősítik, illetve gátolják az adaptív immunválasz egyes folyamatait. Segítik az emésztés és felszívás folyamatait azáltal, hogy növelik az egyes emésztőenzimek termelődését és aktivitását, valamint vitaminokat is termelnek (Hooper és mtsai, 2002; Timmerman és mtsai, 2005). Hozzájárulnak az oxidatív stressz csökkentéséhez, valamint képesek befolyásolni bizonyos génexpressziós utakat (pl. a nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B), vagy a mitogen-activated protein kinase (MAPK)) mind baktériumokban, mind a gazdaszervezetben (Feng és Wang, 2020; Oelschlager, 2010; Liao és Nyachoti, 2017; Dubreuil, 2017).

## **2.7. *Lactobacillus rhamnosus***

A *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) baktériumfajt először az emberi bélrendszerből izolálták, az egészséges humán mikrobiom egyik alkotója (Gorbach, 1996). A *Lactobacillus* nemzetségbe tartozik, amelynek tagjait már évszázadok óta használják emberekben és állatokban is, mint probiotikus baktériumokat (Markowiak és Śliżewska, 2017). Az egyik legtöbbet tanulmányozott probiotikus hatással rendelkező baktérium, sok humán bélbetegséggel (pl. irritábilis bélszindróma és krónikus hasmenés) kapcsolatban végeztek vele kutatásokat (Yan és Polk, 2006). Patogén hatását nem mutatták ki, és kellőképpen ellenálló a technológiai folyamatokkal szemben, amely ideális probiotikumká teszi (Forestier és mtsai, 2001).

*In vitro* kísérletekben a *L. rhamnosus* számos pozitív hatását bizonyították már. Egér (YAMC) és humán (HT 29) bélhámsejt-tenyészetben a *L. rhamnosus* GG (LGG) törzs megelőzte a bélhámsejtek citokin (TNF, IL-1 $\alpha$  és IFN- $\gamma$ ) okozta apoptózist azáltal, hogy aktiválta az anti-apoptotikus protein kináz B enzimet, és gátolta az apoptotikus p38 szignál transzdukciós jelátviteli utat (Yan és Polk, 2002). Humán bélhámsejt tenyészetben (Caco-2) a *L. rhamnosus* 35-ös sejtvonala (Lcr35) csökkentette az enteropatogén (EPEC) és enterotoxikus (ETEC) *E. coli* és a *Klebsiella pneumoniae* baktériumok tapadását elő-, egyidejű és utókezelés során is, valamint az anyagcseretermékeit tartalmazó oldata gátolta kilenc baktériumfaj, többek közt az ETEC, az EPEC és a *S. Typhimurium* növekedését (Forestier és mtsai, 2001). Két *L. rhamnosus* GG által termelt fehérje, a p40 és a p75 pozitív hatással volt a szoros sejtkapcsolatokra Caco-2 tenyészetben: csökkentették a hidrogén-peroxid okozta TJ-károsodást, és ezáltal a sejtek permeabilitását a protein kináz C és a MAPK jelátviteli utak modulálásával (Seth és mtsai, 2009). Egy kilenc különböző potenciális probiotikus baktériumot vizsgáló kutatásban a *L. rhamnosus* SD11 (LSD11) csökkentette a legnagyobb mértékben a patogén baktériumok (többet közt *E. coli* és különböző *Salmonella* szerotípusok) növekedését, míg a *L. rhamnosus* SD4 (LSD4) mutatta a legnagyobb mértékű adhéziót a bélhámsejtekhez (Pahumunto és mtsai, 2021).

Egy önkéntesekkel végzett humán kísérletben kimutatták, hogy a *L. rhamnosus* serkenti a gyulladásgátló IL-10 termelődését, amely baktériummal fertőzött T-sejtekben hozzájárul az IFN- $\gamma$ , IL-6 és TNF- $\alpha$  gyulladást mediátorok mennyiségének csökkenéséhez (Schultz, 2003). Az LGG takarmánykiegészítőként etetve csökkentette választási utáni malacokban az *E. coli* K88 okozta hasmenéses tüneteket azáltal, hogy módosította a bél mikrobióta összetételét, és befolyásolta a lokális és szisztémás immunválaszt (Zhang és mtsai, 2010).

A *L. rhamnosus* befolyással volt különböző patogének tapadására sertés bélrendszerének különböző szakaszaiból származó nyálkán vizsgálva. Az *L. rhamnosus* és a *Bifidobacterium lactis* Bb12 csökkentette a *S. Typhimurium* ATCC 19028, az *E. coli* K2, a *Clostridium difficile* DSM 1296, valamint a *Clostridium perfringens* DSM 756 törzsek tapadását. Fontos kiemelni, hogy a két probiotikus törzset egymással kombinációban alkalmazva még hatékonyabban sikerült redukálni a nyálkához tapadt patogén baktériumok mennyiségét, mint amikor külön-külön végezték el velük a kezelést (Collado és mtsai, 2007).

### 3. Célkitűzések

Nagyüzemi tartási körülmények között a sertések számos stresszhatásnak és betegségre hajlamosító tényezőnek vannak kitéve, emiatt gyakran fordul elő náluk bakteriális bélfertőzés. Az *Escherichia coli* és *Salmonella enterica* serovar 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 bélhámsejtvonalat használtuk, melynek számos kedvező tulajdonsága lehetővé teszi a baktérium-bélhámsejt interakciók tanulmányozását.

Kutatásunk célja annak felderítése volt, hogy a *Lactobacillus rhamnosus* probiotikus baktérium képes-e protektív hatást kifejteni a bélhámsejtekre *E. coli* és *S. Typhimurium* okozta bélfertőzés esetén. Először meghatároztuk azt a koncentrációt, amelyben a *L. rhamnosus* 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. Végül pedig a *L. rhamnosus* patogénekre kifejtett tapadásgátló hatását tanulmányoztuk.

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

## 4. Anyag és módszer

### 4.1. Az IPEC-J2 sejttenyészetek létrehozása

A kutatásunkhoz felhasznált IPEC-J2, újszülött sertés jejuumából izolált epiteliális 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 főtájis 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 flakóban 37°C-on inkubáltuk, 5% CO<sub>2</sub>-t tartalmazó párásított levegő jelenlétében, és kétnaponta cseréltük rajtuk a tápfolyadékot. 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 sejttenyészet állapotát naponta ellenőriztük fénymikroszkóppal.

### 4.2. Felhasznált baktériumtörzsek és vegyületek

Kutatásunkhoz háromféle baktériumtörzset használtunk. A probiotikumként szolgáló, sertésből izolált *Lactobacillus rhamnosus* DSM 7133 törzset a Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézetből (Mosonmagyaróvár) szereztünk be. Az *E. coli* és a *S. Typhimurium* törzsek fertőzött sertésekből származtak, hazai klinikai mintákból (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* törzset 2009-ben izolálták.

Mindhárom baktériumtörzset Microbank gyöngyökön tároltuk -80 °C-on. A baktérium-szuszpenziók elkészítéséhez a gyöngyöket pDMEM/F12 tápfolyadékban szuszpendáltuk, majd 18-24 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on, egy 5% CO<sub>2</sub>-ből és 95% levegőből álló gázkeverék jelenlétében. Korábbi tanszéki kísérletek során már meghatároztuk, hogy ezek között a körülmények között tenyésztve mindhárom baktériumtörzs 10<sup>8</sup> CFU/ml koncentrációt ér el.



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**

A *L. rhamnosus* 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 sejtenyészethez feleslegben adott Neutral Red lemosása után az élő sejtekben felhalmozódott mennyiség savas-alkoholos extrakcióval szabadítható fel.

