

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Mikrokapszulákban alkalmazott kitozán
kölsönhatásának vizsgálata probiotikus
baktériumokkal**

Dr. Erdélyi Lóránd József

Témavezető: Dr. Váradi Judit



DEBRECENI EGYETEM

Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2023

**Mikrokapszulákban alkalmazott kitozán kölcsönhatásának vizsgálata probiotikus
baktériumokkal**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban*

Írta: Dr. Erdélyi Lóránd József okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája
(Farmakológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Váradi Judit

Az értekezés bírálói:

Dr. Ambrus Rita PhD

Dr. Lekli István PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Majoros László PhD

tagok: Dr. Ambrus Rita PhD

Dr. Lekli István PhD

Dr. Paholcsek Melinda PhD

Dr. Almási Attila PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK Belgyógyászati Intézet A épület tanterme

2023. június 19. 10:00 óra

Tartalom

Tartalom	3
1. Bevezetés.....	4
2. Célkitűzések	6
3. Anyagok és módszerek.....	8
4. Eredmények.....	11
4.1. Termotolerancia teszt száraz és nedves hőkezelés mellett	11
4.2. Az eltartás hatása az életképességre	11
4.3. A bevont és bevonat nélküli mikrokapszulák jellemzése	11
4.4. Elemi spektroszkópia.....	12
4.5. Kioldódási vizsgálatok	12
4.6. A leoldódó kitozán bevonat mennyiségének meghatározása	13
4.7. Sejtfelszabadulási profilok és élő/holt sejtek meghatározása.....	13
4.8. MIC érték meghatározása és Time-kill Assay.....	14
4.9. Membránintegritási vizsgálat	14
4.10. Zéta potenciál meghatározása a baktériumsejt felszínén	15
4.11. A kitozán-sejtmembrán kölcsönhatás vizsgálata konfokális mikroszkóppal.....	15
5. Megbeszélés	16
Összefoglalás.....	23
A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények.....	25
Köszönetnyilvánítás	26

1. Bevezetés

Definíció szerint, probiotikumnak tekinthetők azok az élő mikroorganizmusok, amelyek megfelelő mennyiségben adva jótékony hatással vannak a szervezetre. Azaz a probiotikumok alatt olyan, a szervezet számára előnyös, nem patogén, élő mikroorganizmusokat értünk, amelyek vagy jelen vannak a normál flóra részeként, vagy segítenek annak helyreállításában egy azt érő negatív behatás után.

A probiotikumok felhasználása egyre nagyobb teret hódít az állattartásban és a takarmányozásban. A Föld népessége rohamosan nő, az állattenyésztésnek és a mezőgazdaságnak ezt követnie kell az élelmiszer-ellátás érdekében. A termelékenység növelésére évtizedeken keresztül alkalmaztak a subterápiás dózisban antibiotikumokat, például tetraciklin származékokat. Amennyiben ezt rövidtávon vizsgáljuk, azt a megállapítást tehetjük, hogy egy nagyon jó és előnyös lépés volt az antibiotikumok bevonása a takarmányozásba. Azonban, ha ennek az antibiotikum felhasználási módnak a hosszútávú és globális hatásait tekintjük, rögtön szembetűnik a módszer árnyoldala. A subterápiás dózisú antibiotikumnak nem lesz terápiás értékű baktericid vagy bakteriosztatikus hatása, azonban a kórokozók lényegében a minimális gátló koncentráció (MIC) érték alatti dózisban találkozhatnak az antibiotikummal, ami melegágya a gyors rezisztencia kialakulásának. Az 1980-as évek óta lelassult antibiotikum fejlesztés és a jelenleg ismert és használt antibiotikumok ellen egyre nagyobb számban megjelenő rezisztens vagy multirezisztens baktérium fajok, nem arra engednek következtetni, hogy a jelenlegi antibiotikum politikával hosszú távon győzelemre állnánk a mikroorganizmusokkal szemben. Ezért is lenne előnyös, ha olyan probiotikus fajokat használnánk az állattartásban, amelyek lényegében úgy növelik a tenyésztés hozamát, hogy közben nem szelektálnak ki patogén törzseket sem és az antibiotikum rezisztenciát sem eredményeznek.

Az ember-állat-ökoszisztéma mikrobiomjaik révén folyamatos kölcsönhatásban vannak egymással. Az Egy Egészség Európai Közös Program (OHEJP) az Európai Bizottság által társfinanszírozott, tudományos együttműködésen alapuló kutatási program, amelynek célja, hogy az élelmiszerekből származó zoonózisok, az antimikrobiális rezisztencia és az újonnan megjelenő mikrobiológiai veszélyek elleni közös fellépések révén segítse megelőzni és ellenőrizni az emberi egészséget befolyásoló, élelmiszer eredetű és környezeti szennyeződések. Az ember-állat-ökoszisztéma határfelületén jelentkező egészségügyi

veszélyek és kockázatok felismerése, értékelése és kezelése csak globálisan, több szakterület összefogásával lehetséges.

2. Célkitűzések

PhD kutatómunkám célja:

1. Probiotikus baktérium törzsek (*E. faecium*, *B. bifidum*, *L. plantarum*) életképességének vizsgálata és annak növelése, az állati takarmányok formulálásakor fellépő hőhatások és az *in vivo* gasztointesztinális traktusban megjelenő körülmények között. Alginát alapú mikrokapszula formulálása, amely a probiotikus törzsek hordozó rendszereként funkcionál. A probiotikus mikrokapszulák sav -és hőrezisztenciáját kitozán bevonással terveztük javítani. Vizsgálni kívánjuk a sejtek életképességét és termotoleranciáját száraz és nedves hőkezelés mellett.

A kutatómunka kezdeti szakaszában kapott nem várt eredmények miatt a további vizsgálatainkat kizárólag a *L. plantarum* tartalmú mikrokapszulákkal végezzük.

2. A nem várt eredmények feltárása érdekében a *L. plantarum* tartalmú mikrokapszulákat nemcsak kitozán bevonattal, hanem a mikrokapszulák egy másik csoportját Eudragit L100-55 bevonattal látjuk el. A bevonás hatékonyságának és intakt jellegének vizsgálatához a bevonat nélküli és a bevonattal rendelkező mikrokapszulák jellemzését fény- illetve fluoreszcens mikroszkóppal, valamint a felületi jellemzők vizsgálatát pásztázó elektronmikroszkóppal (Scanning Electron Microscope, SEM) terveztük elvégezni. Az elemanalízis elvégzése, hogy meghatározzuk a mikrokapszulák felületén kialakult bevonat minőségét.
3. Az *in vivo* körülmények modellezésére kioldódási vizsgálatokat végzünk mesterséges gyomor- és bélnedvben a bevonataiban különböző mikrokapszula formulációkkal. A kioldódási kísérlet mintáit kétféle módszerrel tervezzük vizsgálni. A minta leoltását követően CFU meghatározással az életképességet, áramlási citometriával pedig az élő/holt sejtek arányát, illetve a sejtek felszabadulási profilját határozzuk meg.
4. A vizsgálataink során alkalmazott kis molekulatömegű kitozánt FITC-el jelöljük, hogy meghatározzuk a leoldódó kitozán mennyiségét.
5. A további vizsgálatainkat három, különböző molekulatömegű kitozánnal végezzük (LMW, MMW, HMW) hogy megvizsgáljuk az eddigi eredmények alapján feltételezhető interakciót a baktérium sejtek és a kitozán között. Mindhárom kitozánnal *L. plantarum*-ra meghatározzuk a MIC értéket, majd ezt követően megvizsgáljuk az ölési kinetikát, valamint ugyanezen mintákkal áramlási citometriával az élő/holt sejtek

arányát.

