

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

A gasztrointesztinális mikrobiom módosításának hatása a szociális magatartásra és a zsírsav összetételre

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Mintál Kitti

Témavezető: Prof. Dr. Karádi Zoltán

Társtémavezető: Dr. Tóth Attila

Programvezető: Prof. Dr. Karádi Zoltán

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Reglődi Dóra

Pécsi Tudományegyetem,
Általános Orvostudományi Kar,
Élettani Intézet,

Pécs

2024

I. Bevezetés

A gasztrointesztinális rendszer mikrobiom összetételének számottevő romlása sohasem marad következmények nélkül: mindenkor több szervrendszer, közöttük kiemelten a központi idegrendszer működésének a károsodásával jár. Ez a tény napjainkban egyre nagyobb szakmai és média figyelmet kap, mi több bizonyos, e körbe tartozó megbetegedések (súlyos depressziós állapotok, autizmus spektrum zavar, Alzheimer-kór, stb.) egyre tömegesebb megjelenése tapasztalható, s mindez egyre fokozódó társadalmi feszültségek felléptét, az egészségügyi ellátó rendszer súlyos zavarát eredményezi. Ezek a kórformák egyre szélesebb rétegeket és korosztályokat érintenek, s általános jellemzőjüként megállapítható, hogy kezelésükben, mai tudásunk szerint, döntően nem kauzális, hanem csak tüneti eljárások alkalmazhatók. Kutatásainkat arra a hipotézisre alapozzuk, hogy a bél mikrobiom nem csak a perifériás funkciók, hanem számos központi működés szabályozásában is jelentős szerepet játszik, és ennek következtében az egyed magatartására is hatást tud gyakorolni. Az intesztinális mikrobiom, vagyis a bélrendszerben fellelhető kommenzalista, szimbionta és patogén mikroorganizmusok széles közösségének az összetétele és egyensúlya kulcsfontosságú a szervezet fiziológias működésének a fenntartásában. Ezt az is alátámasztja, hogy e komplex rendszer egyensúlyának a megbomlása perifériásan és centrálisan is megnyilvánuló, nagymértékű organizmikus elváltozásokhoz vezet. Az intesztinális baktériumok és a központi idegrendszer között a bél-agy tengelyen kétirányú kapcsolat áll fenn, és ma már egyre inkább elfogadott az a nézet, hogy a gasztrointesztinális (GI) mikrobiom diszbiózisa és a központi idegrendszer számos struktúráját érintő pszichoneurológiai és kognitív dominanciájú betegségek megjelenése szoros korrelációt mutat.

Autizmus spektrum zavarban a mikroba profil megváltozása korán tettenérhető, emellett a mikrobák által termelt anyagokban is eltérések figyelhetők meg. Az autizmus spektrum zavar (ASD) és a GI mikrobiom közötti kölcsönkapcsolat meglétét különféle, széles körben mutatkozó direkt és indirekt bizonyítékok támasztják alá, amelyek több hipotézis kidolgozásához vezettek, melyek az ASD megjelenése és a bélflóra megváltozása közötti kapcsolat működési mechanizmusának a megvilágítására irányulnak. Mindezek nyomán egyre elfogadottabbá válik az a szakmai álláspont, mely szerint a központi idegrendszeri kórfolyamat egyik lehetséges kiindulási pontja a GI mikrobiom megváltozásában keresendő.

Különféle kezelésekre hatására a bélflóra összetételében jelentős változásokat tudunk létrehozni felnőtt korban is, s ennek fontos kihatása lehet a fenti kórfolyamatok nyomán kialakuló megbetegedések terápiás megközelítésére is. A mikrobiom módosulását különféle

módszerekkel befolyásolhatjuk, többek között az étrend megváltoztatásával, probiotikumokkal (olyan élő mikroorganizmusokkal, melyek a szervezet számára jótékony hatással bírnak), prebiotikumokkal (olyan, a szervezet számára nem emészthető élelmiszer összetevők, melyek szelektíven képesek stimulálni bizonyos baktériumoknak a szaporodását és aktivitását), szimbiotikumokkal (probiotikumok és prebiotikumok együttes jelenléte), posztbiotikumokkal (jótékony hatású mikroorganizmusok anyagcsere termékei vagy alkotórészei), antibiotikumokkal és széklettranszplantációval egyaránt.

A zsírsavak fontos alkotóelemei minden többsejtű élőlénynek, elsődlegesen a sejtmembránok foszfolipid kettősrétegének, emellett a szervezet egészséges fejlődésében is esszenciális szereppel bírnak. Mindemellett fontos szerepet töltenek be a GI mikrobiom összetételének alakításában is, s ennek következtében a zsírsavakban bekövetkező minőségi és mennyiségi változások közvetlenül befolyásolhatják a bélflóra komplex ökológiai rendszerét. Ma már azt is tudjuk, hogy a zsírsavak és a mikrobiom kapcsolata nem csak egyirányú, extenzív kutatások bizonyítják, hogy a mikrobiom megváltozása a zsírsavak összetételére és mennyiségére is hatással lehet. A vizsgálatok fő fókuszában kézenfekvően a rövid szénláncú zsírsavak és a mikrobiom kapcsolatának a feltárása áll, ugyanis a rövid szénláncú zsírsavak (ecetsav, propionsav, butánsav) az ugyancsak széles körben kutatott komplex szénhidrátok bakteriális fermentációja során keletkező végtermékek. A mikrobiom módosulásának következményei mindemellett azonban nem csak a rövid szénláncú zsírsavak összetételében, hanem a hosszabb szénláncú zsírsavak tartalmában is változásokat tud okozni. A fentiekén túl többen alátámasztották, hogy a bélflóra szintén jelentős szereppel bír bizonyos zsírsavak termelésében is. Mindezek alapján a gasztrointesztinális mikrobiom és a szervezetben jelenlévő zsírsavak közötti kapcsolat meghatározóbb lehet, mint eddig gondoltuk, és nem csak a táplálkozás, de az intesztinális mikrobiom jellege, összetétele is fontos szerepet játszhat a zsírsavak összetételének és mennyiségének változásában.

II. Célkitűzések

1. Kutatásunk első célkitűzése az volt, hogy megismerjük a gasztrointesztinális traktus mikrobiom módosításának szociális magatartási folyamatokra gyakorolt hatásait, s ennek révén jobban megértsük a bélbaktériumok viselkedésre kifejtett sokrétű hatását.
2. Kísérletsorozatunk második célja az volt, hogy megvizsgáljuk a gasztrointesztinális traktus mikrobiom módosításának hatásait a részletes zsírsav spektrumra, s ennek következtében jobban megismerjük a bélbaktériumok zsírsavtermelésben betöltött szerepét.
 - Célunk volt megvizsgálni, hogy a krónikus széles spektrumú antibiotikum kezelés okozhat-e felnőtt állatoknál autizmus spektrum zavarhoz hasonló tüneteket a szociális viselkedésben, illetve, hogy ezen viselkedésbeli elváltozások összehasonlíthatóak-e a valproát indukálta ASD modellben megjelenő eltérésekkel.
 - Probiotikum keverékünkkel kapcsolatos fő kérdésünk volt, hogy a kezelés képes-e visszafordítani az antibiotikum által kiváltott magatartásbeli eltéréseket.
 - További célunk volt megállapítani, hogy a probiotikum keverékkel történő kezelés képes-e a valproát indukálta ASD fejlődési modellben megjelenő szociális viselkedési eltérések enyhítésére, csökkentésére.
 - Azt is szeretnénk volna feltárni, hogy a krónikus széles spektrumú antibiotikum kezelés hogyan hat a testsúlyra, a táp- és vízfelvételekre.
 - Ugyancsak tisztázni kívántuk, hogy az antibiotikum kezelés következtében kialakuló mikrobiális változások képesek-e befolyásolni a zsírsavak koncentrációját és tömegszázalékos arányát.
 - Megválaszolendő kérdésként merült fel, hogy probiotikum keverék adásával tudunk-e változtatni a zsírsavösszetételen.
 - Végül pedig azt is szeretnénk volna megvizsgálni, hogy a probiotikum keverék adásával vissza tudjuk-e állítani az antibiotikum okozta változásokat a zsírsavak összetételében.

III. Anyagok és Módszerek

III.1. Kísérleti állatok

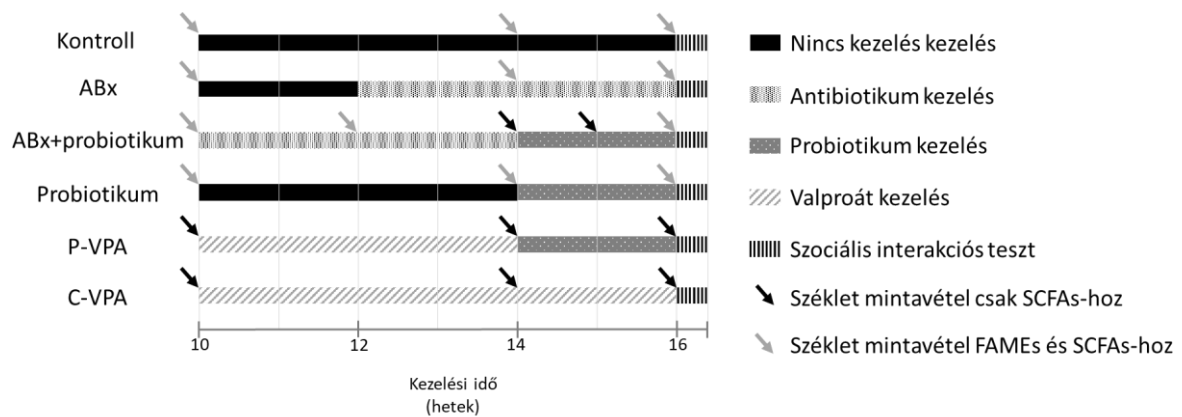
Kísérleteinkben összesen 72 darab felnőtt hím Wistar patkányt használtunk. A kezelések az állatok 10 hetes korától kezdődtek. Az állatokat standard laboratóriumi körülmények között tartottuk egyesével külön ketrecben, állandó hőmérséklet, páratartalom és 12-12 órás sötét-világos periódust biztosítva. Az állatok standard laboratóriumi rágszálótápot és csapvizet kaptak *ad libitum*. Mindennapi kézhez szoktatásban (handling) részesítettük őket, hogy az emberi jelenléthez és érintéshez hozzászokjanak. A kísérleti állatok tartása és a velük való foglalkozás során az intézeti (kísérleti engedély száma: BA02/2000-07/2023; BA02/2000-06/2023) hazai (1998. évi XXVIII. tv. az állatok védelméről és kíméletéről; 40/2013. (II.14) Kormányrendelet az állatkísérletekről) és nemzetközi előírások, európai uniós irányelvek érvényesültek (A Tanács 86/609/EGK irányelve, 1986, 2006; Az Európai Parlament és a Tanács 2010/63/EU irányelve).