Az életképességi vizsgálathoz a *L. rhamnosus*  $10^8$  CFU/ml koncentrációjú kezelőoldatot használtuk. Korábbi kísérleteink során, más probiotikus baktériumtörzseket alkalmazva ez a 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 100-100  $\mu$ l-t adtunk a baktériumot tartalmazó kezelőoldatokból, a kontrollcsoporthoz pedig 100  $\mu$ l pDMEM/F12 tápfolyadékot pipettáztunk, és 24 órán keresztül inkubáltuk a sejtenyészeteiket. Összesen 6 párhuzamos mérést végeztünk. Az inkubációs idő leteltével a kezelőoldatokat fenolvörösmentes tápfolyadéokra cseréltük, majd 100  $\mu$ 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 tenyészeteiket. Ezután 50  $\mu$ l, 50%-ban 96%-os etanolt, 49%-ban desztillált vizet és 1%-ban koncentrált ecetsavat tartalmazó oldatot pipettáztunk a tenyészeteinkre 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.

#### 4.4. Intracelluláris redox állapot vizsgálata

A sejtekben termelődött ROS mennyiségét nem specifikus módon vizsgáltuk diklorofluorescein-diacetát (DCF-DA) segítségével. A DCF-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. colit* és *S. Typhimuriumot* tartalmazó oldatokat  $10^6$  CFU/ml, a *L. rhamnosust* tartalmazót  $10^8$  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 a *L. rhamnosust* tartalmazó tápfolyadékkal kezeltük a sejteket, majd 1 óra inkubációs idő után leszívtuk a probiotikumot tartalmazó oldatot, rátettük az *E. colit* vagy a *S. Typhimuriumot* tartalmazó oldatot, és ismét 1 órán át inkubáltuk a sejteket. Az egyidejű kezelés során egyszerre adtuk a kétféle (*L. rhamnosus* és *E. coli* vagy *S. Typhimurium*) kezelőoldatot a sejtekhez, és 1 órán át inkubáltuk azokat. Az utókezelés során először az *E. colit* vagy a *S. Typhimuriumot* tartalmazó oldatot raktuk a sejtekre, 1 óra inkubációs idő után eltávolítottuk a felülúszót, és ráhelyeztük a sejtekre a *L. rhamnosust* tartalmazó oldatot, ezt ismét 1 óra inkubációs idő követte. A negatív kontrollként szolgáló sejtekhez tápfolyadékot adtunk, a pozitív kontroll sejtekhez pedig csak *E. colit* vagy *S. Typhimuriumot* tartalmazó tápfolyadékot.

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 sejttörmelékot Eppendorf csövekbe pipettáztuk, majd centrifugáltuk, és a felülúszóból 100-100  $\mu$ l-t 96 lyukú sejtenyésztő edényre adagoltunk. Ezt az edényt a fluoreszcencia 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 kezeléskombinációknál csökkent-e a reaktív oxigén származékok mennyisége.

| A kezelés típusa   | A hozzáadott probiotikus baktérium és mennyisége               | A hozzáadott patogén baktérium és mennyisége |
|--|--|--|
| <i>L. rhamnosus</i> + <i>E. coli</i> előkezelés              | <i>L. rhamnosus</i> 10 <sup>8</sup> CFU/ml a patogén előtt     | <i>E. coli</i> 10 <sup>6</sup> CFU/ml        |
| <i>L. rhamnosus</i> + <i>E. coli</i> egyidejű kezelés        | <i>L. rhamnosus</i> 10 <sup>8</sup> CUF/ml a patogénnel együtt | <i>E. coli</i> 10 <sup>6</sup> CFU/ml        |
| <i>L. rhamnosus</i> + <i>E. coli</i> utókezelés              | <i>L. rhamnosus</i> 10 <sup>8</sup> CFU/ml a patogén után      | <i>E. coli</i> 10 <sup>6</sup> CFU/ml        |
| <i>L. rhamnosus</i> + <i>S. Typhimurium</i> előkezelés       | <i>L. rhamnosus</i> 10 <sup>8</sup> CFU/ml a patogén előtt     | <i>S. Typhimurium</i> 10 <sup>6</sup> CFU/ml |
| <i>L. rhamnosus</i> + <i>S. Typhimurium</i> egyidejű kezelés | <i>L. rhamnosus</i> 10 <sup>8</sup> CFU/ml a patogénnel együtt | <i>S. Typhimurium</i> 10 <sup>6</sup> CFU/ml |
| <i>L. rhamnosus</i> + <i>S. Typhimurium</i> utókezelés       | <i>L. rhamnosus</i> 10 <sup>8</sup> CFU/ml a patogén után      | <i>S. Typhimurium</i> 10 <sup>6</sup> CFU/ml |

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

#### 4.4. A bélhámsejtek paracelluláris permeabilitásának vizsgálata

A barrier funkció sérülésének mértékét FITC-D (fluorescein 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 vizsgálathoz hasonlóan zajlott, mindig apikális irányból. Szintén apikálisan adtuk a sejtekhez az FD-4 (fluorescein izotiocianát-dextrán, 4 kDa) fluoreszcens jelölőmolekulát tartalmazó, fenolvörös-mentes, pDMEM tápfolyadékot. Az FD-4 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 a *L. rhamnosus* mennyire képes megelőzni vagy gátolni. A bazolaterális folyadékából 24 óra elteltével mintát vettünk, és fluoreszcens spektrofotométerrel detektáltuk az FD-4 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).

#### **4.5. A tapadás gátlásának vizsgálata**

Ennek a kísérletnek az első felében ugyanúgy jártunk el, mint az intracelluláris redox állapot vizsgálatánál, azzal a kivétellel, hogy a sejteket 24 lyukú plate-eken szaporítottuk el. Ugyanúgy alkalmaztunk pozitív (*E. coli* és *S. Typhimurium*) és negatív kontrollt, valamint *L. rhamnosus* elő-, egyidejű és utókezelést. Az inkubációs idő után eltávolítottuk a felülúszót, és a sejtekre Triton X-100 felületaktív anyag 1%-os oldatát pipettáztuk, majd 30 percig körkörös irányban rázattuk őket, így a sejtek megszűntek kapcsolódni egymáshoz és az aljzathoz. Ezekből a sejtuszpenziókból 96 lyukú tenyésztőedényen hígítási sort készítettünk, tömény,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  és  $10^5$ -szörös hígításokat kapva. Mindegyik hígításból kikentünk 50-50  $\mu\text{l}$ -t agart tartalmazó Petri-csészékre. Ezeket 24 órán át inkubáltuk, majd megszámloltuk a baktériumtelepeket.

#### **4.6. Statisztikai számítások**

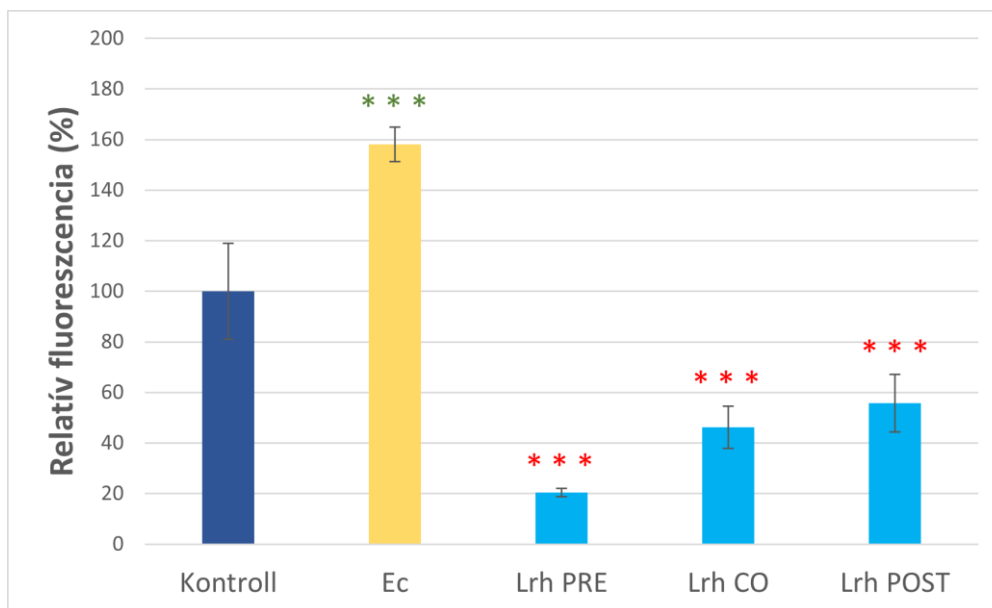
A statisztikai számításokat R 3.3.2 (2016) programmal végeztük el. A torzító pontok kizárására, valamint a reziduumok normál eloszlásának megállapítására diagnosztikai analízist használtunk. A csoportátlagok összevetésére egytényezős varianciaanalízist (ANOVA) végeztünk. A csoportok közötti eltérések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