6. Fontosnak tartjuk megismerni a kitozán interakcióját *L. plantarum* sejtekkel, hogy érthetővé váljon az antibakteriális hatás mechanizmusa, melyet a koncentráció és a kitozán molekulatömegének függvényében vizsgálunk. Ezen mechanizmus elemzésére membránintegritást, és zéta potenciál változást vizsgálunk. Konfokális mikroszkópiával a FITC-eljelölt kitozán alkalmazásával vizualizáljuk a kitozán interakcióját a *L. plantarum* sejtfallal.

3. Anyagok és módszerek

Vizsgálataink során három probiotikus baktérium fajt használtunk, a *L. plantarum* subsp. *plantarum* (ATCC 14917) az ATCC (American Type Culture Collection) -től (Manassas, VA, USA) származott, a *B. bifidum*-ot és az *E. faecium*-ot, Dr. Remenyik Judit (Debreceni Egyetem Élelmiszer technológiai Intézet, Debrecen) biztosította számunkra. Az alacsony molekulatömegű kitozánt (50–190 kDa; 20–300 cp; LMW), közepes molekulatömegű kitozánt (200–800 cp; MMW), nagy molekulatömegű kitozánt (310–375 kDa; 800–2000 cp; HMW) a Sigma-Aldrich-től szereztük be.

Három probiotikus baktérium törzs – *L. plantarum*, *B. bifidum* és *E. faecium* – felhasználásával egykomponensű alginát mikrokapszulákat készítettünk, melyet LMW kitozánnal vontunk be és liofileztük. A mikrokapszulák másik részét liofilezést követően gyomornedv rezisztens Eudragit L-100-55-tel vontuk be. A mikrokapszulák előállítása és bevonása a Gyógyszer technológiai Tanszéken történt. A fluidizációs eljárás Dr. Haimhoffer Ádám és Dr. Gál Bernadett segítségével történt.

A 3.2. fejezetben leírtak szerint előállított alginát alapú mikrokapszulákba ágyazott *L. plantarum* tárolási idejének a baktérium életképességére gyakorolt hatását vizsgáltuk. A liofilezés során kapott száraz mikrokapszulákat 4 °C-on tároltuk. A kísérletben csak a bevonat nélküli alginát mikrokapszulákból végeztünk kioldást és leoltást a mikrokapszula előállításától számított 10., 25., 45. és 75. napon. Azonos mennyiségű, 25 mg bevonat nélküli alginát mikrokapszulát 500 µl steril fiziológiás sóoldatban, 60 percig, 37 °C-os termosztátban mozgattuk. Majd a mintákat 1000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltunk 1 percig, a felülszorból gyűjtött mintákat átadtuk az Orvosi Mikrobiológiai Intézetben Dr. Kovács Renátónak CFU meghatározásra. A CFU meghatározást a 3.5. módszerleírás szerint végezték.

A nedves mikrokapszulák morfológiáját fénymikroszkóppal és fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A száraz mikrokapszulák méretét és morfológiáját pásztázó elektronmikroszkóppal jellemeztük (SEM). A SEM felvételek és az elemanalízis a Debreceni Egyetem Műszaki Karán készültek, Budai István segítségével.

A probiotikus baktériumok termotoleranciáját száraz hővel 80 °C-on 10 percig és 100 °C-on 5 percig peptonvizes közegben 80 °C-on 1 percig vizsgáltuk és peptonvízben kioldást végeztünk, majd meghatároztuk a CFU értéküket.

A mikrokapszulák kioldódási vizsgálatát szimulált gastrointestinális folyadékban végeztük. Ebben a kísérletben csak a *L. plantarum* tartalmú mikrokapszulákkal dolgoztunk. A

mikrokapszulákat három csoportra osztottuk bevonat nélküli alginát; kitozánnal bevont és Eudragit L100-55 bevont minták. A mikrokapszulákat Torpac® zselatin kapszulákba töltöttük, a mikrokapszula csoportokat további két részre osztottuk, Eudragit L100-55-tel bevont és bevonat nélküli zselatin kapszulákra. A kioldódási vizsgálatot mesterséges gyomor- (pH 2,0) és bélnedvekben (pH 7,4) végeztük. A pH 2,0 közeget 60 perc elteltével eltávolítottuk, és mesterséges bélnedvre cseréltük melyben szintén 60 percig végeztük a kioldást. A zselatin kapszulák töltésében és bevonásában Dr. Gál Bernadett és Dr. Vasvári Gábor volt segítségemre. A *L. plantarum* felszabadulását a mikrokapszulából szimulált gyomor- (pH 2,0) és bélnedvben (pH 7,4) vizsgáltuk. A savas oldóközeg pH-ját 60 perces kioldást követően nátrium-hidroxiddal a pH-t 7,4-re állítottuk be. További mintákat a teljes kioldási idő 120., 180. és 240. percében vettünk. A mintákat centrifugáltuk és felszabaduló baktériumsejteket SYTOX Green reagenssel festettük és áramlási citométerrel vizsgáltuk. A felszabadult sejtszámot és az élő/holt sejtek arányát GraphPad Prism 5.0 szoftverrel értékeltük. Az áramlási citometriás méréseket a Gyógyszertechnológiai Tanszéken végeztük, Dr. Fenyvesi Ferenc segítségével.

A kitozán FITC-el történő jelöléséhez a kitozánt 0,1 M ecetsavoldatban feloldottuk, a FITC-t metanolban. A savas vizes oldathoz FITC oldatot adtunk. A reakcióelegyet 3 órán át sötétben tartottuk, és a FITC-el jelölt kitozánt 1 M NaOH-dal kicsaptuk. A csapadékot szűrtük és ionmentesített vízzel dializáltuk. A dialízissal tisztított terméket ezután fagyasztva szárítottuk. A jelölés hatékonyságát fluorimetriásan határoztuk meg. A kitozán FITC jelölését Dr. Bakai Bereczki Ilona végezte a Debreceni Egyetem Gyógyszerésztudományi Kar Gyógyszerészi Kémiai Tanszékén. A tisztítási folyamatot és a jelölési hatékonyság meghatározását a Gyógyszertechnológiai Tanszéken végeztük.