III.2. Kezelések

III.2.1. Antibiotikummal és probiotikummal történő kezelések

Az állatokat négy csoportba osztottuk: 1. Kontroll csoport (kontroll); 2. Antibiotikum kezelt csoport (ABx); 3. Antibiotikum és probiotikum kezelt csoport (ABx+probiotikum); 4. Probiotikum kezelt csoport (probiotikum) (1. ábra). Az antibiotikum keveréket az egyedeknek 4 héten keresztül biztosítottuk ivóvizükbe való keveréssel, ezzel is csökkentve az őket érő stresszt. A keverék 5 féle antibiotikumból állt (ampicillin 1 g/l, vancomycin 500 mg/l, ciprofloxacín HCl 20 mg/l, imipenem 250 mg/l és metronidazole 1 g/l), melyet 3 naponta cseréltünk. Azoknak az állatoknak az ivóvizét, akik nem részesültek antibiotikum kezelésben szintén 3 naponta cseréltük. Az antibiotikum kezelést követően probiotikumot kapó- és a csak probiotikum kezelésben részesülő csoportok tagjai 2 héten keresztül minden nap probiotikum keveréket kaptak táplálékukhoz kiegészítve. A készítmény 4 féle jótékony hatású baktériumfajt tartalmazott (*Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*) meghatározott mennyiségben és összetételben, mely a Pécsi tudományegyetem szellemi termékeként van bejegyezve (422.lbh.5.(2019.09.05)). A baktériumtörzsek a DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Deutschland, Leibnitz) cégtől származnak. A *Lactobacillus spp.* tenyésztése 100-100 ml folyékony Rogosa medium táptalajon (OXOID Ltd.

UK), míg a *Bifidobacterium spp.* kitenyésztése anaerob agarta táptalajra oltva (Neogen Europe Ltd. UK) zajlott, és az anaerob kondíció GENbag anaer (BioMérieux SA France) használatával lett biztosítva. A 2 héten át tartó probiotikum kezelés során a keverék naponta lett legyártva és azonnal felhasználásra került a probiotikumot kapó egyedek esetében.



1. ábra Kísérleti elrendezés a csoportok és kezelési idők alapján. Kontroll: kontroll-, ABx: széles spektrumú antibiotikum kezelt-, ABx+probiotikum: széles spektrumú antibiotikum kezelt majd probiotikum kezelt-, Probiotikum: probiotikum kezelt-, P-VPA: valproát és probiotikum kezelt-, C-VPA: valproát kezelt csoport. A nyilak a széklet mintavételi időpontokat mutatják, a fekete nyíl csak a rövid szénláncú zsírsavakhoz (SCFAs) történő mintavételeket jelöli, a szürke nyilak a rövid szénláncú zsírsavak (SCFAs) és a zsírsav metil-észterek (FAMEs) analíziséhez történő mintavételi időpontokat jelölik egyszerre.

III.2.2. Lítium-kloriddal történő kezelés

Annak érdekében, hogy egyértelműen kizárhassuk, hogy a magatartásban megjelenő eltérések nem az antibiotikum kezelés következtében megjelenő intesztinális diszkomfort érzésnek a következményei pilot kísérletet végeztünk. A pilot kísérletben egy lítium-kloriddal (LiCl) kezelt csoportot alakítottunk ki, mely során 8 állatot kezeltünk. Ebben a kísérleti felállásban, lítium-klorid segítségével szerettünk volna intesztinális diszkomfortot kiváltani az állatoknál. A patkányoknak lítium-klorid (125 mg/kg/ml) injekciót adtunk intraperitoneálisan, majd fél órával az injekció után történtek a magatartási vizsgálatok.

III.2.3. Valproáttal történő kezelések

Az autizmus spektrum zavar modellezéséhez valproát indukálta ASD állatmodellt használtunk. A modell létrehozásához először hím és nőstény állatokat pároztattunk 1 éjszakán keresztül, majd a sikeres megtermékenyítést követően a vemhes nőstényeket egyszeri intraperitoneális injekcióban részesítettük a vemhesség 12,5 napján. A vemhes anyák 500mg/ttkg valproát (VPA) (Sigma-Aldrich; P4543) injekciót kaptak 250 mg/ml fiziológiás sóoldatban oldva, míg azok az anyák, melyek utódai a kontroll csoportot képezték csak fiziológiás sóoldatot kaptak. Minden anyaállatot egyedileg tartottunk, utódjaik zavartalan felnevelése érdekében. A megszületett utódok közül csak a hímekkel dolgoztunk a továbbiakban, és amint elérték a 8 hetes kort leválasztottuk őket 2 csoportba osztva: 1. kontroll valproát kezelt csoport (C-VPA); 2. valproát és probiotikum kezelt csoport (P-VPA) (1. ábra). A probiotikumot is kapó csoport egyedei a fentebb leírt probiotikum keveréket ugyanolyan módszerrel kapták minden nap 2 héten keresztül.

III.3. Kísérletes vizsgálatok

III.3.1. Testtömeg, táplálék- és vízfelvétel mérése

A kísérletben résztvevő állatok súlya 10 hetes koruktól a kísérletek végeztéig 3 naponta lett megmérve, víz- és táp fogyasztásuk pedig naponta volt monitorozva.

III.3.2. Szociális interakciós teszt

Háromkamrás szociális interakciós tesztet használtunk az állatok általános szociabilitásának vizsgálatára és a szociális deficit azonosítására. Az apparátus 3 részből áll: középső zóna (30 × 40 cm), szociális zóna (60 × 40 cm) és üres zóna (60 × 40 cm). Az utóbbi két zóna mindegyike tartalmazott 1-1 kerek 18 cm átmérőjű ketrecet. Az aréna fölött egy videokamerát helyeztünk el, amely rögzítette az állatok mozgását, majd ezt a Noldus EthoVision Basic software (Noldus Information Technology b.v., Wageningen, Hollandia) segítségével tároltuk és elemeztük ki. A kísérlet során az állatokat először a középső zónába helyeztük és hagytuk, hogy szabadon felfedezzék az apparátust 10 percen keresztül (habituáció), majd ezt követően egyből visszahelyeztük őket saját ketrecükbe 3 percre, s ezalatt egy számukra ismeretlen, még sosem látott egyedre tettünk az egyik ketrecbe. Ezáltal az ismeretlen állatot tartalmazó ketrec zónája vált a szociális zónává és az üres ketrecet tartalmazó

zóna az üres zóna lett. A 3 perc leteltével az állatokat visszahelyeztük a középső zónába és hagytuk, hogy 10 percig ismét szabadon felfedezzék az egész apparátust (teszt). A kísérlet során rögzítettük az állatok által megtett távolságot, a különböző zónákban eltöltött időt és a teszt során a két oldalsó zónába történő első belépés időpontját. Emellett feljegyeztük az állatok interakcióját az ismeretlen állatot tartalmazó ketrec és az üres ketrec esetében is. A patkányok magatartási mintázatait, azaz az ágaskodások (rearing) és mosakodások (grooming) számát kézzel regisztráltuk. Ezenfelül kiszámoltuk a szociabilitási indexet (szociális zónában töltött idő – üres zónában töltött idő) / (szociális zónában töltött idő + üres zónában töltött idő), mely megmutatja az ismeretlen állattal történő interakció mértékét.

III.4. Kromatográfias vizsgálatok

A zsírsavak kromatográfias analiziséhez meghatározott időközönként (rövid szénláncú zsírsavak vizsgálatánál 3-5 időpont, zsírsav metil-észterek vizsgálatánál 3 időpont) friss székletmintát vettünk az állatoktól steril eppendorf csövekbe, melyeket a felhasználásig –80 °C-os hűtőben tároltunk.

III.4.1. Rövid szénláncú zsírsavak (SCFAs) analízise

Az előzőleg levett székletmintákból 100 mg-ot kimérve 1 ml desztillált vízzel homogenizáltuk, 10 perc szobahőmérsékleten történő állást követően 100 µl (2 mmol/l, heptánsav - Sigma-Aldrich; 43858) belső standardot adtunk hozzá. A mintákat ezt követően 5 percig centrifugáltuk 10.000-es fordulatszámra és a filteren átszűrt felülúszót használtuk a 3 rövid szénláncú zsírsav (ecetsav/C2, propionsav/C3, butánsav/C4) koncentrációjának meghatározására. A mennyiségi meghatározást belső standard módszer segítségével végeztük a standard oldatokból (ecetsav - Sigma-Aldrich; A6283; propionsav - Sigma-Aldrich; 94425; és butánsav - Sigma-Aldrich; 19215). Az analízist Agilent Technology 6890N GC-5975 MS gázkromatográf-tömegspektrométer készülékkel (GC-MS) végeztük, melyhez HP-INNOWAX oszlopot (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm; Agilent Technology) használtunk. A mérés során hélium vivógázt használtunk (1,5 ml/perc). A kályha hőmérséklete 1 percig 80 °C volt, majd 20 °C/perc sebességgel felmelegítettük 200 °C-ra és 2 percig ott tartottuk. Az injektálás során (1 µl) splitless automata mintabemérést használtunk (250 °C), 20:1-es befecskendezési aránnyal.