## 5. Eredmények

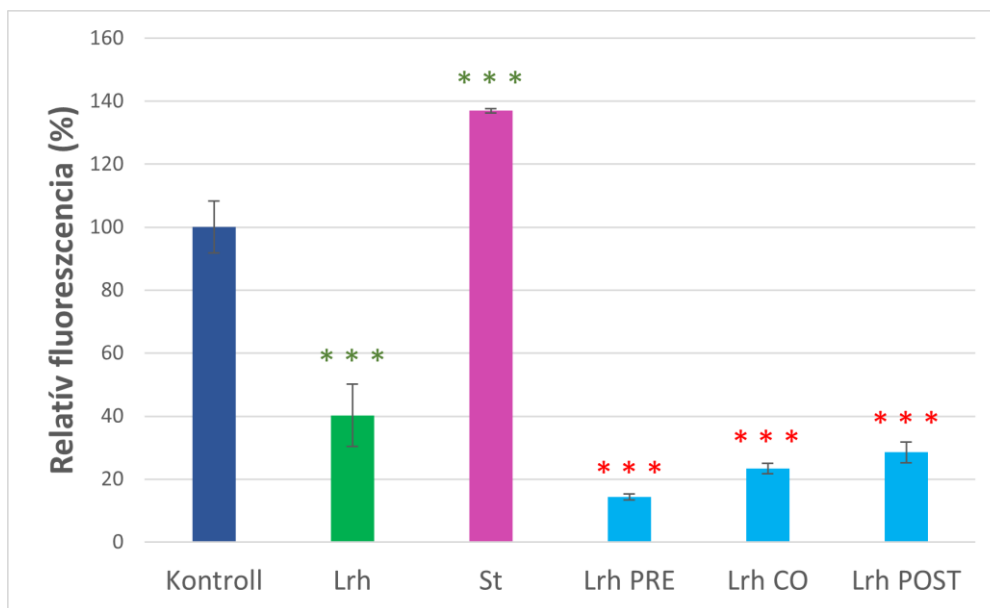
### 5.1. A *L. rhamnosus* hatása az intracelluláris ROS mennyiségére

A Neutral Red próba során kapott abszorbancia értékek összehasonlításával megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált  $10^8$  CFU/ml koncentrációjú *L. rhamnosus* kezelőoldat nem csökkentette az IPEC-J2 sejtek életképességét a 24 órás inkubálást követően a kontroll sejtekhez képest. A fenti eredmény alapján a *L. rhamnosus* a vizsgált koncentrációban és ideig biztonságosan alkalmazható kísérleteinkben.

Az IPEC-J2 bélhámsejtekben a reaktív oxigén származékok mennyisége az *E. coli* (3. ábra, a) és *S. Typhimurium* (3. ábra, b) kezelések hatására szignifikánsan megnőtt a kontrollcsoporthoz viszonyítva. A *L. rhamnosus* előkezelés következtében a ROS mennyiség jelentősen csökkent a bélhámsejtekben mind az *E. coli*, mind a *S. Typhimurium*nak kitett sejtekben, és hasonló eredményt kaptunk akkor is, amikor egyidejű és utókezelést alkalmaztunk. Az egyidejű és az utókezelés hatékonysága között nem volt szignifikáns különbség kimutatható ( $p=0,749$ ), az előkezelés azonban jelentősen hatékonyabbnak bizonyult, mind az egyidejű ( $p=0,0162$ ), mind az utókezelésnél ( $p=0,0005$ ) az *E. coli* által kiváltott oxidatív stressz csökkentésében (3. ábra, a). A *S. Typhimurium* kezelés következtében megemelkedett ROS szint csökkentésében nem volt különbség a háromféle probiotikum kezelés hatékonysága között (3. ábra, b). A *L. rhamnosus* önmagában alkalmazva a ROS mennyiség csökkenését eredményezte a kontrollhoz képest (3. ábra, b).



3. ábra, a: az *E. coli* és *L.rhamnosus* intracelluláris ROS szintre gyakorolt hatása



3. ábra, b: a *S. Typhimurium* és *L. rhamnosus* intracelluláris ROS szintre gyakorolt hatása

\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ,  $n=6$

Ec: *E. coli*  $10^6$  CFU/ml koncentrációban

St: *S. Typhimurium*  $10^6$  CFU/ml koncentrációban

Lrh: *L. rhamnosus*  $10^8$  CFU/ml koncentrációban

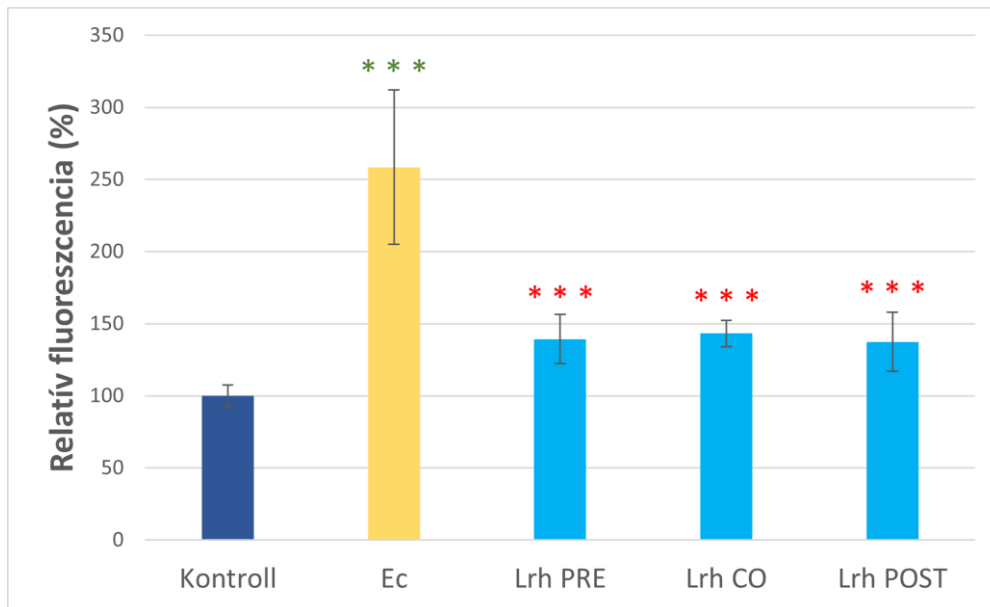
Lrh PRE: *L. rhamnosus*  $10^8$  CFU/ml, utána *E. coli*/*S. Typhimurium*  $10^6$  CFU/ml koncentrációban

Lrh CO: *L. rhamnosus*  $10^8$  és *E. coli*/*S. Typhimurium*  $10^6$  CFU/ml koncentrációban