A FITC-el jelölt kitozánt használtunk a mikrokapszula kitozán bevonatának mennyiségi meghatározására és a konfokális mikroszkópos vizsgálatokhoz.

Mikrodilúciós vizsgálat során meghatároztuk a MIC értéket és CFU-meghatározással ölési kinetikai vizsgálatot végeztünk a különböző koncentrációjú és molekulatömegű kitozán oldatokkal. A vizsgálatokat a DE ÁOK, Orvosi Mikrobiológiai Intézetében Dr. Kovács Renátó végezte. A "Time-kill Assay"-vel (ölési kinetika) kapott összes mintát áramlási citometriával is elemeztük. A citometriás méréseket a Gyógyszertechnológiai Tanszéken végeztük, Dr. Fenyvesi Ferenc segítségével.

A *L. plantarum* membránintegritását a felszabaduló anyagok 260 nm-en történő mérésével vizsgáltuk. Különböző koncentrációjú és molekulatömegű kitozán oldatokat adtunk a baktérium szuszpenziókhöz 1:1 térfogatarányban. A metabolikus anyagok felszabadulását

mikroplate leolvasón, 260 nm-en mértük, 10 percenként, 3 órán át. Ugyanezzel a mintaelőkészítéssel zéta potenciál meghatározást is végeztünk Malvern Nano-ZS Zetasizer készüléken, azonban a mintákat mostuk, centrifugáltuk a főlegben lévő kitozán eltávolítására.

Különböző koncentrációjú kitozán oldatokat kevertünk össze baktériumszuszpenzióval 1:1 térfogatarányban és a mintákat 37 °C-on 60 percig inkubáltuk. A kitozán koncentrációjának a 25%-át FITC-el jelölt kitozánból mértük, a felesleges FITC-kitozánt centrifugálással eltávolítottuk. A baktérium sejtmembránját FM[®]4-64 festékkel festettük. A konfokális mikroszkópos felvételek elkészítésében a DE ÁOK Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetében Dr. Vámosi György volt segítségünkre.

4. Eredmények

4.1. Termotolerancia teszt száraz és nedves hőkezelés mellett

A különböző probiotikus baktériumok hőtoleranciáját három különböző hőexpozíciós protokoll mellett vizsgáltuk. Mindhárom körülménynél megállapítható, hogy a *L. plantarum* és a *B. bifidum* hasonló érzékenységet, míg az *E. faecium* eltérő érzékenységi mintázatot mutatott a bevonat nélküli és kitozánnal bevont mikrokapszulák esetében.

A peptonvízben történő nedves hőterhelés hatására a *L. plantarum* és a *B. bifidum* túlélési aránya bevonat nélküli mikrokapszulákban $13,33 \pm 0,023\%$ és $16,66 \pm 0,59\%$, míg a kitozánnal bevont mikrokapszulákban $0,33 \pm 0,045\%$ és $0,03 \pm 0,008\%$ volt. Az *E. faecium* túlélési aránya a bevonat nélküli mikrokapszulákban $0,36 \pm 0,042\%$, míg a kitozánnal bevont mikrokapszulákban $5,36 \pm 0,87\%$ volt nedves hőterhelés után.

4.2. Az eltartás hatása az életképességre

A CFU értékek időben változását logaritmikus létékű görbén ábrázoltuk. A t_0 időpontnak a nedves mikrokapszulák elkészülésének napját vettük, melynek során a *L. plantarum* sejteket az alginát oldatba kevertük. A mikrokapszulák liofilezését követően a mintákat $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk el. A probiotikus baktériumok életképessége a tárolás során változik, azért a bevonat nélküli alginát csoportból felvettünk egy tárolási idő – CFU görbét, melyen a tárolási idő függvényében követtük a sejtek életképességének változását. Az egyes kísérleteinkben kapott “nyers” CFU értékeket a minta tárolási idejének figyelembevételével kerültek átszámításra százalékos értékben.

4.3. A bevont és bevonat nélküli mikrokapszulák jellemzése

A nedves alginát mikrokapszulák alakjának és méretének elemzését az előállítás után fénymikroszkóppal végeztük. A nedves alginát mikrokapszula átmérőjének átlagos értéke $412,54 \pm 28,83\text{ }\mu\text{m}$ volt, $150\text{ }\mu\text{m}$ -es fűvóka használatával. A nedves mikrokapszulák alakja izometrikus, közel gömb alakú, héjjal körülvett.

A mikrokapszulák fagyasztva szárítása után a szilárd részecskék méretét SEM-mel határoztuk meg. A bevonat nélküli alginát mikrokapszulák átlagos átmérője $187,21 \pm 24,36\text{ }\mu\text{m}$, a kitozánnal bevont $203,5 \pm 31,98\text{ }\mu\text{m}$, az Eudragit bevonatúaké pedig $312,6 \pm 50,36\text{ }\mu\text{m}$ ($n = 50,36\text{ }\mu\text{m}$). A szárított mikrokapszulák felülete enyhén érdes, bordázott, ami szabálytalanná

teszi a felületet, alakja szinte izometrikus, helyenként enyhén megnyúlt a szárítás során kialakuló írek miatt. A kitozánnal bevont mikrokapszulák felülete kissé bordázott, az Eudragit L100-55 bevonatú minták felülete szinte sima volt.

4.4. Elemi spektroszkópia

A bevonat hatékonyságának ellenőrzésére a mikrokapszulák felületét fotoelektron spektroszkópiával vizsgáltuk. A bevonat nélküli mikrokapszula felületének spektrumát elemezve, megerősíthetjük a kalcium jelenlétét. A mikrokapszulák előállításához nátrium-alginátot használtunk, amit kalcium-kloridban gélesítettünk. A spektrum azonban nem mutatott Na jelet, ami az alginát megfelelő kicsapódására és térhálósodására utal. A kitozán bevonást követően a kalcium és a klór jelintenzitása szignifikánsan csökkent, ami hatékony kitozán lefedettségre utal. A röntgenanalízis megerősítette, hogy a kitozán spektrumában a fő csúcsok a (C) és (O), amelyek megegyeznek a kitozán fő elemtartalmával. Az Eudragittal bevont mikrokapszula felületének a kalcium jele eltűnt, de a C és O jelei felerősödtek. A felületről végzett elemanalízisek alapján feltételezhetjük a megfelelő és hatékony bevonatot a kitozán és az Eudragit esetében is.