III.4.2. Zsírsvav metil-észterek (FAMEs) analízise

A begyűjtött székletmintákból (kontroll, ABx, ABx+probiotikum, probiotikum csoport mintái a kezelések előtt (1. minta), a kezelések alatt (2. minta) és a kezelések befejeztével (3. minta)) tesztcsövekbe megközelítőleg 100 mg mennyiségekhez hozzáadtunk 60 mg metil-tridekanoát (C13-0) 20 ml n-hexánnal készült oldatából 40 µl-t, mint standard oldatot. Ezt követően minden mintához 3 ml metanol:hexán 4:1 (V/V) elegyet és 1-2 mg pirogallolt adtunk, majd ezt követően minimum fél órán át fagyasztottuk a mintákat. A fagyasztást követően lassan adagolva 300 µl acetil-kloridot adtunk a csövekhez, majd a standardot tartalmazó, acetil-kloridos mintákat 100 °C-os forralás alatt 1 órán át rázógéppel ráztuk. Amint a csöveket lehűtöttük lassan 5 ml 6 %-os K₂CO₃-oldatot adunk hozzá a reakció leállítására és a keverék semlegesítése céljából. A mintákat ezt követően vortex segítségével homogenizáltuk és centrifugáltuk. A felső hexános fázist egy 2 ml-es mintatartócsőbe átvittük, majd ehhez még az 1 ml-es folyadékszint eléréséig hexánt adagoltunk. A zsírsavak analízisét PerkinElmer Clarus 690 gázkromatográfiás készülékkel és ehhez tartozó lángionizációs detektor (PerkinElmer, USA) segítségével vizsgáltuk, melyhez Rt-2560 kapillárisoszlopot (100 m × 0,25 mm i.d. × 0,20 µm, Restek) használtunk. Vivőgázként héliumot alkalmaztunk (1,3 ml/perc). Az injektálás során split mintabemérést használtunk (225 °C) és a befecskendezési arány 20:1 volt. Az injektált mennyiség 2 µl volt. A detektor hőmérsékletét 300 °C-ra állítottuk. A kályha hőmérséklete kezdetben 100 °C volt, melyet 4 percig tartottunk majd 3 °C/perc sebességgel felmelegítettük 250 °C-ra és 25 percig ott tartottuk. A minták lemérését követően a zsírsvav metil-észterek analízisét a PerkinElmer TotalChrom szoftverével számított görbe alatti terület alapján elemeztük. A zsírsavak azonosítása a külső standardok retenciós idején alapult (PUFA3 (Supelco, St. Louis, MO, USA; GLC-674, 642, 643, 569b, 481, 473, Nu-Check-Prep, Elysian, MN, USA; C16:1n-9-ME (Larodan AB, Solna, Svédország), The Bacterial Acid Methyl Esters CP Mixture (Matreya LLC., State College, PA, USA)) és a zsírsavak koncentrációját µg/100 mg-ban fejeztük ki. Az abszolút koncentrációt és a zsírsavak tömegszázalékos arányát (minden meghatározott zsírsav tömege az összes meghatározott zsírsav össztömegéhez viszonyítva) is meghatároztuk.

III.5. Szövettan

A hippocampus rétegvastagságának megállapítása céljából szövettani vizsgálatokat végeztünk. A kísérletek befejeztével az állatokat i.p. adott uretánnal (20 %, 1,4 g /ttkg) túlaltattuk, majd transzkardiálisan perfundáltuk. Csoportonként 6 db állatnak az agyát 4 %-os formalinban fixáltuk. Ezt követően fagyasztott, 40 µm-es sorozatmetszeteket készítettünk a hippocampus területéről, amiket krezil-violával festettünk meg (Nyssl-festés). A metszeteket ImageJ (NIH) software segítségével elemeztük ki, melynek során a hippocampus különböző régióinak (subiculum, CA1, CA2, CA3, Gyrus dentatus) átmérőjét vizsgáltuk egy általunk kiválasztott szakasz (bregma -3,6-tól bregma 3,8-ig) esetében.

III.6. Statisztika

A háromkamrás szociális interakciós teszt, a rövid szénláncú zsírsavak és a szövettani vizsgálat eredményeinek elemzése során az adatokat SPSS statisztikai szoftvercsomag (IBM SPSS Statistics 22) segítségével dolgoztuk fel és a szignifikancia szintet minden esetben $p < 0,05$ -nél határoztuk meg. A szociális interakciós tesztben a szociális és üres zónába történő első belépés ideje és a szociabilitási index eredményei esetében, továbbá a szövettani vizsgálatok analízise során, illetve a rövid szénláncú zsírsavak analízisének Kruskal–Wallis tesztet és Friedman-próbát alkalmaztunk. A szociális interakciós teszt többi mért paraméterének adatai és az állatok súlyának, táp- és vízfogyasztásának analízise során az egyutas ANOVA-t és post-hoc analízishez Tukey tesztet alkalmaztunk.

A FAMEs analízise során először főkomponens analízist (PCA) végeztünk. A PCA modell illesztése eigenvalue (sajátérték) dekompozíciós módszerrel történt. A kezeléseknél a zsírsavak összetételére és koncentrációjára gyakorolt hatásának időbeni kimutatására egy lineáris kevert random modellt alkalmaztunk, ahol az egyes patkányokat azonosítóval láttuk el és ezeket az azonosítókat használtuk, mint random faktor és a neasted (fészek) hatás pedig az alom volt. Valamennyi modellben a mintavételek időpontját, a kezeléseket és ezek kölcsönhatását használtuk, mint vizsgált paraméterek, és a modelleket az alapértékekhez igazítottuk. A zsírsav metil-észterek elemzését R statisztikai szoftverrel (4.2.1-es verzió; csomagok: lme4, lmerTest; R Core Team, Bécs, Ausztria) végeztük. A szignifikancia szintet minden esetben $p < 0,05$ -nél határoztuk meg.

IV. Eredmények

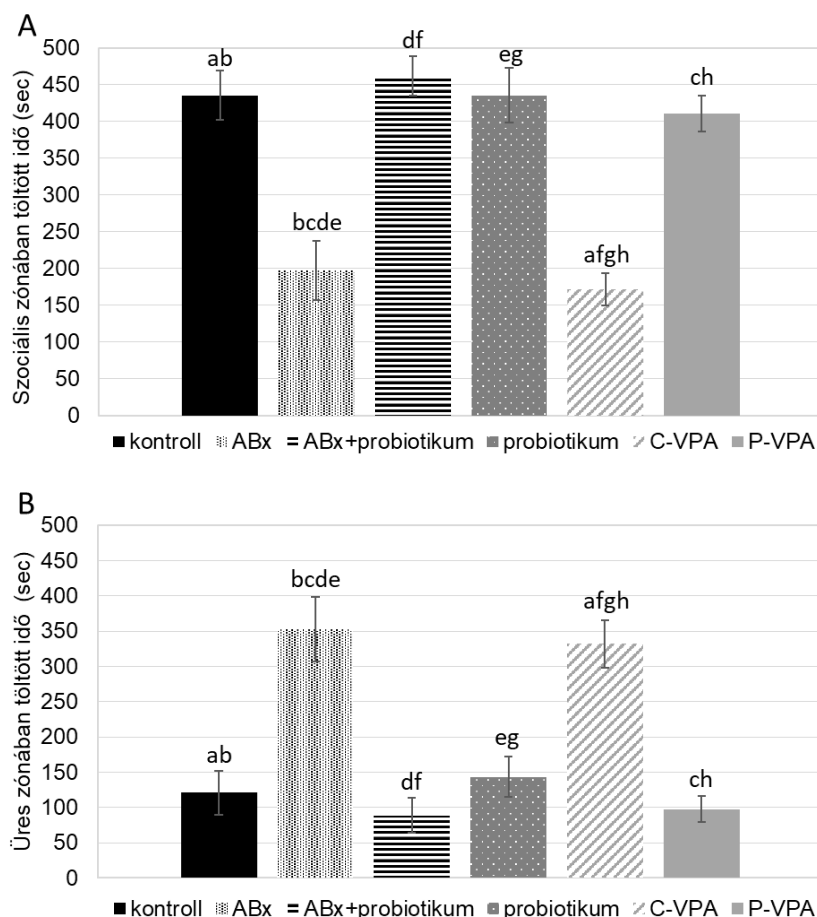
IV.1. Testtömeg, táp- és vízfelvétel

A kezelések alatt történt testtömeg-, táp- és vízfelvételi mérések során kapott eredmények nem mutattak szignifikáns eltéréseket a vizsgált csoportok között.

IV.2. Szociális interakciós teszt

Az adatok elemzése során az explorációs idő tekintetében a csak valproát, illetve az antibiotikum kezelésben részesülő állatok szignifikáns eltéréseket mutattak a többi egyedhez képest (2. ábra). Mindkét kezelt állatcsoport szignifikánsan kevesebb időt töltött az ismeretlen állatot tartalmazó szociális zónában (C-VPA: $p = 0,013$; ABx: $p = 0,006$) és sokkal több időt az üres ketrecet tartalmazó üres zónában (C-VPA: $p = 0,046$; ABx: $p = 0,005$). A szociabilitási index megközelítőleg 70 %-kal alacsonyabb volt a C-VPA és ABx csoport egyedei esetében, mint a többi csoportnál kapott értékek ($p = 0,022$). Az ismeretlen állattal és üres ketrecel való interakciók mérése során az antibiotikum kezelt ($p = 0,002$) és C-VPA állatok ($p = 0,050$) sokkal kevesebbszer érintkeztek az ismeretlen állatot tartalmazó ketrecel, mint a kontroll csoport tagjai, emellett az antibiotikum kezelt csoport szignifikánsan eltért az antibiotikum+probiotikum ($p = 0,025$), probiotikum ($p = 0,003$) és P-VPA ($p = 0,010$) csoporttól is. Ezzel ellentétben az üres ketrecel történő interakció vizsgálata során nem mutatkozott jelentős eltérés a csoportok tagjai között. Az állatok által megtett távolság vizsgálata során és a sztereotip magatartási mintázatok értékelése esetében nem volt különbség a csoportok között.