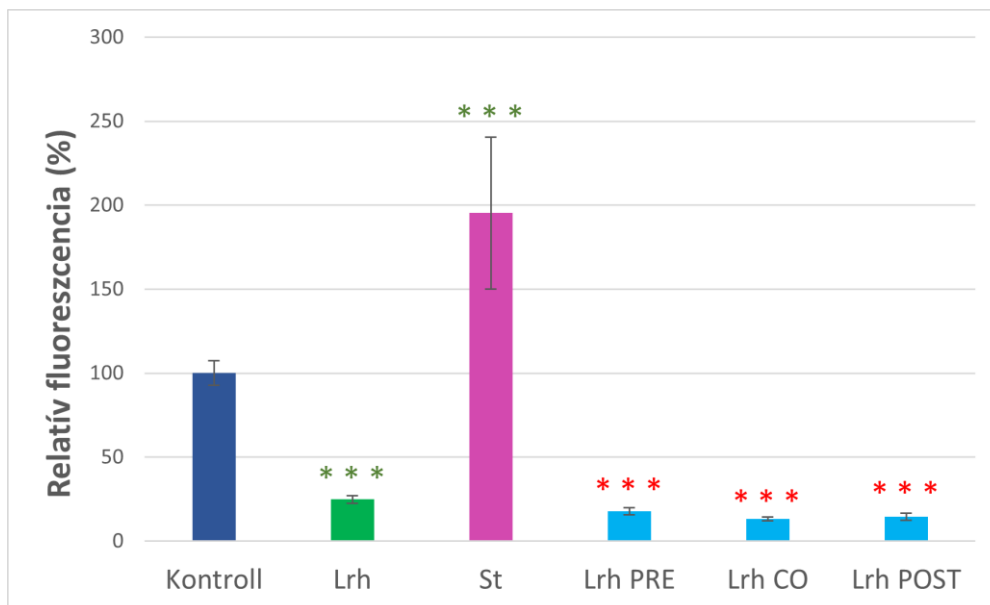
Lrh POST: *E. coli*/*S. Typhimurium*  $10^6$  CFU/ml, utána *L. rhamnosus*  $10^8$  CFU/ml koncentrációban

## 5.2. A *L. rhamnosus* hatása a bélhámsejtek paracelluláris permeabilitására

Mind az *E. coli* (4. ábra, a), mind a *S. Typhimurium* (4. ábra, b) kezelés jelentősen növelte a bélhámsejtek permeabilitását a kontrollcsoportéhoz képest. Ezt a megnövekedett paracelluláris permeabilitás értéket mindkét patogénnek kitett enterocitákban sikerült csökkenteni a *L. rhamnosus* probiotikus baktérium alkalmazásával. Hatékonyságukat tekintve nem volt jelentős különbség a különböző kezeléstípusok (elő-, egyidejű- illetve utókezelés) között.



4. ábra, a: az *E. coli* és *L. rhamnosus* bélhám permeabilitásra gyakorolt hatása



4. ábra, b: a *S. Typhimurium* és *L. rhamnosus* bélhám permeabilitásra gyakorolt hatása

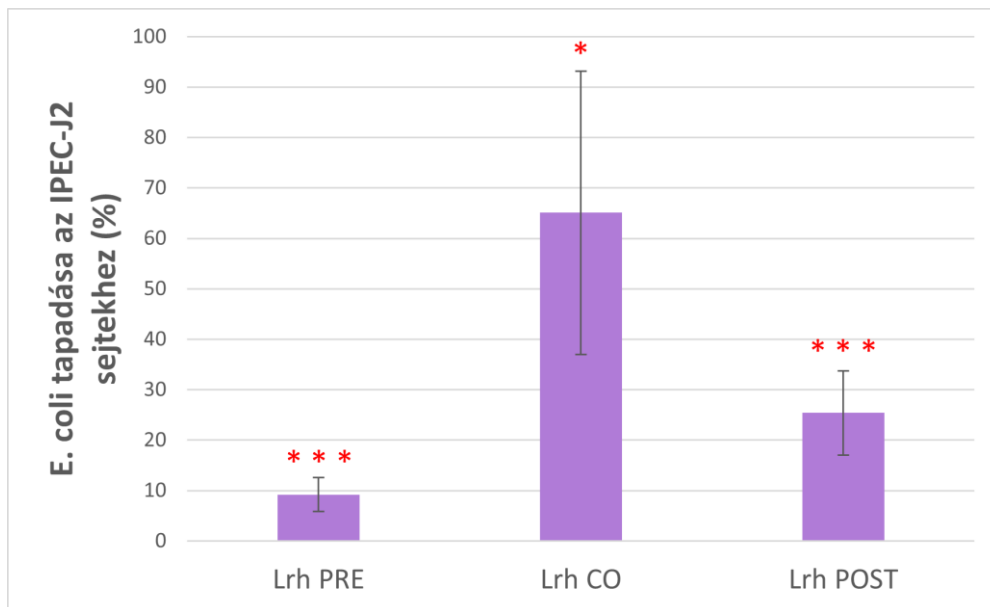
\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ,  $n=6$

Ec: *E. coli*  $10^6$  CFU/ml koncentrációban

St: *S. Typhimurium* 10<sup>6</sup> CFU/ml koncentrációban  
 Lrh: *L. rhamnosus* 10<sup>8</sup> CFU/ml koncentrációban  
 Lrh PRE: *L. rhamnosus* 10<sup>8</sup> CFU/ml, utána *E. coli*/*S. Typhimurium* 10<sup>6</sup> CFU/ml koncentrációban  
 Lrh CO: *L. rhamnosus* 10<sup>8</sup> és *E. coli*/*S. Typhimurium* 10<sup>6</sup> CFU/ml koncentrációban  
 Lrh POST: *E. coli*/*S. Typhimurium* 10<sup>6</sup> CFU/ml, utána *L. rhamnosus* 10<sup>8</sup> CFU/ml koncentrációban

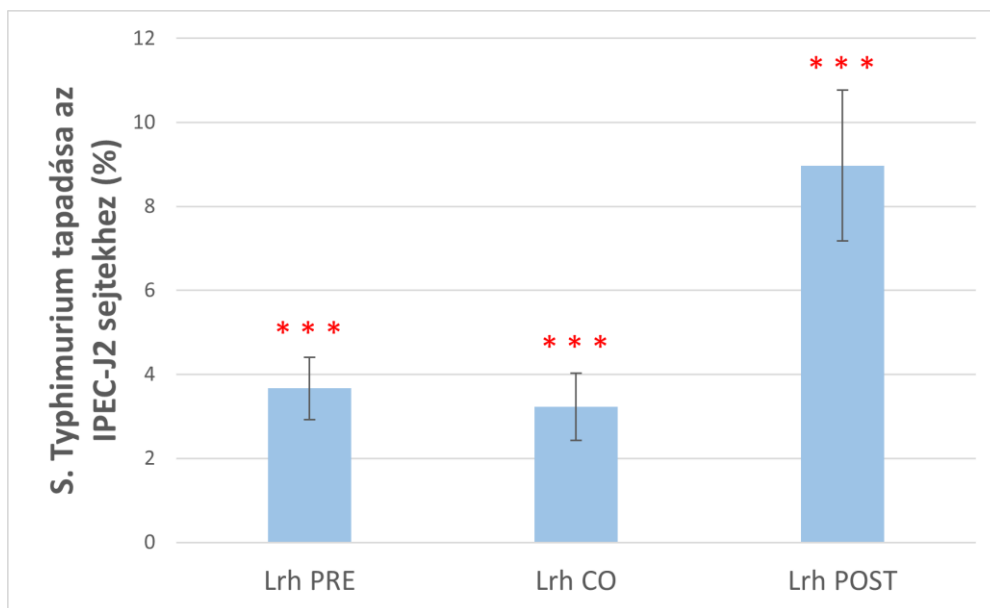
### 5.3. A *L. rhamnosus* tapadásgátló hatása

A tapadásos vizsgálatok esetén a patogénnel való kezelésben részesülő minták felületére tapadt és azokból származó *E. coli* (5. ábra, a) illetve *S. Typhimurium* (5. ábra, b) telepek számát tekintettük 100%-nak, és ehhez képest határoztuk meg a *L. rhamnosus* elő- egyidejű, illetve utókezelésben részesülő mintákból származó telepek számát. Megállapíthatjuk, hogy mindkét patogénnek kitett sejtekben jelentősen csökkent a *L. rhamnosus* inkubáció hatására az enterocitákhoz tapadt baktériumok mennyisége. Az *E. coli*val történő kezelésnél az elő- és az utókezelés során szignifikánsan hatékonyabbnak bizonyult az egyidejű kezelésnél. A *S. Typhimurium*mal történő kezelés esetében az elő- és egyidejű kezelésnek köszönhetően csökkent a legnagyobb mértékben patogén baktériumok IPEC-J2 sejtekhez való tapadása.