4.5. Kioldódási vizsgálatok

Vizsgáltuk az oldószeres közeg pH-jának hatását a különböző bevonatokra, illetve a bevonat hatását a *L. plantarum* %-os túlélési arányára. Az oldást 60 percig végeztük mindegyik oldóközegben. A pH 2,0-s közegű kioldódásvizsgálatot követő feloldás során az Eudragit L100-55 bevonatú zselatin kapszulák felülete nem duzzadt és nem volt látható az oldódás makroszkopikus jele. A bevonat nélküli zselatin kapszulák azonban savas közegben duzzadni kezdtek. 60 perc elteltével a pH 2,0-es kioldóközeget pH 7,4-es közegre cseréltük, ekkor a bélben oldódó bevonatú zselatin kapszulák feloldódása is megkezdődött és a zselatin duzzadása volt megfigyelhető. Az Eudragit L100-55 bevonatú zselatin kapszulába töltött alginát mikrokapszuláknál a túlélésében nem volt szignifikáns különbség ($89,81 \pm 5,64$) a kontrollhoz képest. Hasonlóképpen, nem figyeltünk meg különbséget a túlélésben az Eudragit L100-55-tel bevont mikrokapszulák esetében a kontrollokhoz képest ($95,09 \pm 4,73$), illetve az Eudragit L100-55-tel bevont zselatin kapszulát vizsgálva ($99,09 \pm 9,27$). A kitozán bevonatú minták oldódási vizsgálata során a *L. plantarum* életképességét teljesen gátolta, így a túlélési arány mindkét zselatin kapszulába töltve gyakorlatilag nulla volt.

4.6. A leoldódó kitozán bevonat mennyiségének meghatározása

Tekintettel a jelölési hatékonyságra és a bevonó oldatban lévő jelölt kitozán arányára, a kitozán koncentrációja az oldóközegben 0,043% volt, ami 431 ppm. A számított értéket a mikrokapszulák pH 2,0 közegben 60 percen át történő feloldása után határoztuk meg. A kitozán bevonatot savas közegben feloldottuk, majd az oldóközeg pH-ját 7,4-re változtattuk, és 240 percnél mintát vettünk. A kitozán dezacetilációs foka 75-85%, molekulatömege 50-190 kDa. A mikrokapszulák felületéről leoldott kitozán bevonat koncentrációját elsőként határoztuk meg, erről korábban közölt szakirodalmi adatok nem álltak rendelkezésünkre.

4.7. Sejtfelszabadulási profilok és élő/holt sejtek meghatározása

Ebben a kísérletben a baktériumok felszabadulását vizsgáltuk a pH-tól és a bevonattól függően. A pH 2,0 kioldó közegben tartott minták alacsony sejtszámot mutattak 60 perc elteltével, szignifikáns különbség nélkül. A pH-t 7,40-re emelve felszabadulást mértünk a bevonat nélküli mikrokapszulákban, a kezdeti baktériumkoncentráció 42,86%-a szabadult fel 240 perc alatt. A kitozán bevonatú minták esetében a kezdeti fázisban hasonló kioldódási kinetika volt megfigyelhető, mint a bevonat nélküli mikrokapszula mintáknál, de 240 percnél már magasabb felszabadulást (71,43%) mértünk, mint az Eudragit L100-55 bevonatú mintáknál. Az Eudragit L100-55 bevonatú minták esetében a leggyorsabb felszabadulást a kioldó közeg pH-jának 7,40-re való beállítása után mértük, így a *Lactobacillus*ok 80%-a szabadult fel.

A baktériumsejtek felszabadulása a 60. percet követő pH-változás után szignifikánsan eltérő mechanizmust mutatott. A kitozán bevonat pH 2,0-s közegben való oldódása az utolsó mérési pontot (240 perc) leszámítva nem eredményezett szignifikánsan eltérő oldódási profilt a bevonat nélküli alginát mikrokapszulákhoz képest. Az Eudragit L100-55 bevonatú mikrokapszulák felületéről az enteroszolvens bevonat csak a pH változása után kezdett feloldódni, ami 120 percnél robbanásszerű baktériumfelszabadulást, majd lassabb telítési fázist eredményezett. A mintavétel után (60, 120, 180 és 240 perc) a baktériumsejteket SYTOX Green-nel festettük, és megvizsgáltuk az élő/halott sejtek arányát. A bevonat nélküli alginát és az Eudragit L100-55 bevonatú mikrokapszulák esetében nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget az életképességben a mintavételi időpontokban. Azonban, a kitozánnal bevont mintákban 60 perc elteltével ismét magasabb mortalitást mutattak a baktériumok, ami a vizsgálat során végig jellemző maradt. Az életképesség meghatározásához az élő és elhalt sejtek

összegét, azaz a felszabaduló baktériumok számát minden minta esetében 100%-nak tekintettük.

4.8. MIC érték meghatározása és Time-kill Assay

A vizsgált kitozán vegyületek MIC értékei 0,007%-nak bizonyultak mind az kis-, közepes- és nagymolekulatömegű kitozán esetében. Minden vizsgált, különböző molekulatömegű kitozán koncentrációfüggő módon kifejezett gátló hatást fejtett ki az *L. plantarum* sejtekre. Figyelemre méltó baktericid hatás (legalább három nagyságrendi csökkenés az élő sejtszámban a kiindulási inokulumhoz képest) a 0,015%-os kitozántól minden molekulatömeg esetén megfigyelhető volt.

További vizsgálatokat végeztünk három különböző molekulatömegű kitozánnal. A baktériumsejtek életképességét az élő/holt sejtek aránya alapján jelen vizsgálatban is áramlási citométerrel határoztuk meg. A kontroll és a legalacsonyabb (0,001%) kitozán koncentrációjú minták esetében nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a *L. plantarum* életképességében. Ez mindhárom molekulatömegű kitozán vizsgálatával megállapítható. A kitozán koncentráció tízszeres növekedésével (0,01% és 0,1%) azonban az életképesség jelentős csökkenését észleltük.

Ami a kitozán molekulatömegét illeti, az életképesség csökkenő tendenciát mutatott a molekulatömeg növekedésével. Az élő/holt sejtek aránya 8 óránál stabilizálódott kismolekulasúlyú kitozán esetén és 12 óránál a közepesmolekulasúlyú kitozán esetében. A nagymolekulasúlyú kitozán esetében a 24 órás eredményben volt megfigyelhető a stabilizálódás.

4.9. Membránintegritási vizsgálat

A kitozán membránra gyakorolt destabilizáló hatását a *L. plantarum* membrán integritástesztjében vizsgáltuk, és 260 nm-en mértük a felszabaduló nukleinsav mennyiségét. A kezeletlen baktériumsejtek esetében kismértékű, lineáris abszorbancia növekedést tapasztaltunk. A kitozán koncentrációjának növelésével azonban szignifikáns különbséget találtunk egyes görbék között. Mindhárom kitozán molekulatömegnél alacsonyabb abszorbanciát észleltünk 0,001%-os koncentrációnál a kontrollhoz képest. A 0,1%-os koncentrációjú kezelés során 30-40 percnél találtunk maximumot a minták abszorbanciájában, majd csökkenő tendenciát mértünk. Ezek a jellemzők a kis és nagy molekulatömegű minták

esetében hangsúlyosabbak, míg a közepesek esetében kevésbé. A minták abszorbanciája 0,01%-os koncentrációnál a kezeletlen kontrollhoz hasonlóan változott.