A lítium-kloriddal történő kezelést követően nem találtunk szignifikáns eltéréseket az ismeretlen állatot tartalmazó zónában eltöltött explorációs idő, sem a szociabilitási index tekintetében a hat vizsgált csoport tagjaihoz képest.



2. ábra Az ábrák a háromkamrás szociális interakciós teszt alatt a szociális zónában (A) és az üres zónában (B) eltöltött időt ábrázolják a különböző csoportok között a kezelések hatására. kontroll: kontroll csoport kezelés nélkül, ABx: széles spektrumú antibiotikum kezelt csoport, ABx+probiotikum: széles spektrumú antibiotikum kezelt majd probiotikum kezelt csoport, probiotikum: probiotikum kezelt csoport, C-VPA: valproát kezelt csoport, P-VPA: valproát és probiotikum kezelt csoport. Az adatokat átlag \pm szórásban fejeztük ki ($n=10$ /csoport). A csoportok közötti szignifikáns változást az oszlopok feletti azonos kis betűk jelölik (a-h) (egyutas ANOVA, $p < 0,05$).

IV.3. Rövid szénláncú zsírsavak analízise

Az SCFAs analízise során a csoportok közötti összehasonlítások esetében a kezeléseket után a széles spektrumú antibiotikum keverék alkalmazása jelentősen csökkentette a három vizsgált zsírsav (butánsav, propionsav, ecetsav) koncentrációját összehasonlítva a többi csoport egyedeivel; ABx+probiotikum ($p = 0,013$), probiotikum ($p = 0,002$), C-VPA ($p = 0,001$), P-VPA ($p = 0,042$), kontroll ($p = 0,025$) csoport. A csoportokon belüli összehasonlítások során

szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető az ABx csoportban az ecetsav ($p = 0,001$), butánsav ($p = 0,001$) és propionsav ($p = 0,001$) esetében a kezelés előtti és kezelés utáni mintáknál. Az ABx+probiotikum csoport esetében is megfigyelhető volt a koncentráció csökkenés az antibiotikum kezelést követően ($p = 0,001$), azonban az általunk használt probiotikum keverék képes volt a zsírsavak szintjét visszaállítani 2 héten belül a kiindulási, kezelés előtti koncentráció szintjére. Mindazonáltal, számottevő különbség nem mutatkozott a kezeléseket előtti és utáni koncentráció értékekben. A valproát kezelésben részesülő csoportok vonatkozásában nem detektáltunk semmiféle szignifikáns eltérést sem a csoportok közötti sem a csoportokon belüli SCFAs analízise során.

IV.4. Zsírsav metil-észterek analízise

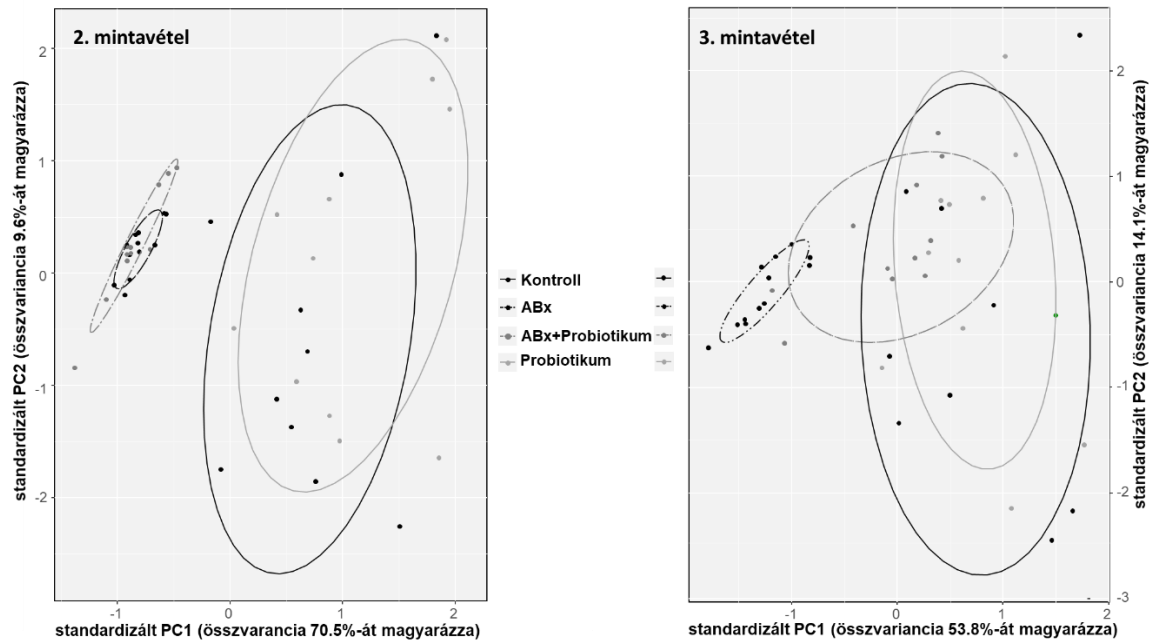
IV.4.1. A kromatogram jellemzői

Annak érdekében, hogy ténylegesen igazolni lehessen a kromatogramokon megjelenő, mintavételek közötti eltéréseket PCA analízist alkalmaztunk, mely alátámasztotta, hogy a zsírsavak csúcs alatti területei eltérőek, és ezek az eltérések a kezelésekből adódnak. A két fő komponens (PC1 és PC2) magyarázta a második mintavételi időpontban a kromatogramok eltéréseinek 80,1%-át. Az analízis egyértelműen két nagyobb részre osztotta a mintákat. Az egyik rész tartalmazta az ABx és az ABx+probiotikum csoport egyedeinek mintáit, a másik részhez pedig a kontroll és probiotikum csoport mintái tartoztak. A harmadik mintavételi időpont esetében a PC1 és PC2 csupán a csúcs alatti területek varianciáinak 67,9%-át magyarázta, mégis látható volt, hogy az ABx+probiotikum csoport közelít a kontroll és a csak probiotikumot kapó csoport egyedeinek mintáihoz, míg az ABx csoport elkülönült a másik három csoporttól (3. ábra).

IV.4.2. Lineáris kevert random modell eredményei

A zsírsavak koncentrációi és tömegszázalékos arányai közötti különbségek feltárására lineáris kevert random modellt alkalmaztunk. Az analízis során jelentős eltéréseket detektáltunk a vizsgált zsírsavcsoportok között az általunk összehasonlított paraméterekben (mintavételi időpontok, kezeléseket és ezek interakcióit) a koncentráció szintjeiben és a tömegszázalékos arány esetében is. Emellett a vizsgált zsírsavak összkoncentrációjában is jelentős eltéréseket figyeltünk meg a vizsgált paraméterek között. Továbbá a zsírsavkategóriákon belül az egyes

zsírsavak között is számos esetben szignifikáns különbségeket detektáltunk. Mindez jelzi a bél mikrobiom jelentős hatását a zsírsavak termelésében.



3. ábra A főkomponens analízis két fő komponensének (PC1 és PC2) eredményei a 4 csoport tekintetében (kontroll, antibiotikum (ABx), antibiotikum+probiotikum (ABx+probiotikum) és probiotikum kezelt csoport). A grafikonok a második és harmadik mintavételi időpontot ábrázolják, melyek a kromatogramok görbe alatti területeinek alapján lettek kiszámolva.

IV.4.2.1. Telített zsírsavak (SAT)

A telített zsírsavak, mint zsírsavkategória elemzése során számottevő különbség mutatkozott a koncentrációk és a tömegszázalékos arányok esetében a mintavételi időpontok, kezelések és e kettő interakciója között, mely jelzi, hogy az antibiotikum illetve az ezt követő probiotikum kezelés döntően befolyásolja a koncentráció szintjét és a tömegszázalékok arányt. Következésképp a legtöbb, e kategóriába tartozó zsírsav megjelenésében fontos szerepet játszott a GI mikrobiom.

IV.4.2.1.1. Rövid szénláncú telített zsírsavak (shortSAT)

A rövid szénláncú telített zsírsavak a telített zsírsavak egy alkategóriájába tartoznak. Jelenlegi vizsgálataink során 5 db zsírsavat (C4:0, C5:0, C6:0, C7:0, C8:0) analizáltunk, melyek

ehhez az alkategóriához tartoznak. Hasonlóan a SAT kategóriához a shortSAT is jelentős eltéréseket mutatott a különböző kezelések hatására.

IV.4.2.2. Elágazó szénláncú és transz-zsírsavak

Ez a fő kategória 3 koelúciót (tC17:1n-7+C18i, tC16:1n-7+C17i, tC18-1mix) és 5 elágazó szénláncú telített zsírsavat tartalmaz. Mind a fő kategória mind pedig a 3 koelúció esetében jelentős különbségeket figyeltünk meg a kezelések, mintavételi időpontok és a kettő interakciója között, tehát az antibiotikum kezelés mellett az azt követő probiotikum adás is képes volt módosítani a koncentrációs szinteket és a tömegszázalékos arányokat is.