5. ábra, a: *E. coli* tapadása az IPEC-J2 sejtekhez elő-, egyidejű és utókezelés során





5. ábra, b: *S. Typhimurium* tapadása az IPEC-J2 sejtekhez elő-, egyidejű és utókezelés során

\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ,  $n=4$

Lrh PRE: *L. rhamnosus*  $10^8$  CFU/ml, utána *E. coli/S. Typhimurium*  $10^6$  CFU/ml koncentrációban

Lrh CO: *L. rhamnosus*  $10^8$  és *E. coli/S. Typhimurium*  $10^6$  CFU/ml koncentrációban

Lrh POST: *E.coli/S. Typhimurium*  $10^6$  CFU/ml, utána *L. rhamnosus*  $10^8$  CFU/ml koncentrációban

## 6. Megbeszélés

Az *E. coli* és a *S. Typhimurium* törzsek által okozott emésztőrendszeri megbetegedések jelentős gazdasági veszteséget okozhatnak a sertéságazatnak, és az emberi egészségre is veszélyt jelenthetnek. Mindkét baktérium zoonózis kórokozó, az élelmiszerlánc által közvetítve bekerülhetnek a serteshúsból készült termékekbe, továbbá jelenlétük hozzájárulhat az antibiotikum-rezisztencia terjedéséhez is (Dubreuil, 2017). Ezek a baktériumok többféle mechanizmuson keresztül károsíthatják a sertés béltraktusát, és okozhatnak emésztőrendszeri megbetegedéseket. A betegségek kialakulásához vezető mechanizmusok között jelentős szerepe van a patogének bélhámsejtekhez való tapadásának, a baktériumok által kiváltott oxidatív stressznek, és a bél barrier funkciójának károsításának.

Annak pontos mechanizmusa, hogy az *E. coli* és a *S. Typhimurium* hogyan fejtik ki oxidatív stresszt kiváltó hatásukat, nem teljesen tisztázott, de a kórokozók oxigént termelhetnek, hogy aerob környezetet hozzanak létre, és így oxidatív stresszkörülményeket hozzanak létre a bélben (Wang, J és mtsai, 2021). A *L. rhamnosus* elő-egyidejű, illetve utókezelés antioxidáns hatásának igazolására meghatároztuk a bélhámsejtekben termelődő ROS mennyiséget. Az *E. coli* és a *S. Typhimurium* az intracelluláris ROS mennyiségének növekedését váltotta kis az IPEC-J2 sejtekben. A  $10^8$  CFU/ml mennyiségben *L. rhamnosussal* végzett elő-, egyidejű- és utókezelés jelentősen csökkentette az *E. coli* és az *S. Typhimurium* által indukált ROS-termelődést. Ez az eredmény azt jelzi, hogy a *L. rhamnosus* képes enyhíteni az *E. coli* és a *S. Typhimurium* által okozott oxidatív stresszt. Eredményeinkkel összhangban, egyes probiotikumokról kimutatták, hogy mérséklék ROS termelést, pl. *L. plantarum* ZLP001-gyel történő előkezelés csökkentette a hidrogén-peroxid által okozott oxidatív stresszt IPEC-J2 sejtekben (Wang és mtsai, 2021). Az *Enterococcus faecium*, valamint a *Bacillus licheniformis* és *Bacillus subtilis*, sertésből származó probiotikus baktériumtörzsek alkalmazása sikeresen járult hozzá a ROS mennyiségének csökkentéséhez sertés bélhámsejteken végzett *in vitro* kísérletekben (Pézsai és mtsai, 2022a; Pézsai és mtsai, 2022b).

A probiotikumok egyik hatásmódja lehet a bélbarrier erősítése (Yang és mtsai, 2015). Kísérleteinkben a *L. rhamnosus* önmagában is jelentős hatással volt a bazolaterális kompartmentben mért fluoreszcens festék mennyiségére. Egyes irodalmi adatok szerint a probiotikumok alkalmazása önmagában nem befolyásolja az epiteliális barrier integritását és permeabilitását (Sherman és mtsai, 2005; Czerucka és mtsai, 2000), míg más *in vitro* vizsgálatok azonban azt mutatták, hogy a probiotikus baktériumok alkalmazása önmagában is fokozhatja a barrierfunkciót (Ewaschuk és mtsai, 2008; Otte és Podolsky, 2008; Resta-Lenert

és Barret, 2003). A Gyógyszertani és Méregtani Tanszéken korábban, más probiotikus baktériumtörzsekkel végzett kísérletek eredményei is különböztek egymástól; míg sertésből izolált *Bacillus subtilis* kezelés (Pézsai és mtsai, 2022b) az IPEC-J2 sejtek átteresztőképességének növekedését eredményezte, addig a szintén sertés emésztőcsatornájából származó *Enterococcus faecium* jelenléte a paracelluláris permeabilitás csökkenését eredményezte a sertés eredetű bélhámsejteken, mind *E. coli*, mind pedig *S. Typhimurium* kezelést követően (Pézsai és mtsai, 2022a). A *L. rhamnosus*sal kapott eredményeink ez utóbbiakkal állnak összhangban. Az *E. coli* vagy *S. Typhimurium* jelenléte a bazolaterális kompartmentben mért FD-4 festék mennyiségének jelentős növekedését eredményezte, ami azt jelzi, hogy ezek a patogének növelték a bélhámréteg permeabilitását. A barriert károsító mechanizmusok hátterében feltételezhető a Gram-negatív baktériumok lipopoliszacharidjának, illetve egyes bakteriális metabolitok szerepe (Lodemann és mtsai, 2015). Eredményeink azt mutatják, hogy a *L. rhamnosus*sal történő kezelés képes ellensúlyozni az *E. coli*, illetve a *S. Typhimurium* által indukált barrierkárosodást. Az elő-, egyidejű-, illetve utókezelés hatékonysága között nem tapasztaltunk különbséget.

A kórokozók adhéziójának gátlása az egyik legfontosabb tulajdonsága annak, hogy a probiotikumok hogyan fejthetik ki jótékony hatásukat. A különböző probiotikus törzsek patogén adhéziót gátló képességét széles körben vizsgálták (Wang és mtsai, 2018; Jin és mtsai, 2000). Eredményeink megerősítik, hogy a *L. rhamnosus* képes gátolni az *E. coli* és a *S. Typhimurium* adhézióját. A *L. rhamnosus* tapadásgátló hatása és a kezelés módja között nem lehet egyértelmű kapcsolatot megállapítani. Az a tény, hogy az utókezelés is képes volt gátolni mind az *E. coli*, mind a *S. Typhimurium* adhézióját, azt jelezheti, hogy a *L. rhamnosus* képes volt megzavarni a kialakult kórokozó kolonizációt. Korábbi tanszéki kísérleteinkkel összehasonlítva eredményeinket megállapítható, hogy nem minden probiotikus baktériumtörzs képes az *E. coli*, illetve az *S. Typhimurium* tapadását *in vitro* körülmények közt megakadályozni IPEC-J2 sejteken: az *Enterococcus faecium* és a *Bacillus licheniformis* mindkét patogén esetében jelentősen csökkentette a bélhámsejtekhez történő adhéziót, míg a *Bacillus subtilis* csak az *E. coli* tapadására bírt befolyással (Pézsai és mtsai, 2022a; Pézsai és mtsai, 2022b).