4.10. Zéta potenciál meghatározása a baktériumsejt felszínén

A zéta potenciált a *L. plantarum* felszínén határoztuk meg. A kezeletlen *L. plantarum* tartalmú mintákban a zéta potenciál értéke $-15,15 \pm 0,49$ mV volt, amely a kitozán kezelést követően pozitívabbá vált. A zéta potenciál koncentrációfüggést mutatott mindhárom molekulatömegű kitozán esetében. A legnagyobb zéta-potenciál változást a 0,1%-os kitozán kezeléssel kaptuk (LMW: -4,10 mV, MMW: -3,52 mV, HMW: -2,96 mV). A különböző molekulatömegű kitozánnal kapott eredményeket összehasonlítva a zéta potenciál értékekben nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget.

4.11. A kitozán-sejtmembrán kölcsönhatás vizsgálata konfokális mikroszkóppal

A *Lactobacillus* sejteket az előző vizsgálatokban használt kitozán koncentrációval (0,001-0,1%) kezeltük, valamint egy magasabb koncentrációjú (1%) kezelést is alkalmaztunk. A kitozán FITC-el jelölt volt a detektálás érdekében. A legalacsonyabb kitozán koncentráció esetén az inhomogén eloszlása volt megfigyelhető a baktériumsejteken, a sejtfal közelében, míg a membránfestéshez használt FM ® 4–64 szintén egyenetlen eloszlást mutatott, ami a membrán aggregációra enged következtetni. A legalacsonyabb koncentrációnál nemcsak membrán aggregációt figyeltünk meg, hanem a sejtek megváltozott alakja is sejtkárosodásra utal. A kitozán nagyobb koncentrációban (0,01-1%) egyenletesen oszlik el a bakteriális sejtfal felületén, mint egy egységes bevonatot képezve. A membrán egyenletes festődése mellett a sejtek normális morfológiáját figyeltük meg, membránkárosodás nélkül.

5. Megbeszélés

Kutatásunk és készítményfejlesztésünk célja az volt, hogy megfelelő stabilitású, takarmányozásban használt készítményt tartalmazó probiotikumot állítsunk elő. A probiotikus készítményt premix komponensként használva általában magas nyersrosttartalmú takarmányalappal keverik, amelyet nagynyomású gőzben extrudálnak és megfelelő méretűre aprítanak. Így ebben a technológiai folyamatban a probiotikumot rövid idejű, 80-100 °C körüli hőterhelésnek teszik ki. A fejlesztés kezdetén az volt a célunk, hogy a probiotikus törzseket mikrokapszulába ágyazzuk, és termostabilitását növelő bevonatot vigyünk fel rá. A mikrokapszulák magját nátrium algináttal képeztük, mely az egyik leggyakrabban alkalmazott alapanyag. A választott módszerünk – a tanszéki infrastruktúrális lehetőségeket figyelembe véve – a vibrációs electrospray technológia, melynek körülményei a probiotikus törzsek kapszulázása szempontjából a legkíméletesebbek. A Buchi 395-Pro készülék gyártói a mikrokapszulázási hatékonyság növelése érdekében olyan nátrium alginát terméket fejlesztettek, melynek jellegzetessége oldatként alkalmazva az alacsony viszkozitás és a kedvezőbb reológiai tulajdonság.

1. A mikrokapszulázott probiotikus törzsek hőtoleranciájának értékelése

A vizsgálat három probiotikus törzs mikrokapszulázásával kezdődött. Mindhárom probiotikum tartalmú mikrokapszulát alginát magba ágyasztuk, kitozán bevonást végeztünk és első lépésben a probiotikus minták hőterhelését vizsgáltuk. A kísérleti körülmények megválasztását a szakirodalomban korábban használt paraméterek és a valós extrudálási paraméterek alapján választottuk ki. Ugyanazt a tendenciát kaptuk mindhárom probiotikus törzs vizsgálatában, a bevonat nélküli és bevont mikrokapszulák esetében az egyes hőterhelési eljárások tekintetében. A peptonvízben történő hőkezelés mérsékeltebb hatást eredményezett, valamint a hővezetés jellege a valós környezetet jobban modellezi, ezért az itt kapott CFU eredményeket vettük alapul a későbbiekben.

Különbséget figyeltünk meg a probiotikus törzsek hőterhelésre bekövetkező életképesség változása és a kitozán bevonat között, mivel az *E. faeciumot* tartalmazó mikrokapszulák esetében a kitozán bevonat növelte a termotoleranciát a bevonat nélküli mikrokapszulákhoz képest. A másik két törzs (*Lactobacillus* és *Bifidobacterium*), kitozán bevonás nélkül jobb hőállóságot mutatott, a kitozánnal való bevonás után azonban életképességük szignifikánsan csökkent. Hasonló eredményt publikáltak Surono I. és munkatársai, gasztrointesztinális traktus felső szakaszának *in vitro* modelljében. Megfigyelésünk szerint az *E. faecium* és a *L. plantarum*

eltérő életképességet mutattak abban a vizsgálatban, melyet a szabad, planktonikus baktériumok és az algináttal készült probiotikus mikrokapszulákkal végeztek a gyomor és a vékonybél *in vitro* modelljükben. Az *E. faecium* túlélési százaléka nem javult a mikrokapszulázást követően, míg a *L. plantarum* túlélése 18,5%-ról 84,5%-ra nőtt a szabad sejtekhez képest. Ez az eredmény – hasonlóan az általunk kapotthoz – igazolja az *E. faecium* eltérő érzékenységet a környezeti tényezőkkel szemben.

2. A kioldódási vizsgálatok tervezése és új vizsgálati csoportok kialakítása

A kitozán bevonattal kapott, nem várt eredmények a fejlesztési folyamatban egy új irányt indítottak. A *L. plantarum* és a *B. bifidum* hasonló érzékenységi tendenciát mutatott a hőhatás után; ezért a további kísérleteket a *L. plantarum*ra összpontosítva végeztünk. A kitozán bevonattal kapcsolatos életképességet már csak a *L. plantarum* tartalmú mikrokapszulák esetében vizsgáltuk, hogy meggyőződjünk és feltárjuk a kitozán bevonás okozta életképesség csökkenést. A probiotikumok életképességét az alkalmazás során a gyomorban uralkodó savas környezet, a vékonybél felső szakaszán felszabaduló epesavak és az emésztőenzimek is csökkentik. A savas környezet azonban a kitozán oldékonyságát is növeli, így elméletileg a gyomor-bél traktusban leoldódó kitozán életképesség-csökkentő hatásával is számolnunk kell. A következő kioldódási vizsgálatokban erről kívántunk meggyőződni.