IV.4.2.2.1. Elágazó szénláncú telített zsírsavak

Az egész alkategória, illetve az ezt alkotó, általunk vizsgált zsírsavak (C13ai + C14i + C15i + C15ai + C16i) mindegyikénél szignifikáns eltéréseket detektáltunk a kezelések, a mintavételi időpontok és ezek interakciója között mind a koncentráció, mind pedig a tömegszázalékos arány analízise során.

IV.4.2.2.2. Transz-zsírsavak (TFA)

Az alkategórián belüli tC18:1 zsírsavnak a vizsgálata során hasonló eredményeket kaptunk, mint amit a fő kategóriájának analízise során láttunk. Ennek a transz-zsírsavnak mind a mennyisége, mind pedig a tömegszázalékok aránya jelentősen lecsökkent az antibiotikum kúra hatására, míg az antibiotikumot követő probiotikum kezelés képes volt ezeket az alacsony értékeket helyreállítani és az eredeti, kezelés előtti szintre visszahozni.

IV.4.2.3. Egyszeresen telítetlen cisz-zsírsavak (cMUFAs)

Az egyszeresen telítetlen cisz-zsírsavak kategóriájának elemzése során, illetve a kategórián belül a C22:1n-9 zsírsav kivételével a többi vizsgált cMUFAs (C13:1n-1, C14:1n-5, C16:1n-9, C16:1n-7, C18:1n-9, C18:1n-7, C20:1n-9) esetében is jelentős különbségeket detektáltunk mindhárom vizsgált paraméter tekintetében.

IV.4.2.4. Többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFAs)

Markáns eltéréseket tártunk fel a többszörösen telítetlen zsírsavak kategóriájának vizsgálata során a koncentráció és a tömegszázalékos arány esetében. Ez a fő kategória két alcsoportra bontható, melyek esetében szintén nagyon hasonló eltéréseket figyeltünk meg: az egyik az n-3 PUFAs csoportja (alfa-linolénsav (C18:3n-3, ALA) és C20:5n-3), a másik pedig az n-6 PUFAs csoportja (C18:2n-6, C20:2n-6, C20:3n-6, C20:4n-6, C22:4n-6, C22:5n-6). Egy másik megközelítésben a PUFAs fő kategórián belül el tudunk különíteni egy alkategóriát a hosszú szénláncú többszörösen telítetlen zsírsavakat (LC PUFAs), illetve ezen az alkategórián belül még további két alcsoportot tudunk megkülönböztetni az n-6 LC PUFAs-t (C20:2n-6, C20:3n-6, C20:4n-6, C22:4n-6, C22:5n-6) és az n-3 LC PUFAs-t (C20:5n-3). Ha ebben a megközelítésben vizsgáltuk meg az adatokat, akkor az LC PUFAs alkategória és az ezen belüli n-6 LC PUFAs alcsoport eredményei hasonló eltéréseket mutattak, míg az n-3 LC PUFAs alcsoport esetében nem jelentkezett szignifikáns eltérés sem a koncentrációk, sem pedig a tömegszázalékos arány tekintetében.

IV.4.2.5. A rágcsálótáp zsírsav összetétele

Az állatoknak biztosított standard rágcsálótáp zsírsav összetételét is kielemeztük. Az eredmények azt mutatták, hogy a cMUFAs kategória mennyisége a legmagasabb a PUFAs és SAT kategória mellett. A rövid szénláncú telített zsírsavakat, illetve a tC18:1 zsírsavat minimális mennyiségben tudtuk detektálni, s nem tudtunk kimutatni elágazó szénláncú telített zsírsavakat a rágcsálótápban. Így ezen eredmények tükrében elmondható, hogy nem a tápból bevitt zsírsavak okozták a kezelések következtében látott zsírsavak változásait.

IV.5. Szövettan

A kísérletek végeztével csoportonként 6 db állat esetében elemeztük ki a hippocampus különböző régiójának (subiculum, CA1, CA2, CA3, Gyrus dentatus) átmérőjét az általunk kiválasztott szakaszban (bregma -3,6-tól bregma 3,8-ig). A szövettani analízis során szembetűnő változásokat figyeltünk meg a hippocampus területein. Azonban nem csak a csoportok között, de a csoportokon belül az egyedek között is jelentős eltéréseket észleltünk, ezért a szövettani adatok jelen formájukban nem interpretálhatók.

V. Diskusszió

V.1. A GI mikrobiom megváltoztatásának hatása a szociális magatartási folyamatokra

A kísérleteink egyik alapvető konzekvenciája, hogy a szociális interakciós teszt során a szociális zónában eltöltött időben, interakciók számában és a szociabilitási index eredményeiben, melyek az ismeretlen állathoz való preferenciát leginkább megmutatják, megfigyelhető, hogy az antibiotikum kezelés hatására hasonlóan, mint a kontroll VPA kezelt csoportnál szociális deficit jelentkezett. Ezen eredmények pedig azt jelzik, hogy a krónikus széles spektrumú antibiotikum kezelés felnőtt korban is képes negatívan befolyásolni a társas viselkedési mintázatokat. Mindezek alapján úgy tűnik, hogy az eredményeink támogatják azt az elképzelést, mely szerint az antibiotikumok által módosított mikrobiom kockázati tényezőként megjelenhet az ASD kialakulásában. Mindemellett a LiCl-os pilot kísérletben, mely során az állatokban intesztinális diszkonfort érzést váltottunk ki nem jelentkezett csökkent szociális viselkedés, mint ami a hosszú távú antibiotikum kezelés során detektálható volt. Ennek következtében elmondható, hogy a szociális viselkedésben tapasztalható abnormalitások nem az antibiotikum kezelés hatására megjelenő viscerális diszkonfort érzésből erednek, hanem az antibiotikumok okozta GI mikrobiom jelentős redukciójával állnak szoros összefüggésben.

További vizsgálatainkkal sikerült igazolnunk, hogy speciális probiotikus hatású baktériumfajok keveréke, mint egy potenciálisan újfajta megközelítés az ASD szociális viselkedést érintő tüneteinek enyhítésében hatásosnak bizonyult mind a VPA-, mind pedig az antibiotikum kezelt állatcsoport esetében. Az általunk alkalmazott probiotikum keverék képes volt javítani mindkét kezelt csoport esetében az ismeretlen állathoz való preferencia mértékét, mindez pedig azt jelzi, hogy a keverékünk sikeresen csökkentette az antibiotikum- illetve a VPA kezelés okozta antiszociális viselkedést. Mindemellett eredményeink során nem találtunk lényeges eltérést a kontroll csoport és a P-VPA illetve az ABx+probiotikummal kezelt csoportok között, így a probiotikum keverék nem csak enyhítette az antiszociális magatartást, hanem a fiziológiásnak tekinthető szociális viselkedési mintázatot is sikeresen visszaállította.

Annak ellenére, hogy a széles spektrumú 4 héten át tartó antibiotikum alkalmazása és a VPA kezelés teljesen eltérő útvonalakon fejti ki hatását, a kialakult szociális viselkedési deficit hasonlósága számottevő, emellett a probiotikum keverék képes volt helyreállítani mindkét modell esetében a kontroll egyedekre jellemző szociális magatartást. Ezen eredmények alapján azt feltételezzük, hogy mindkét modellben a probiotikus kezelés védő hatásai azonos módon érvényesültek és fejtették ki a magatartásra gyakorolt hatásukat.

V.2. A GI mikrobiom módosításának hatása az SCFAs termelésre

Kísérleteink során azt feltételeztük, hogy azonos útvonalon történik a probiotikum keverék magatartásra gyakorolt védő hatásának kialakulása és ez a hatás a rövid szénláncú zsírsavak megváltozásának köszönhető, hisz ma már jelentős szakirodalma van az SCFAs fiziológias működésekben betöltött szerepének. Emellett igazolt, hogy jótékony hatással bírnak a GI traktus normál funkcióira, szabályozzák az immunmechanizmusokat, és már neuroaktív tulajdonságaikat is leírták. Mindezek ellenére, a vizsgálati eredményeink alapján, úgy tűnik, hogy nem a zsírsavak szintjén kell keresnünk a probiotikum hatásáért felelős közös utat. A fő SCFAs vizsgálata során a VPA-val kezelt és a kontroll állatok között nem sikerült szignifikáns eltéréseket detektálnunk, továbbá a probiotikum kezelést követően sem jelentkezett jelentős különbség az SCFAs mennyiségében és összetételében.

Mindazonáltal a széles spektrumú antibiotikum kezelés jelentősen lecsökkentette az ecetsav, butánsav és propionsav koncentrációját, mely arra utal, hogy az antibiotikum kezelés nagy mértékben képes volt redukálni a GI baktériumflóra mennyiségét. Annak ellenére, hogy az antibiotikum kezelést követő probiotikum kúra jelentősen megemelte az SCFAs koncentrációját a többi csoport eredményeivel összehasonlítva nem detektáltunk lényeges különbségeket, mindazonáltal feltételezhető, hogy a probiotikum keverék erősebb hatást vált ki az antibiotikumok használata következtében kialakuló diszbiózist követően, mint a kompakt, kezeletlen mikrobiom közösség esetén, amely jelen esetben a csak probiotikumok kapó csoport volt. A jelen konzekvenciák egyértelműen azt mutatják, hogy a 3 fő SCFAs koncentrációjának változása nem lehet az egyetlen ok-okozati komponens, amely meghatározza, hogy a probiotikum keverék hogyan fejti ki pozitív hatását a szociális magatartásra. Ezért úgy gondoljuk, hogy az általunk kevert probiotikum készítmény az SCFAs módosítása nélkül fejtette ki hatását és feltételezzük, hogy a szerotonerg rendszeren keresztül tudta visszaállítani mind az antibiotikumok, mind a VPA okozta magatartásban megnyilvánuló elváltozásokat.