Összegzésképpen elmondhatjuk, hogy a *L. rhamnosus* kezelés kedvező hatást gyakorolt az IPEC-J2 sejtekre. A probiotikus baktérium jelenléte csökkentette az *E. coli*, illetve *S. Typhimurium* által kiváltott oxidatív stresszt, részt vett a patogének okozta bélbarrier károsodás helyreállításában, illetve megakadályozta azok adhézióját a bélhámsejtekhez. Ezen eredmények

alapján a *L. rhamnosus* ígéretes takarmánykiegészítő jelölt lehet sertések számára olyan célból, hogy erősítse a gyomor-bélrendszer egészségét, ezáltal közvetetten hozzájáruljon az antibiotikum felhasználás csökkentéséhez. A jövőben további *in vitro* (pl. gyulladásos citokinek szintjének meghatározása, TJ fehérjék vizsgálata) és *in vivo* kísérletek szükségesek a fenti eredmények megerősítésére. A kísérleti modellt érdemes olyan irányban továbbfejleszteni, hogy egyidőben egyszerre több probiotikus törzs bélhámsejtekre gyakorolt hatása is lehetővé váljon.

## 7. Összefoglalás

Nagyüzemi körülmények között tartott sertésekben a zsúfoltság és az intenzív technológia okozta stressz miatt gyakori az *Escherichia coli* (*E. coli*) és *Salmonella Typhimurium* (*S. Typhimurium*) okozta bélfertőzés. A patogének által kiváltott oxidatív stressz és a bél barrier funkciójának károsodása a termelés csökkenéshez és klinikai tünetek kialakulásához vagy akár elhulláshoz is vezethet. Hosszú évtizedekig ennek megelőzésére és hozamfokozásra rutinszerűen alkalmaztak antibiotikumokat, és ez a gyakorlat is hozzájárult a manapság egyre nagyobb mértékeket öltő antimikrobiális rezisztenciához. Az Európai Unió ma már szigorúan szabályozza az antibiotikumok állatgyógyászati felhasználását. Felmerült tehát az igény olyan alternatív szerek és táplálékkiegészítők iránt, amelyek nem járulnak hozzá a rezisztencia növekedéséhez, ugyanakkor képesek pozitív hatást kifejteni az állatok egészségére és termelőképességére, és segítenek megőrizni a béltraktus egészséges barrier funkcióját.

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. Kísérletünkben a *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) probiotikus baktérium IPEC-J2 sertés eredetű bélhámsejteken kifejtett védőhatását vizsgáltuk a patogén *E. coli* és *S. Typhimurium* baktériumokkal szemben.

Először Neutral Red próbával meghatároztuk, hogy a *L. rhamnosus*  $10^8$  CFU/ml koncentrációban alkalmazva nem befolyásolja az IPEC-J2 sejtek életképességét, további kísérleteinkben ezt a koncentrációt alkalmaztuk. Ezután a sejtek intracelluláris redox állapotát vizsgáltuk DCFH-DA próbával, melynek során három különböző kezelést alkalmazva (elő-, egyidejű és utókezelés) adtuk hozzá a sejtekhez az *L. rhamnosust*, valamint a patogén baktériumokat. FITC-D fluoreszcens próbát alkalmazva teszteltük a probiotikus törzs hatását a bélhámsejtek paracelluláris permeabilitására. Végül pedig azt vizsgáltuk, hogy a *L. rhamnosus* milyen mértékben akadályozza meg a patogén baktériumok tapadását az IPEC-J2 bélhámsejtekhez.

Kutatásunk eredményei azt bizonyítják, hogy a *L. rhamnosus* jelentősen csökkenti a sertés-bélhámsejtekben az *E. coli*, illetve *S. Typhimurium* által kiváltott oxidatív stresszt, képes megelőzni a barrier funkció károsodását és gátolja a patogén baktériumok adhézióját. További *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok szükségesek a *L. rhamnosus* pozitív hatásának hátterében álló folyamatok felderítésére.

## 8. Summary

Intestinal infections caused by *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) are common in pigs kept in large-scale production due to crowding and stress caused by intensive technology. The oxidative stress and impairment of the intestinal barrier function caused by pathogens can lead to reduced production and the development of clinical signs or even death. For many decades, antibiotics were routinely used to prevent these diseases and for growth promotion, and this practice has contributed to the increasing antimicrobial resistance. Nowadays, the European Union strictly regulates the use of antibiotics in veterinary medicine. The need has therefore arisen for alternative agents and nutritional supplements that do not contribute to increased resistance but can have a positive effect on animal health and productivity and help to maintain healthy intestinal barrier function.

Probiotics have been used in veterinary medicine for a long time, but in many cases the exact mechanism of action responsible for their positive effects and the extent of their efficacy are not yet fully understood. In our experiment, we investigated the protective effect of the probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) in IPEC-J2 porcine intestinal epithelial cells against pathogenic *E. coli* and *S. Typhimurium* bacteria.

First, by using Neutral Red assay we determined that *L. rhamnosus* at a concentration of  $10^8$  CFU/mL did not affect the viability of IPEC-J2 cells and used this concentration in further experiments. Next, the intracellular redox state of the cells was investigated by DCFH-DA assay, where *L. rhamnosus* and pathogenic bacteria were added to the cells using three different treatment types (pre-, parallel, and post-treatment). The effect of the probiotic strain on the paracellular permeability of intestinal epithelial cells was tested using the FITC-D fluorescence dye. Finally, preventive effect of *L. rhamnosus* on the adhesion of pathogenic bacteria to IPEC-J2 intestinal epithelial cells was tested.

The results of our study demonstrate that *L. rhamnosus* significantly reduces the oxidative stress induced by *E. coli* and *S. Typhimurium* in porcine intestinal epithelial cells. It could prevent barrier function damage and inhibits the adhesion of pathogenic bacteria. Further *in vitro* and *in vivo* studies are needed to elucidate the processes underlying the positive effect of *L. rhamnosus*.

## 9. Irodalomjegyzék

ARRIETA M. C., BISTRITZ L., MEDDINGS J. B., 2006: Alterations in intestinal permeability. *Gut*, 55: 1512-1520.

ASMAR R. E., PANIGRAHI P., BAMFORD P., BERTI I., NOT T., COPPA G. V., 2002: Host-dependent zonulin secretion causes the impairment of the small intestine barrier function after bacterial exposure. *Gastroenterology*, 123: 1607-1615.

BAO H., KOMMADATH A., LIANG G., SUN X., ARANTES A. S., TUGGLE C. K., BEARSON S. M. D., PLASTOW G. S., STOTHARD P., GUAN L. L., 2015: Genome-wide whole blood microRNAome and transcriptome analyses reveal miRNA-mRNA regulated host response to foodborne pathogen *Salmonella* infection in swine. *Scientific Reports*, 5: 12620.

BHATTACHARYYA A., CHATTOPADHYAY R., MITRA S., CROWE S. E., 2014: Oxidative stress: An essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiological Reviews*, 94 (2): 329-354.

BHUNIA A., 2008: Mechanisms and pathogenesis. *Foodborne Microbial Pathogens*, Springer New York, pp. 276.

BRIEGER K., SCHIAVONE S., MILLER F. J. Jr., KRAUSE K., 2012: Reactive oxygen species: From health to disease. *Swiss Med Wkly*, 142: 136-159

BROWN K., UWIERA R. R. E., KALMOKOFF M. L., BROOKS S. P. J., INGLIS G. D., 2017: Antimicrobial growth promoter use in livestock: a requirement to understand their modes of action to develop effective alternatives. *Int J Antimicrob Agents*, 49 (1): 12-24.