A mikrokapszulák egyik csoportját bélben oldódó polimerrel, Eudragit L100-55-tel vontuk be, hogy megvizsgáljuk a különböző oldhatóságú bevonatok hatását a *L. plantarum* életképességére. Az Eudragit L100-55 bevonat lebomlása pH-függő, pH 5,5 felett oldódik. Ezzel az enteroszolvens bevonattal elkerülhető volt a baktériumok felszabadulása savas közegben. Mesterséges gyomornedvként általában 1-2 pH-jú sósavoldatot szoktak használni a kioldódási vizsgálatok során, néha ezt nátrium-kloriddal egészítik ki. Mivel vizsgálatainkkal a bevonatként használt anyagok életképességet befolyásoló aktivitását kívántuk felmérni a fiziológiás körülmények szimulálása mellett, ezért a Ph.Hg.VIII.-ban javasolt 2,0 pH-jú sósav oldat helyett fiziológiás PBS-t választottunk kioldó közegként. A PBS pH-ját a vizsgálat kezdetén 2,0 pH-ra, majd 60 perc eltelte után 7,4 pH-ra állítottuk be.

3. A mikrokapszula felszínének vizsgálatai

A kioldódási vizsgálatok előtt megvizsgáltuk mind a kitozán, mind az Eudragit L100-55 bevonat minőségét és hatékonyságát. A SEM felvételek bemutatják a bevonat nélküli, szárított mikrokapszula felületi különbségeit és felületi egyenetlenségeit. Az alginát mikrokapszula felszíne a liofilezést követően erősen barázdált, amely a kitozán bevonást követően simább lett; a legsimább felületet azonban az Eudragit L100-55 bevonattal alakítottuk ki, ahol a bevonat

összefüggő volt. Az elemanalízis eredményei is megerősítették, hogy a pozitív töltésű kitozán a negatív töltésű algináttal komplexet képez a kitozánnal bevont minták felületén, ami kompenzálta a felületi egyenetlenségeket. Az Eudragit L100-55 bevonatban a metakrilát polimer teljesen bevonta a mikrokapszula felületét, ami 10%-os tömegnövekedést is eredményezett.

4. A kioldódási vizsgálatok és a felszabadulási profil értékelése

A bevonatok hatékonyságának ellenőrzésére a mikrokapszulákat három csoportra: bevonat nélküli alginát (A), kitozánnal bevont alginát (K) és Eudragit L100-55 bevontú (E) mikrokapszulákra osztottuk és zselatin kapszulákba töltöttük. A zselatin kapszulák egyik felét szintén bevontuk Eudragit L100-55-tel, míg a többit bevonat nélkül vizsgáltuk. A bevonat nélküli és Eudragit L100-55 bevontú zselatin kapszulák pH 7,4-es kioldása ismét meglepő eredményeket mutatott a kitozánnal bevont mikrokapszulák csoportjaiban. A zselatin kapszula bevonatától függetlenül a kitozán bevontú mikrokapszulákból nem oldódott ki kellő számú, életképes baktérium, mely telepet képezett volna a táptalajra történő leoltást követően.

Az eredmény feltárása érdekében egy újabb kioldódási vizsgálatot végeztünk, amelyben áramlási citometriával vizsgáltuk a *L. plantarum* mikrokapszulákból való felszabadulását és a felszabaduló baktériumok életképességét. Az áramlási citometria alkalmas módszer a baktériumszám meghatározására és az életképes-holt sejtek arányának megállapítására. A SYTOX Green pedig széles körben alkalmazott fluoreszcens festék az élő/holt sejtek arányának áramlási citometriás vizsgálatára. A sejt felszabadulási vizsgálatban az időintervallumonként mikrokapszulákból felszabaduló *Lactobacillusok* számát vizsgáltuk. Kísérleteinkben a kitozánnal bevont mikrokapszulákról a bevonat pH 2,0-s közegben feloldódott, majd ezt követően a közeg pH-ját 7,4-re emeltük, ami gélréteg kialakulását okozta a mikrokapszula felületén. Emiatt a kitozánnal bevont mikrokapszulákban a baktériumok kioldóközegbe történő diffúziója az utolsó mintavételi időpontig gátolt volt, azt követően a gél-gát megbomlott, amely a *Lactobacillus* szám hirtelen növekedését eredményezte. Az Eudragit L100-55 (Evonik Industries AG, Germany) két emulgenst tartalmaz: nátrium-lauril-szulfátot (0,7%) és poliszorbát 80-at (2,3%). Az emulgensek koncentrációja nem csökkentette a baktériumok életképességét, de hatékonyan oldotta az alginátot. Így ezek a segédanyagok felgyorsíthatják az alginát szétesését és oldhatóságát, ami a *Lactobacillus*-ok fokozott felszabadulását eredményezhette.

Az áramlási citometriás vizsgálatokban kapott alacsony élő/holt sejtek aránya megerősítette a CFU-meghatározás túlélési eredményeit a kitozánnal bevont mintákban.

Lactobacillus tartalmú minták áramlási citometriás és CFU meghatározási eredményei hasonló korrelációt mutattak más kutatók szerint is, tehát a két módszer jól kiegészíti egymást. Mindezeket az eredményeket összevetettük a publikált adatokkal, ahol a kitozán bevonatú minták esetében nem írtak le hasonló tapasztalatokat, sőt a *Lactobacillusok* jobb életképességet mutattak a kitozán bevonatú mintákban.

5. A kitozán koncentráció és a MIC érték meghatározása

A kioldódási eredmények mellett érdemes összehasonlítani a kioldódási vizsgálatok módszerét és az alkalmazott mikrokapszula/oldóközeg arányt. A termotoleranciát 15 mg mikrokapszula/mL peptonvíz koncentrációban teszteltük, ami valamivel hígabb koncentráció, mint az irodalomban találtak. Cheow és munkatársai például 20 mg/ml peptonvizet, Jiang és munkatársai még nagyobb koncentrációjú, 100 mg/ml peptonvizet alkalmaztak vizsgálataik során. A szimulált gyomornedvben és bélmedvben végzett kioldódási és felszabadulási tesztek, valamint az alkalmazott mikrokapszula/közeg arány 10-20-100 mg/ml volt. A kitozán antibakteriális hatása miatt fontos tényező a mikrokapszula koncentrációja az oldóközegben. A kitozánnal bevont probiotikus mikrokapszulákat számos tanulmány jellemezte, például a rétegvastagságot, az alginát-kitozán-alginát szerkezet kialakulását és a kitozán bevonatú mikrokapszulák felületét figyelembe véve. A kitozán koncentrációját azonban a kioldóközegben még nem vizsgálták és nem hasonlították össze a kitozán MIC-értékével (minimális gátló koncentráció) a kapszulázott probiotikus törzsre nézve, így elsőként végeztünk ilyen jellegű összehasonlító vizsgálatot.