V.3. A GI mikrobiom zsírsavtermelésben betöltött szerepe

Ma már egyértelműen tudjuk, hogy a fő rövid szénláncú zsírsavakat a bél mikrobiota termeli, emellett a hosszabb páratlan szénatomszámú zsírsavakat, mint például a C15:0 vagy C17:0 zsírsavakat is igazoltan baktériumok állítják elő. Jelenlegi eredményeink is megerősítik ezeket az állításokat és emellett további fontos telített és telítetlen zsírsavakat is feltártak, melyek feltételezhetően szintén a GI mikrobiom termeléshez kötöttek.

A hosszabb szénláncú telített zsírsavak vizsgálata során megállapítottuk, hogy e csoportba tartozó zsírsavak többségét a GI traktus baktériumai állítják elő, és nem csak a jelenlegi ismereteink alapján feltételezett páratlan szénatomot tartalmazó zsírsavakat, hanem a páros szénatomszámú zsírsavak nagy részét is. Az elágazó SAT csoporthoz tartozó zsírsavak koncentrációja is jelentős csökkenést mutatott az antibiotikum kezelést követően, ami megerősíti a közelmúltban a szakirodalom által leírt eredményeket, miszerint az elágazó szénláncú telített zsírsavak a fehérjék bakteriális lebomlásából származnak. A cMUFAs többsége a koncentráció meghatározása során szintén nagyfokú süllyedést mutatott az antibiotikum kezelés után, ezért feltételezzük, hogy a GI mikrobiom döntő szerepet tölt be e zsírsavak termelésében. Az analízisben részt vevő n-3 PUFAs és n-6 PUFAs csoportba tartozó legtöbb zsírsav esetében azonban nem detektáltunk koncentrációesést az antibiotikum kezelést követően, ez pedig szintén egybeesik a szakirodalomban leírtakkal, mely szerint ezekbe a csoportokba tartozó zsírsavaknak a mennyisége szoros összefüggést mutat a táplálékkal történő bevitellel. Újabb tanulmányok azt valószínűsítik hogy a C20:2n-6 és a C20:3n-6 mennyiségével összefüggést mutat a mikrobiom. Vizsgálataink során e két zsírsav mennyisége jelentősen lecsökkent az antibiotikum kezelést követően, ezért azt az elképzelést, mely szerint a GI baktériumok fontos regulátorai a C20:2n-6 és C20:3n-6 zsírsavak termelődésének eredményeink részben szintén bizonyítják.

Bizonyos probiotikus hatású baktériumfajokból álló keverék adásának hatását is szeretttük volna megvizsgálni a zsírsav spektrumra vetítve és eredményeink alapján azt gondoljuk, hogy az antibiotikum kezelést követően a rövid, 2 héten át tartó probiotikum kúra képes volt újra elindítani a baktérium populációk terjedését és ennek következtében pedig számos zsírsav koncentrációját is helyreállította. Mivel a probiotikum keverék nem tudta az összes általunk vizsgált zsírsav, antibiotikum kezelést következtében módosult koncentrációs szintjét helyreállítani a kezelés előtti állapothoz, ezért feltételezzük, hogy ezekben az esetekben más baktériumfajok, vagy további mikrobiális kölcsönhatásoknak a megléte elengedhetetlen e zsírsavak termelődésében, ilyen például a C6:0, C10:0, C11:0, C16:1n-9 és C16:1n-7. Azonban az antibiotikum kezelést követő probiotikum keverék alkalmazása azon zsírsavak többségében, melyek koncentrációjában változás következett be visszatért a kiindulási, antibiotikum kezelés előtti szinthez. Azonban jelenleg azt nem tudjuk, hogy pontosan melyik baktériumtörzsek képesek előállítani ezeket a zsírsavakat, de az eredményeink alapján feltételeztük, hogy a probiotikum keverékben található törzseknek döntő szerepe van ezeknek a zsírsavaknak (elágazó szénláncú telített zsírsavak és a legtöbb telített zsírsav, emellett számos cMUFAs) a

termelődésében, ezért ha ezeket a törzseket az antibiotikum kezelést követően alkalmazzuk, akkor a székletből nyert részletes zsírsavspektrumnak a jelentős mennyiséget helyre tudjuk állítani.

Mivel nemcsak az abszolút koncentrációk, hanem a zsírsavak egymáshoz viszonyított tömegszázalékos aránya is fontos információval szolgál, ezért hangsúlyt fektettünk a tömegszázalékos arányok meghatározására. Míg az antibiotikum kezelés következtében jelentős eltéréseket detektáltunk a tömegszázalékos arányok vizsgálata során, addig a probiotikum kúra után ezeknek az arányoknak a visszarendeződését tapasztaltuk. Tekintettel arra, hogy a tömegszázalék a zsírsavak egymáshoz viszonyított arányát mutatja meg, így a probiotikum keverék adagolását követően eredményeink azt demonstrálják, hogy a legtöbb zsírsav koncentrációjának helyreállása elégségesnek bizonyult a zsírsavak tömegszázalékos arányának normalizálódásához is.

A vizsgálatban résztvevő állatok ugyanazt a meghatározott zsírsavösszetételű rágszálótápot kapták a kísérlet során, ezért a tápban található zsírsavaknak a kezelése során bekövetkező változásait is nyomon tudtuk követni az egyes mintavételi időpontokban. A C18:2n-6 kivételével a tápban előforduló összes zsírsavnak csökkent a koncentrációja az antibiotikum kezelést követő időpontban és az ezt követő probiotikum kezelés ismét visszaállította a zsírsavak mennyiségét. Az a tény, hogy a folyamatos, táplálékkal bejutatott zsírsavak döntő többségének változik a mennyisége a bélflórát módosító kezeléseket követően egy fontos bizonyítékként szolgál arra, hogy a vizsgálataink során elemzett zsírsavak, melyeknek a mennyisége az antibiotikum hatására megváltozott és a probiotikum kezelést követően visszatért a GI rendszerben jelenlévő baktériumoknak köszönhető és nem annak, hogy külsőleg, a táplálkozás során kerülnek az emésztőrendszerbe.

VI. Összefoglalás

Az értekezés egyik fő céljának vizsgálata során kapott eredményeink megerősítik, hogy a felnőtt korban történő széles spektrumú antibiotikum kezelés a VPA autizmus állatmodellben megjelenő antiszociális viselkedéshez hasonló magatartást vált ki. Legjobb tudomásunk szerint ezek az eredmények az elsők a szakirodalomban, melyek alátámasztják, hogy specifikus, probiotikus hatású baktériumfajok keverékéből álló készítmény képes helyreállítani a normál szociális viselkedéstől eltérő társas magatartási mintázatokat mind a kettő vizsgált állatmodell esetében. Feltételezzük, hogy a probiotikum keverékünk egy közös, nem a rövid szénláncú zsírsavak módosításán keresztüli útvonalon fejtette ki jótékony hatását mindkét modell esetében, függetlenül attól, hogy az antibiotikum kezelés a bélflóra jelentős lecsökkentésének következtében a mikrobiom-bél-agy tengely mentén megjelenő módosulások eredményeképpen váltotta ki az antiszociális viselkedést, míg a VPA állatmodell, mely egy fejlődési modell teljesen másik útvonalon okozta ugyanezt a magatartást. Mindezek alapján kutatásaink eredményei megerősíteni látszanak azt a hipotézist, miszerint a GI mikrobiom homeosztatikus egyensúlya jelentősen befolyásolja a központi idegrendszer működését és ezen belül a szociális magatartást is.

Az értekezés másik fő kérdéscsoportjának vizsgálati eredményei ugyancsak az elsők közé tartoznak, melyek feltárják a GI mikrobiom felnőtt korban történő módosításának a részletes zsírsav spektrumra gyakorolt hatását. Eredményeink kimutatták, hogy a rövid szénláncú zsírsavakon kívül számos más telített és telítetlen zsírsav termelésében is kulcs szerepük lehet az intesztinális rendszer baktériumainak. A már bizonyítottan baktériumok által termelt transz és elágazó szénláncú telített zsírsavak megerősítése mellett eredményeink közvetett módon igazolták, hogy a feltételezésekkel ellentétben nem csak a páratlan-, hanem a páros telített szénláncú zsírsavak többségének termelésében is döntő szerepet töltenek be a GI baktériumok. Eredményeink rámutatnak, hogy a széles spektrumú antibiotikum kezelés jelentősen csökkenti a székletben mérhető zsírsavak mennyiségét, azonban az ezt követő specifikus probiotikus baktériumfajokból álló kezelés képes helyreállítani a zsírsav spektrum releváns hányadát. Emellett eredményeink felhívják a figyelmet a GI mikrobiom jelentősebb szerepére a zsírsavak termelésében és egy újfajta megközelítést nyújthatnak a zsírsavak arányának és mennyiségének megváltozásából eredő rendellenességek kezelésére.

Összességében az eredmények fontos bizonyítékot szolgáltatnak arról, hogy a GI mikrobiom modulálásának jelentős befolyásoló hatása van a zsírsavak mennyiségi és minőségi

összetételére és a szociális magatartásmintázatokra, mint azt korábban gondolták. Továbbá különféle specifikus probiotikus hatású baktériumfajok kombinációi képesek hatékonyan helyreállítani a diszbiózis következtében kialakuló zsírsav összetételbeli elváltozásokat és emellett a szociális viselkedésben megjelenő zavarok enyhítésében is hatékonyan bizonyulhatnak.

Reményeink szerint vizsgálataink hozzájárulhatnak a GI mikrobiom komplex, szerteágazó szabályozási rendszerének részletesebb megismeréséhez, s a jövőben új, a zsírsavak összetételének megváltozásából eredő rendellenességek és az autizmus spektrum zavarban jelenlévő szociális viselkedési zavarok gyógyítását célzó új terápiás eljárások kidolgozásához.