CARLSON S. A., BARNHILL A. E., GRIFFITH R. W., 2012: Salmonellosis. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, editors. *Diseases of swine*. Chichester: Wiley-Blackwell, 10: 821–33.

CENCIČ A., LANGERHOLC T., 2010: Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology – A review. *International Journal of Food Microbiology*, 141: 4-14.

CHATTOPADHYAY M. K., 2014: Use of antibiotics as feed additives: a burning question. *Front Microbiol*, 5: 334.

COLLADO M. C., GRZESKOWIAK Ł., SALMINEN S., 2007: Probiotic Strains and Their Combination Inhibit In Vitro Adhesion of Pathogens to Pig Intestinal Mucosa. *Curr Microbiol*, 55: 260-265.

CROXEN M. A., LAW R. J., SCHOLZ R., KEENEY K. M., WLODARSKA M., FINLAY B. B., 2013: Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26: 822-880.

CZERUCKA D., DAHAN S., MOGRABI B., ROSSI B., RAMPAL P., 2000: *Saccharomyces boulardii* preserves the barrier function and modulates the signal transduction pathway induced in enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. *Infect Immun*, 68: 5998-6004.

DAENEN K., ANDRIES A., MEKAHLI D., VAN SCHEPDAEL A., JOURET F., BAMMENS B., 2019: Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*, 34: 975-991.

DUBREUIL J. D., 2017: Enterotoxigenic *Escherichia coli* and probiotics in swine: What the bleep do we know? *Biosci Microbiota Food Health*, 36: 75-90.

European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, 2020: The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic an indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. *EFSA J*, 18 (3): (06007).

EWASCHUK J. B., DIAZ H., MEDDINGS L., DIEDERICHS B., DMYTRASH A., BACKER J., MADSEN K. L., 2008: Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol*, 295: 1025-1034.

FAIRBROTHER J. M., GYLES C. L., 2012: Colibacillosis. In Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, editors. *Disease of Swine*, 10: 723-747.

FAO, 2016: Probiotics in animal nutrition – Production, impact and regulation. *FAO Animal Production and Health Paper*, 179.

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.

FENG T., WANG J., 2020: Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review. *Gut Microbes*, 12: 1801944.

FORESTIER C., DE CHAMPS C., VATOUX C., JOLY B., 2001: Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res Microbiol*, 152: 167-173.

GAGGIA F., MATTARELLI P., BIAVATI B., 2010: Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 141: 15-28.

GAO L., TAN Y., ZHANG X., HU J., MIAO Z., WEI L., CHAI T., 2015: Emissions of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum  $\beta$ -lactamase resistance from pig farms to the surrounding environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12: 4203-4213.



- GILL H. S., 2003: Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17 (5): 755-773.
- GORBACH S. L., 1996: The discovery of *Lactobacillus GG*. *Nutr Today*, 31: 2-4.
- GUERRA ORDAZ A. A., 2013: Prebiotic and probiotic strategies in the prevention and control of post-weaning colibacillosis in piglets (pdf) URL: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/116192/aago1de1.pdf> Megtekintve: 2022.10.13.
- HAN X., YAO W. F., LIU Z. P., LI H. B., ZHANG Z. J., HEI Z. Q., XIA Z. Y., 2016: Lipoxin A4 preconditioning attenuates intestinal ischemia reperfusion injury through keap1/Nrf2 pathway in a lipoxin A4 receptor independent manner. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 12.
- HAO H., CHENG G., IQBAL Z., AI X., HUSSAIN H. I., HUANG L., 2014: Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. *Front Microbiol*, 5: 288.
- HAO Y., XING M., GU X., 2021: Research progress on oxidative stress and its nutritional regulation strategies in pigs. *Animals*, 11: 1384.
- HARTSOCK A., NELSON W. J., 2008: Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta – Biomembr.*, 1778: 660-669.
- HERNANDO-AMADO S., COQUE T. M., BAQUERO F., MARTÍNEZ J. L., 2019: Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nat Microbiol*, 4: 1432-1442.
- HOOPER L. V., MIDTVEDT T., GORDON J. I., 2002: How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition*, 22: 283-307.
- JACOBSEN S. M., STICKLER D. J., MOBLEY H. L. T., SHIRTLIFF M. E., 2008: Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *proteus mirabilis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 21: 26-59.
- JIN L. Z., MARQUARDT R. R., ZHAO X., 2000: A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. *Appl Environ Microbiol*, 66: 4200-4204.
- KAHN L. H., 2017: Antimicrobial resistance: a one health perspective. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg*, 111 (6): 255-260.
- KALITA A., HU J., TORRES A. G., 2014: Recent advances in adherence and invasion of pathogenic *Escherichia coli*. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 27: 459-464.

- KIRCHHELLE C., 2018: Pharming animals: a global history of antibiotics in food production. *Palgrave Commun*, 4 (1): 96.
- LIAO S. F., NYACHOTI M., 2017: Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. *Anim Nutr*, 3: 331-343.
- LILLY D. M., STILLWELL R. H., 1965: Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147 (3659): 747-748.
- LODEMANN U., STRAHLENDORF J., SCHIERACK P., KLINGSPOR S., ASCHENBACH J. R., MARTENS H., 2015: Effects of the probiotic *Enterococcus faecium* and pathogenic *Escherichia coli* strains in a pig and human epithelial intestinal cell model. *Scientifica*, 235184.
- MARKOWIAK P., ŚLIŻEWSKA K., 2017: Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9: 1–30.
- MARKOWIAK P., ŚLIŻEWSKA K., 2018: The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathog*, 10: 21.
- MARSHALL B. M., LEVY S. B., 2011: Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin Microbiol Rev*, 24 (4): 718-733.
- MARTELLI P., 2013: Tabelle diagnosi differenziale. In: Martelli P, editor. “Le patologie del maiale”. Point Veterinaire Italie Editor, pp. 2–5.
- MAZMANIAN S. K., ROUND J. L., KASPER D., 2008: A microbial symbiosis factor prevents inflammatory disease. *Nature*, 453: 620-625.
- MILLER D. M., BUETTNER G. R., AUST S. D., 1990: Transition metals as catalysis of “autoxidation” reactions. *Free Radic Biol Med*, 8: 95-108.
- MILLS E., BARUCH K., CHARPENTIER X., KOBI S., ROSENSHINE I., 2008: Real-time analysis of effector translocation by the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Host & Microbe*, 3: 104-113.
- MULLIN J. M., VALENZANO M. C., VERRECCHIO J. J., KOTHARI R., 2002: Age- and diet-related increase in transepithelial colon permeability of Fischer 344 rats. *Dig Dis Sci*, 47: 2262-2270.
- NATIVIDAD J. M. M., VERDU E. F., 2013: Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: Pathological and therapeutic implications. *Pharmacological Research*, 69: 42-51.
- NEGRATE G. L., FAUSTIN B., WELSH K., LOEFFLER M., KRAJEWSKA M., HASEGAWA P., MUKHERJEE S., ORTH K., KRAJEWSKI S., GODZIK A., GUINEY D. G., REED J. C., 2008:

Salmonella secreted factor L deubiquitinase of Salmonella typhimurium inhibits NF- $\kappa$ B, suppresses I $\kappa$ B $\alpha$  ubiquitination and modulates innate immune responses. *The Journal of Immunology*, 180: 5045-5056.

OELSCHLAGER T. A., 2010: Mechanisms of probiotic actions – A review. *Int J Med Microbiol*, 300: 57-62.

OTTE J.-M., PODOLSKY D. K., 2004: Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 286: 613-626.