Egyes összefoglaló jellegű publikációk a kitozán MIC értékek vizsgálataival foglalkoznak, de a *Lactobacillus* törzsekre megfigyelt MIC-értékek érthetően alul vizsgáltak., többnyire patogén mikroorganizmusokra vonatkozó adatokat közölnek. Az egyetlen közlemény, amely a *Lactobacillus* törzsekkel kapcsolatos kutatásokat is publikál, a MIC értékeket három törzsre adta meg, a különböző molekulatömegű kitozánokra vonatkozóan. A következő MIC értékeket tették közzé 28-224 kDa-ra: *L. plantarum* (0,05–0,05%), *Lactobacillus brevis* (>0,1–0,08%) és *Lactobacillus bulgaricus* (0,1-0,1%). A tanulmányban a kitozán molekulatömegének és pH-jának MIC-re gyakorolt hatását vizsgálták. Ezeket a MIC értékeket a 28-224 kDa tömegű kitozánra adták meg, de a kitozán acetiláltsági fokát nem vették figyelembe, ami szintén hatással van a MIC értékre.

Kísérleteinkben a kitozán koncentrációját a 3.10 fejezetben leírt módszerrel határoztuk meg. A mikrokapszula és az oldódási közeg aránya ugyanakkora volt, mint az áramlási citometriás kísérletekben. A mikrokapszuláról felszabaduló kitozán számításaink szerint

0,043%-os koncentrációt eredményezett a kioldóközegben. A készítményhez és a kísérleteinkhez 50-190 kDa tömegű kitozánt használtunk, amely a H.K. No és munkatársai által megadott nagyságrenddel azonos (28–228 kDa). Ezen adatok alapján feltételezhető, hogy kísérleteinkben a kioldóközegben az oldott kitozán koncentrációja meghaladja a *L. plantarum* MIC értékét.

Hipotézisünket további vizsgálatokkal is igazolni szeretnénk volna, melyeket már nem mikrokapszula formulációval végeztünk, hanem az oldott kitozán és a *L. plantarum* kölcsönhatására fókuszáltunk. Vizsgálni kívántuk a *L. plantarum* esetében tapasztalt antibakteriális hatás mechanizmusát. Ebben a vizsgálatokban elsőként három különböző molekulatömegű kitozán termék (LMW, MMW és HMW) MIC értékét határoztuk meg *L. plantarum*-on. Ezen kitozán termékek kereskedelmi forgalomban kapható, gélképzésre és bevonásra használt anyagok. A mikrodilúciós kísérletekben a MIC értékekre mindhárom kitozán esetében 0,007% -ot kaptunk. Ezzel igazoltuk a korábbi feltételezésünket, miszerint a kitozán a MIC-érték feletti koncentrációban jelenik meg a kioldóközegben a kioldódási vizsgálatok során.

6. A kitozán gátló hatásának igazolása és koncentrációfüggésének vizsgálata

Az idő-ölési görbék elemzésével, a CFU értékek alapján kifejezett baktericid hatást figyeltünk meg 0,007 m/v% koncentráció felett mindhárom molekulatömegű kitozán esetében. Baktericid hatást a legalacsonyabb koncentrációnál (0,003%) nem tapasztaltunk, ami korrelál a MIC értékkel. Az idő-ölési vizsgálatban leoltott mintákat áramlási citométerrel is megvizsgáltuk. A *Lactobacillus* életképességét a holt sejtek fluoreszcens jelölésével határoztuk meg. Eredményeink itt is összhangban vannak a Time-Kill Assay vizsgálatokkal. A *L. plantarum* életképességét a legalacsonyabb koncentrációjú kezelés (0,003 m/v%) esetén nem, de magasabb koncentrációknál (0,015-0,125 m/v%) a kitozán 25-75%-ra csökkentette. Kitozánra a *Lactobacillus* törzsek esetében nem végeztek idő-ölési tesztet, de galluszsav-kitozán származékot teszteltek *Staphylococcus aureus*-on és *Escherichia coli*-n. Ezekben az idő-ölési vizsgálatokban a baktériumokat a MIC érték többszörösével kezelték, ami egyértelműen mutatja, hogy a MIC feletti koncentráció a baktériumok pusztulását eredményezte.

7. A bakteriális sejtfal kitozánnal kialakuló kölcsönhatásának igazolása

A bakteriális sejtfal kölcsönhatása bizonyos anyagokkal citoplazmatikus anyagok felszabadulásához vezethet. Ezek a kölcsönhatások csökkentik a membrán integritását, melynek során először a citoplazmában nagyobb koncentrációban található kálium- és foszfátionok szabadulnak fel, majd nagyobb molekulák aminosavak, peptidok és nukleinsavak

is kijutnak a sejtéből. A kitozán membránpermeabilitásra gyakorolt hatását különböző Gram-negatív baktériumokban (*P. aeruginosa* és *E. coli*) is vizsgálták. Az *E. coli* esetében, a nukleinsavak és fehérjék felszabadulását 260 és 280 nm-en követték az idő függvényében. Amikor a nukleinsav 30 perc elteltével felszabadul, az időgörbe maximuma 40 perc után van 0,1% 50 kDa és 5000 kDa kitozán hatására, majd 100 perc után csökkenő tendenciát mutat. Liu és munkatársai vizsgálták a sejtmembránok kitozán által okozott károsodását a *S. aureus*-ban, amely egy Gram-pozitív kórokozó baktérium, és megállapította, hogy a folyamat koncentrációfüggő. TEM-mikroszkóppal igazolták, ha a *S. aureus*-t 0,5%-os kitozánnal kezelték, az osztódó sejtek membránja sérült és a sejttartalom elvesztése következett be. Saját eredményeink is hasonló tendenciát mutatnak, a *L. plantarum* kitozánnal való kezelése után, mivel a 0,1%-os kitozán oldat görbéi maximumot mutatnak. Vizsgálatokat végeztünk 0,01%-os és 0,001%-os kitozán oldattal is, mely esetben eltérő tendenciát tapasztaltunk. A 0,001%-os kitozán oldat használatkor alacsony abszorbanciát mértünk, míg a közepes koncentrációban (0,01%) a kontrollhoz hasonló, de ezeken a görbéken nem figyelhető meg olyan egyértelmű nukleinsav felszabadulás, mint a legmagasabb koncentrációban tapasztalt esetben. Ez arra utal, hogy a baktérium sejtfala csak a 0,1%-os kezelésre válik permeábilissá, ami a fenti idő-ölési eredmények alapján valószínűleg a baktericid hatásra vezethető vissza. Az alacsonyabb koncentrációjú kezeléseknél nem tapasztaltunk a citoplazmából nukleinsav felszabadulást, ami a 0,01%-os kezeléseknél bakteriosztatikus kölcsönhatásra utal. Vizsgálataink során nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a nukleinsav-felszabadulásban a különböző molekulatömegű kitozán termékek között; azonban a közepesmolekulatömegű kitozán görbéjén a maximum megnyúlt, a nukleinsav felszabadulás alacsonyabb a kis- és nagymolekulatömegű kitozánhoz képest. Ennek valószínűleg az az oka, hogy a közepes molekulatömegű kitozán a kis- és nagymolekulatömegű kitozán fizikai keveréke, amely közepes viszkozitású terméket ad. A közepes molekulatömegű kitozán esetében általában nagyobb szórást tapasztaltunk az eredményekben, ami feltehetően a fenti okból is adódik.