VII. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni mindenekelőtt témavezetőimnek, Prof. Dr. Karádi Zoltánnak, és Dr. Tóth Attilának belém vetett megtisztelő bizalmukért, szakmai iránymutatásukért, mindenkori támogatásukért és azért, hogy biztosították a munkámhoz a megfelelő háttérrel.

Köszönet illeti Prof. Dr. Lénárd Lászlót, a publikációk megírása során nyújtott segítségével, hasznos szakmai tanácsaiért.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Zelena Dórának a PTE ÁOK Élettani Intézet igazgatójának, hogy lehetővé tette a fokozat megszerzését.

Köszönöm továbbá Hormay Edinának, László Kristófnak, Kovács Anitának, Vizvári Zoltánnak, Cserjési Renátának, Péczely Lászlónak és Ollmann Tamásnak a kísérletek során nyújtott különféle, sokat jelentő segítségükért.

Kiemelt köszönettel tartozom Bufa Anitának, Marosvölgyi Tamásnak, Szabó Évának, Makszin Lillának a gázkromatográfiás vizsgálatok elvégzéséhez nyújtott rengeteg segítségükért, továbbá köszönöm Farkas Nellinek és Sipos Zoltánnak az adatok elemzéséhez nyújtott segítséget.

Hálás vagyok Kocsis Bála Tanár úrnak, Varga Adorjának és Kovács Krisztinának, akik nélkülözhetetlen segítséget nyújtottak a probiotikum keverék elkészítésében.

Külön köszönetet szeretnék mondani Fuchs Ildikónak, Gonda Ágnesnek, Győrfi Ninának, Géczi Fanninak, Wahr Mátyásnak, Gáspárné Bak Erikának, Kvak Erikának, Klunga Ákosnak és Wilhelm Ferencnek a kísérletek előkészítésében és kivitelezésében nyújtott nélkülözhetetlen és áldozatos munkájukért, technikai segítségükért.

Végül, de nem utolsósorban köszönetet szeretnék mondani családomnak, akik mindvégig bíztattak, mellettem álltak és megértően támogattak.

Munkám az alábbi pénzügyi támogatások segítségével valósult meg:

Proof of Principle PTE/101413-1/2019,

EFOP-3.6.1- 16-2016-00004, EFOP-VEKOP, TKP2

VIII. Publikációs jegyzék

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Mintál K, Tóth A, Hormay E, Kovács A, László K, Bufa A, Marosvölgyi T, Kocsis B, Varga A, Vizvári Z, Cserjési R, Péczely L, Ollmann T, Lénárd L, Karádi Z. Novel probiotic treatment of autism spectrum disorder associated social behavioral symptoms in two rodent models. *Scientific reports* (2022) 12:5399 **IF:4.6; D1**

Marosvölgyi T*, **Mintál K***, Farkas N, Sipos Z, Makszin L, Szabó É, Tóth A, Kocsis B, Kovács K, Hormay E, Lénárd L, Karádi Z, Bufa A. Antibiotics and probiotics-induced effects on the total fatty acid composition of feces in a rat model. *Scientific reports* (2024) 14(1):6542 **IF: várhatóan: 3.8; Q1**

Az értekezés alapját képező közlemények összesített impakt faktora: 8.4

Az értekezés alapjául szolgáló konferencia előadások, poszterek

Mintál K, Tóth A, Hormay E, Kocsis B, László K, Bufa A, Marosvölgyi T, Cserjesi R, Vizvári Z, Lénárd L, Karádi Z. Autism spectrum disorder associated behavioral symptoms and their relationship with the gastrointestinal microbiome. 7th Hungarian Neuroscience Doctoral Conference for Undergraduate Students, Graduate Students and Junior Post-Docs (HUNDOC) (2024) p. 71

Mintál K, Tóth A, Hormay E, Kocsis B, László K, Vizvári Z, Lénárd L, Karádi Z. Modifications of the gastrointestinal microbiome have crucial role in the control of social behavioural processes. MedPECS, Pécs (2023) 74 p. p. 46

Marosvolgyi T, **Mintál K**, Farkas N, Makszin L, Szabo E, Toth A, Kocsis B, Karadi Z, Bufa A. Antibiotic-induced effects on the fatty acid composition of faeces in a rat model. 15th International ISSFAL Congress (2023) p. 269

Mintál K, Tóth A, Hormay E., Kovács A, Varga A, Kocsis B, Bufa A, Marosvölgyi T, Lénárd L, Karádi Z. Modifications of the gastrointestinal microbiome are intimately involved in the control of behavioural processes. IBRO Workshop Budapest, (2022) 277 p. Paper: P7.01

Mintál K, Tóth A, Hormay E, Bufa A, Marosvölgyi T, Kovács A, Kocsis B, Varga A, Vizvári Z, Lénárd L, Karádi Z. Gasztrointesztinális mikrobiom szerepe a magatartási folyamatokban. Tavaszi Szél Konferencia (2022) Budapest, 799 p. p. 699

Mintál K, Tóth A, Hormay E, Bufa A, Marosvölgyi T, Kovács A, Kocsis B, Varga A, Vizvári Z, Lénárd L, Karádi Z. A gasztrointesztinális mikrobiom módosításának hatása a magatartási folyamatokra. EFOP-361-16-2016-00004 számú „Átfogó fejlesztések a Pécsi Tudományegyetemen az intelligens szakosodás megvalósítása érdekében” (2022)

Mintál K, Tóth A, Hormay E, Bufa A, Marosvölgyi T, Kovács A, Kocsis B, Varga A, Lénárd L, Karádi Z. Modifications of the gastrointestinal microbiome has huge impact on peripheral and central nervous processes. 8th Central European Congress on Obesity Virtual conference (2021) pp. 61.

Mintál K, Marosvölgyi T, Tóth A, Karádi Z, Bufa A. A gasztrointesztinális mikrobiom módosításának hatása a rövid szénláncú zsírsavak mennyiségére. METT25 a Magyar Elvlasztástudományi Társaság jubileumi konferenciája Pécs, (2021) pp. 78. Paper: P-14

Mintál K, Tóth A, Kovács A, Hormay E, Varga A, Kocsis B, Bufa A, Marosvölgyi T, Lénárd L, Karádi Z. Modification of the gastrointestinal microbiota has huge impact on behavioral responses. IBRO Workshop (2020) Paper: 48

Mintál K, Tóth A, Kovács A, Hormay E, Varga A, Kocsis B, Bufa A, Marosvölgyi T, Lénárd L, Karádi Z. The gastrointestinal microbiome has crucial role in the control of behavioral processes. FENS Virtual Forum 2020

Mintál K, Kovács A, Tóth A, Hormay E, Varga A, Kocsis B, Lénárd L, Karádi Z. A gasztrointesztinális traktus mikroba flóra változásának magatartási folyamatokra gyakorolt hatása. Tavaszi Szél Konferencia, Debrecen, (2019) 742 p. pp. 557-557.

Mintál K, Kovács A, Tóth A, Hormay E, Varga A, Kocsis B, Bufa A, Marosvölgyi T, Lénárd L, Karádi Z. The effect of modifications of the gastrointestinal microbiota on behavioral processes. MedPECS Pécs, (2019) 87 p. p. 52, 1 p.

Az értekezéshez szorosan nem kapcsolódó egyéb közlemények

Gyorfí N, Gal AR, Fincsur A, Kalmar-Nagy K, **Mintál K**, Hormay E, Miseta A, Tornoczky T, Nemeth AK, Bogner P, Kiss T, Helyes Zs, Sari Z, Klincsik M, Tadic V, Lenard L, Vereczkei A, Karadi Z, Vizvari Z, Toth A. Novel Noninvasive Paraclinical Study Method for Investigation of Liver Diseases. *Biomedicines* (2023) 11(9):2449 **IF:4.7; Q1**

Vörös D, Kiss O, Ollmann T, **Mintál K**, Péczely L, Zagoracz O, Kertes E, Kállai V, László BR, Berta B, Tóth A, Lénárd L, László K. Intraamygdaloid Oxytocin Increases Time Spent on Social Interaction in Valproate-Induced Autism Animal Model. *Biomedicines* (2023) 11(7):1802 **IF:4.7; Q1**

László K, Vörös D, Kiss O, László B, Ollmann T, Péczely L, **Mintál K**, Tóth A, Kovács A, Zagoracz O, Kertes E, Kállai V, Berta B, Karádi Z, Lénárd L. The Role of Intraamygdaloid Oxytocin and D2 Dopamine Receptors in Reinforcement in the Valproate-Induced Autism Rat Model. *Biomedicines* (2022) 10(9):2309 **IF: 4.7; Q1**

László K, Kiss O, Vörös D, **Mintál K**, Ollmann T, Péczely L, Kovács A, Zagoracz O, Kertes E, Kállai V, Laszló B, Hormay E, Berta B, Toth A, Karadi Z, Lenard L. Intraamygdaloid Oxytocin Reduces Anxiety in the Valproate-Induced Autism Rat Model. *Biomedicines* (2022) 10(2):405. **IF: 4.7; Q1**

László BR, Hormay E, Szabó I, **Mintál K**, Nagy B, László K, Péczely L, Ollmann T, Lénárd L, Karádi Z. Disturbance of taste reactivity and other behavioral alterations after bilateral interleukin-1 β microinjection into the cingulate cortex of the rat. *Behavioural Brain Research* (2020) 383:112537 **IF: 3.332; Q2**

Hormay E, László BR. Szabó I, Ollmann T, Nagy B, Péczely L, **Mintál K**, Karádi Z. The effect of loss of the glucose-monitoring neurons in the anterior cingulate cortex: physiologic

challenges induce complex feeding-metabolic alterations after local streptozotocin microinjection in rats. *Neuroscience Research* (2019) 149:50-60 **IF: 2.645; Q1**