PAHUMUNTO N., DAHLEN G., TEANPAISAN R., 2021: Evaluation of Potential Probiotic Properties of Lactobacillus and Bacillus Strains Derived from Various Sources for Their Potential Use in Swine Feeding. URL: <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09861> Megtekintés: 2022.10.10.

PÉZSA PALKOVICSNÉ N., KOVÁCS D., GÁLFI P., RÁCZ B., FARKAS O., 2022a: Effect of Enterococcus faecium NCIMB 10415 on Gut Barrier Function, Internal Redox State, Proinflammatory Response and Pathogen Inhibition Properties in Porcine Intestinal Epithelial Cells. *Nutrients*, 14: 7.

PÉZSA PALKOVICSNÉ N., KOVÁCS D., RÁCZ B., FARKAS O., 2022b: Effects of Bacillus licheniformis and Bacillus subtilis on Gut Barrier Function, Proinflammatory Response, ROS Production and Pathogen Inhibition Properties in IPEC-J2-Escherichia coli/Salmonella Typhimurium Co-Culture. *Microorganisms*, 10 (5): 936.

PLUSKE J. R., TURPIN D. L., KIM J.-C., 2018: Gastrointestinal tract (gut) health in the young pig. *Animal Nutrition*, 4: 187-196.

RAHMAN M. M., MCFADDEN G., 2011: Modulation of NF- $\kappa$ B signalling by microbial pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 9: 291-306.

RESTA-LENERT S., BARRETT K. E., 2003: Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive Escherichia coli (EIEC). *Gut*, 52: 988-997.

RUSSELL W. M. S., BURCH R. L., 1959: Principles of Humane Experimental Technique.

SAKARYA S., GÖKTÜRK C., ÖZTÜRK T., ETRUGRUL M., B., 2010: Sialic acid is required for nonspecific adherence of Salmonella enterica ssp. enterica serovar Typhi on Caco-2 cells. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 58: 330-335.

SALMINEN S., ISOLAURI E., SALMINEN E., 1996: Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 347-358.

SANDER G. R., CUMMINS A. G., POWELL B. C., 2005: Rapid disruption of intestinal barrier function by glandin involves altered expression of apical junctional proteins. *FEBS Lett*, 579: 4851-4855.

- SANSONETTI P. J., 2004: War and peace at mucosal surfaces. *Nature Reviews Immunology*, 4: 953-964.
- 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. *Histochem Cell Biol*, 125: 293-305.
- SCHULTZ M., LINDE H. J., LEHN N., 2003: Immunomodulatory consequences of oral administration of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in healthy volunteers. *J Dairy Res*, 70 (2): 165–173.
- SETH A., YAN F., POLK D. B., RAO R. K., 2009: Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294 (4): 1060-1069.
- SHERMAN P. M., JOHNSON-HENRY K. C., YEUNG H. P., NGO P. S., GOULET J., TOMPKINS T. A., 2005: Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7- and enteropathogenic *E. coli* O127: H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infect Immun*, 73: 5183-5188.
- SIES H., BERNDT C., JONES D. P., 2017: Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem*, 86: 715-748.
- SIES, H., 1985: Oxidative Stress: Introductory Remarks. *Oxidative Stress*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, pp. 1-5.
- STEWART P. S., COSTERTON J. W., 2001: Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 358: 135-138.
- STOODLEY P., SAUER K., DAVIES D. G., COSTERTON J. W., 2002: Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, 56: 187-209.
- TAYLOR J. H., GORDON W. S., 1955: Growth-promoting activity for pigs of inactivated penicillin. *Nature*, 176 (4476): 312-313.
- TIMMERMAN H. M., MULDER L., EVERTS H., VAN EPSSEN D. C., VAN DER WAL E., KLAASSEN G., ROUWERS S. M., HARTEMINK R., ROMBOUTS F. M., BEYNEN A. C., 2005: Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. *Journal of Dairy Science*, 88: 2154-2165.
- TOLEDO A., GOMEZ D., CRUZ C., CARREON R., LOPEZ J., GIONO S., CASTRO A. M., 2012: Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from piglets in the suckling and weaning period in Mexico. *Journal of Medical Microbiology*, 61: 148-156.

- TRAN T. H. T., EVERAERT N., BINDELLE J., 2018: Review on the effects of potential prebiotics on controlling intestinal enteropathogens Salmonella and Escherichia coli in pig production. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102: 17-32.
- VAN BOECKEL T. P., PIRES J., SILVESTER R., ZHAO C., SONG J., CRISCUOLO N. G., 2019: Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries. *Science*, 365 (6459): 1944.
- WAHLSTROM R. C., TERRILL S. W., JOHNSON B. C., 1950: Effect of antibacterial agents on growth of baby pigs fed a “synthetic” diet. *Proc Soc Exp Biol Med*, 75 (3): 710-711.
- WANG J., ZENG Y., WANG S., LIU H., ZHANG D., ZHANG W., JI H., 2018: Swine-derived probiotic *Lactobacillus plantarum* inhibits growth and adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* and mediates host defense. *Front Microbiol*, 9: 1364.
- WANG J., ZHANG W., WANG S., WANG Y., CHU X., JI H., 2021: *Lactobacillus plantarum* exhibits antioxidant and cytoprotective activities in porcine intestinal epithelial cells exposed to hydrogen peroxide. *Oxidative Med. Cell. Longev*, 8936907.
- 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. *Journal of Functional Foods*, 75: 104248.
- YAN F., POLK D. B., 2002: Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*, 277: 50959–50965.
- YAN F., POLK D. B., 2006: Probiotics as functional food in the treatment of diarrhea. *Curr Opin Nutr Metab Care*, 9: 717-721.
- YANG F., WANG A., ZENG X., HOU C., LIU H., QIAO S., 2015: *Lactobacillus reuteri* I5007 modulates tight junction protein expression in IPEC-J2 cells with LPS stimulation and in newborn piglets under normal conditions. *BMC Microbiol*, 15-32.
- ZHANG L., XU Y. Q., LIU H. Y., 2010: Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG using an *Escherichia coli* K88 model of piglet diarrhoea: Effects on diarrhoea incidence, faecal microflora and immune responses. *Vet Microbiol*, 141 (1–2): 142-148.
- ZHENG L., DUARTE M. E., SEVAROLLI LOFTUS A., KIM S. W., 2021: Intestinal Health of Pigs Upon Weaning: Challenges and Nutritional Intervention. *Front Vet Sci*, 8: 628-658

## **10. Köszönetnyilvánítás**

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

Hálás köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Farkas Orsolyának és Palkovicsné Pézsa Nikolettnek, a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék munkatársainak, akik nélkül nem készülhetett volna el ez a dolgozat. Köszönöm, hogy szívesen fogadtak a tanszéken, hogy időt és fáradságot nem sajnálva bármikor is szükségem volt rá, a segítségemre voltak, és támogatták, segítették részvételemet a laboratóriumi munkában. Köszönetet szeretnék mondani Dr. Kovács Dórának a kísérletek során nyújtott sok segítségért és szakmai támogatásért.

Végül szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak, hogy minden nehézségben mellettem álltak és segítettek, ahogyan csak tőlük tellett.

A TKP2020-NKA-01 számú projekt a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból biztosított támogatással, a Tématerületi Kiválósági Program 2020 (2020-4.1.1-TKP2020) pályázati program finanszírozásában valósult meg.

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

**Név:** Somogyi Fanni

**Elérhetőség (e-mail cím):** somogyi.fanni4@gmail.com

**A feltöltendő mű címe:** *Lactobacillus rhamnosus* probiotikus baktériumtörzs hatásának *in vitro* vizsgálata sertés bélfertőzés modellben

**A mű megjelenési adatai:** 2022.

**Az átadott fájlok száma:** 1

---

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 szolgáltatssa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyezik, 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 anyagrész 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 törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2022. 10. 17.



aláírás  
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

---

*A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra 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, szolgáltassa, 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.*