Az értekezéshez szorosan nem kapcsolódó egyéb konferencia előadások, poszterek

Vörös D, Kiss O, Ollmann T, **Mintál K**, Péczely L, Zagoracz O, Kertes E, Kállai V, László B, Berta B, Tóth A, Lénárd L, László K. Effect of intraamygdaloid oxytocin on social interaction in valproate-induced autism model. International Neuroscience Conference, Pécs, (2024) 302 p. p. 237 Paper: P8.09

László K, Vörös D, Kiss O, László B, Ollmann T, Péczely L, **Mintál K**, Tóth A, Kovács A, Zagoracz O, Kertes E, Kállai V, Berta B, Karádi Z, Lénárd L. The intraamygdaloid oxytocin ameliorates some autistic-like symptoms in valproate-induced autism rodent model. International Neuroscience Conference, Pécs, (2024) 302 p. p. 20 Paper: S2.04

Hormay E, **Mintál K**, László BR, Szabó I, Tóth A, László K, Györfi N, Lénárd L, Karádi Z. Long term saccharose consumption associated activity of limbic forebrain glucose-monitoring neurons: A pilot study in the rat. International Neuroscience Conference, Pécs (2024) p. 129 Paper: P3.03

Hormay E, **Mintál K**, László RB, Szabó I, Tóth A, László K, Györfi N, Lénárd L, Karádi Z. Different aspects of the taste reactivity test to interpret gustatory responses elicited organismic changes. 7th Hungarian Neuroscience Doctoral Conference for Undergraduate Students, Graduate Students and Junior Post-Docs (HUNDOC) (2024) p. 48 Paper: 35

Hormay E, **Mintál K**, László B, Szabó I, Tóth A, László K, Györfi N, Karádi Z. The complex relationship of glucose and neural activity in the light of limbic forebrain glucose-monitoring neurons. MedPECS, Pécs (2023) 74 p. p. 51

Vizvári Z, Györfi N, **Mintál K**, Karádi Z, Tóth A, Sári Z, Odry P, Eigner Gy, Kovács L, Léner V, Hámori L, Füredi A. Non-invazív, bioimpedancia alapú mérőeszköz fejlesztése primer daganat kimutatására. Orvosbiológiai kérdések - multidiszciplináris, bioimpedancia alapú válaszok: A PTE Anyagcserez szabályozás és Bioimpedancia Kutatócsoport publikáció gyűjteménye, konferenciakötet, Pécs, (2022) pp. 49-58.

Mintál K, Vizvári Z, Hormay E, Kovács A, Bufa A, Marosvölgyi T, Lénárd L, Karádi Z, Tóth A. A gasztrointesztinális mikrobiom jelentős lecsökkentése testösszetétel módosítása nélkül

indukál viselkedési változásokat. Orvosbiológiai kérdések - multidiszciplináris, bioimpedancia alapú válaszok: A PTE Anyagcserezés szabályozás és Bioimpedancia Kutatócsoport publikáció gyűjteménye, konferenciakötet Pécs, (2022) pp. 95-101.

Laszlo K, Kiss O, Voros D, **Mintál K**, Ollmann O, Peczely L, Kovacs A, Zagoracz O, Kertes E, Kallai V, Laszlo B, Berta B, Toth A, Karadi Z, Lenard L. Behavioural effects of intraamygdaloid oxytocin in valproate induced autism rat model IBRO Workshop Budapest, (2022) 277 p. Paper: P7.03

László B, Hormay E, Szabó I, **Mintál K**, László K, Péczely L, Ollmann T, Lénárd L, Karádi Z. Effects of interleukin-1 β microinjection in the anterior cingulate cortex of the rat. IBRO Workshop Budapest, (2022) 799 p. p. 717

Hormay E, **Mintál K**, László B, Szabó I, Tóth A, Karádi Z. Előagyi glukóz-monitorozó neuronok sokrétű működési sajátosságai. XXV. Tavaszi Szél Konferencia 2022. Budapest, (2022) 799 p. p. 717

Hormay E, **Mintál K**, László B, Tóth A, Karádi Z. Előagyi glukóz-monitorozó neuronok hosszútávú cukorfogyasztás után. EFOP-361-16-2016-00004 számú „Átfogó fejlesztések a Pécsi Tudományegyetemen az intelligens szakosodás megvalósítása érdekében” (2022)

László, BR, Hormay E, Szabó I, **Mintál K**, László K, Péczely L, Ollmann T, Lénárd L, Karádi Z. Cinguláris kérgi interleukin-1 β mikroinjekció metabolikus és magatartási hatásai patkányban. EFOP-361-16-2016-00004 számú „Átfogó fejlesztések a Pécsi Tudományegyetemen az intelligens szakosodás megvalósítása érdekében” (2022)

Mintál K, Vizvári Z, Hormay E, Kovacs A, Bufa A, Marosvolgyi T, Lenard L, Karadi Z, Toth A. Gastrointestinal microbiome depletion modifies behavioral processes without changing body composition. 15th International Symposium on Applied Computational Intelligence and Informatics (SACI), Budapest (2021) pp. 000119-000122. 4p

Hormay E, László B, Szabó I, **Mintál K**, Karádi Z. The role of limbic forebrain glucose monitoring neurons in the body weight regulation. Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences (2021) Pécs, 128 p. pp. 105-105.

Hormay E, **Mintál K**, László B, Szabó I, Tóth A, Karádi Z. Characteristic complex nature of the forebrain glucose-monitoring neurons. 8th Central European Congress on Obesity Virtual conference (2021) pp. 59-60.

László BR, Hormay E, Szabó I, **Mintál K**, László K, Péczely L, Ollmann T, Lénárd L, Karádi Z. Behavioral alterations after bilateral microinjection of interleukin-1 β into the cingulate cortex of the rat. IBRO Workshop (2020) Paper: 47

Mintál K, Tóth A, Kovács A, Hormay E, Varga A, Kocsis B, Vizvári Z, Lénárd L, Karádi Z. Gastrointestinal microbiome changes directly connect to the control of behavioral processes which could be verified by means of a new bioimpedance measurement. Engineering in Medicine & Biology Society International Student Conference: EMBS ICS (2020)

Hormay E, Csetényi B, Szabó I, **Mintál K**, Karádi Z. The role of limbic forebrain glucose monitoring neurons in the body weight regulation. Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences Pécs (2020) 83 p. pp. 58-58. 1 p.

Mintál K. A gasztrointesztinális traktus mikroba flórájának Parkinson-kórban és kognitív működésekben betöltött szerepe. Grastyán konferencia, Pécs, 2019

Hormay E, László B, Szabó I, **Mintál K**, Karádi Z. Glucose-monitoring neurons in the cingulate cortex of the rat. – Microelectrophysiological study. 16th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society, (2019) p. 19

László B, Hormay E, Szabó I, **Mintál K**, Karádi, Z. Taste reactivity alterations after interleukin-1 β microinjection into the cingulate cortex of the rat. 16th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society, (2019) p. 55

Tóth A, Vizvári Z, Gál AR, Kovács A, **Mintál K**, Klincsik M, Sári Z, Odry P, Vereczkei A, Kalmár Nagy K, Bajnok L, Gergics M, Németh A, Bogner P, Fincsur A, Miseta A, Lénárd L, Karádi Z. A nem alkohol eredetű zsírmáj bioimpedancia alapú diagnosztikai módszer kifejlesztését célzó összehasonlító klinikai vizsgálata. Magyar Anatómus Társaság Budapest, (2019) p. 105

Csetényi B, Hormay E, Szabó I, **Mintál K**, Karádi Z. Az interleukin-1 β íz-percepciót módosító hatása patkány cinguláris kérgében. Budapest, Magyarország: Doktoranduszok Országos Szövetsége (DOSZ) (2018) 519 p. p. 403 , 1 p.

Csetényi B, Hormay E, Szabó I, **Mintál K**, Karádi Z. Íz-reaktivitás változások patkány cinguláris kérgébe adott interleukin-1 β hatására. Magyar Élettani Társaság Vándorgyűlése, Szeged, (2018) Paper: P1.44

Gál AR, Tóth A, Vízvári Z, Kovács A, **Mintál K**, Klincsik M, Sári Z, Odry P, Vereczkei A, Kiss T, Fincsur A, Miseta A, Lénárd L, Karádi Z. A nem alkohol eredetű zsírmáj új típusú diagnosztikai módszer kifejlesztését célzó összehasonlító vizsgálata patkányban. *Obesitologia Hungarica* (2018) 17:1 pp. 18-19

Tóth A, Vízvári Z, Gál RA, Kovács A, **Mintál K**, Klincsik M, Sári Z, Odry P, Vereczkei A, Lénárd L, Karádi Z. A máj zsírosodásának mérése új típusú non-invazív bioimpedancia mérőeszközzel. Magyar Élettani Társaság Vándorgyűlése, Szeged, (2018) Paper: P2.30

Tóth A, Vízvári Z, Gál RA, Kovács A, **Mintál K**, Klincsik M, Sári Z, Odry P, Vereczkei A, Németh AA, Fincsur A, Miseta A, Lénárd L, Karádi Z. A nem alkohol eredetű zsírmáj új típusú diagnosztikai módszer kifejlesztését célzó összehasonlító klinikai vizsgálata (vegyes beteganyagon). *Obesitologia Hungarica* (2018) 17:1 p. 19

Tóth A, Amiri Z, Vízvári Z, Karádi K, **Mintál K**, Lénárd L, Karádi Z, Cserjési R. Prebiotikum mediálta figyelmi válasz változás, egészséges humán populációban. A Magyar Élettani Társaság és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság közös Vándorgyűlése, Debrecen, 2017

Tóth A, Amiri Z, Vízvári Z, **Mintál K**, Lénárd L, Karádi Z, Cserjési R. Prebiotic-mediated changes in the attention in healthy human population. IBNS; Hiroshima, 2017

Az értekezés alapját képező közlemények összesített impakt faktora: 8.4

A publikációk összesített impakt faktora: 33.177

Független citáció: 30

Hirsch index: 3