A permeabilitási teszt alapján feltételeztük, hogy koncentrációfüggő kölcsönhatás lép fel a *L. plantarum* Gram-pozitív sejtfala és a kitozán között. Eddig Gram-negatív kórokozó baktériumokon végeztek permeabilitási vizsgálatokat, így a *L. plantarum*, mint Gram-pozitív baktérium esetében célul tűztük ki, hogy alaposabban tájékozódjunk a kölcsönhatás és a gátlás mechanizmusáról. A kitozán polikationos természete miatt várható, hogy a negatív töltésű baktérium sejtfal kölcsönhatásba lép a kitozánnal. A Gram-pozitív baktériumok sejtfalának fő összetevője a peptidoglikánok, amelyekhez kovalensen kötődnek a sejtfalban lokalizálódó

teikolsavak (WTA-k) és lipoteikolsavak (LTA-k). Ezek a Gram-pozitív baktériumokban található anionos polimerek, WTA-k, amelyek a sejtfal teljes száraz tömegének csaknem felét teszik ki és nagy sűrűségű negatív töltést biztosíthatnak a sejtfalban. A zéta-potenciál mérésével megvizsgáltuk, hogy ez a kölcsönhatás milyen mértékben befolyásolja a baktériumsejtfal felszínének töltését. A kísérletekben a baktériumszuspenziókat és a kitozán oldatokat homogenizáltuk. Az inkubációt követően a folyékony táptalajt centrifugálással eltávolítottuk a mintákból, a sejtszuspenziót fiziológias sóoldattal mostuk, majd megmértük a zéta potenciált. A zéta-potenciál eredmények alapján megállapítható, hogy a kitozán a minták mosása után is a felszínen maradt, mivel a bakteriális sejtek felülete a kitozán koncentrációjának növekedésével egyre pozitívabb lett. Ez arra utal, hogy minél nagyobb a kitozán koncentrációja, annál jobban befedi a baktériumok felszínét. Nagyobb koncentrációban a polimer láncok összefonódása miatt a kitozán itt úgy viselkedik, mintha nagy molekulatömegű, hosszú lánc lenne. Nagy mérete miatt nem tud belépni a sejtbe, de extracellulárisan kölcsönhatásba lép vele.

Valószínűleg ez a hosszan tartó kölcsönhatás lehetővé teszi a baktériumsejt membránjának megnyílását és permeabilitásának növekedését. A kölcsönhatást konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk a membrán fluoreszcens jelölésével és FITC-el jelölt, kismolekulatömegű kitozánnal. Az FM[®]4-64-et membránfestékként használtuk, amelyet endoszómák jelölésére is használnak. Alacsonyabb koncentrációban (0,001%) a kitozán nem egyenletesen oszlik el a baktériumsejt felszínén, amit a FITC-kitozán zöld foltjai jeleznek. Ezenkívül hasonló aggregátumokat figyeltünk meg a bakteriális membránban (piros színű), amelyek átfedésben vannak a FITC-kitozán aggregátumokkal. Alacsony kitozán koncentrációban a helyenként megvastagodott membránstruktúra is utalhat a bakteriális sejtbe jutó kitozán hatására bekövetkező internalizációra. A kitozán 0,001%-os koncentrációnál azonban valószínűleg nem okoz baktericid vagy bakteriosztatikus hatást sem, mivel a MIC-nél alacsonyabb koncentrációnál nem tapasztaltunk szignifikáns csökkenést a CFU értékekben. Ennek ellenére a kis molekulatömegű kitozán mintákban a CFU enyhén alacsonyabb a vizsgálat elején, ami bizonyos gátló hatásra utalhat.

Összefoglalás

A probiotikus baktériumok mikrokapszulázása számos előnnyel jár. Javíthatja az életképességet, megkönnyíti a tárolást és az adagolást, valamint célzottan képes a megfelelő helyen és időben felszabadulni a gasztrointesztinális rendszerben. A vizsgálatok és formulálás során azonban vannak olyan tényezők, amelyeket figyelembe kell vennünk, mivel jelentős mértékben torzíthatják a vizsgálati eredményeket és csökkenthetik a készítmény hatékonyságát.

A doktori munkámban a mikrokapszula bevonatként alkalmazott kitozán életképesség-csökkentő hatását vizsgáltam a probiotikus – elsősorban *Lactobacillus plantarum* – törzseken. A munkám során az alábbi megállapításokat tettem:

1. A kitozán bevonat a mikrokapszula felszínéről leoldódva csökkentette a *Bifidobacterium bifidum* és a *Lactobacillus plantarum* életképességét. Ezen életképesség-csökkentő hatás miatt a kitozán termoprotektív szerepének értékelése e két törzsnél nem megalapozott. Az *Enterococcus faecium* esetében a kitozán termostabilizáló hatását igazoltam.
2. A kitozán bevonattal ellátott *Lactobacillus plantarum* tartalmú mikrokapszulák mesterséges gyomor-, és bélnedvben történő kioldása során jelentős életképesség csökkenést állapítottam meg.
3. Elsőként határoztam meg a mikrokapszula felszínéről leoldódó kitozán bevonat mennyiségét FITC-el jelölt származék segítségével. Megállapítottam, hogy a kitozán koncentrációja a kioldóközegben a *L. plantarum* MIC értékéhez viszonyítva legalább ötszörös.
4. Igazoltam, hogy a kitozán életképesség-csökkentő hatása koncentrációfüggést mutat a *L. plantarum* esetében. Az általam felhasznált különböző molekulatömegű kitozán származékok életképesség-csökkentő hatása között azonban szignifikáns különbséget nem állapítottam meg.
5. Igazoltam, hogy a kitozán a *L. plantarum* sejtek membránjával létesít irreverzibilis kapcsolatot, mely kölcsönhatás a kitozán polikationos jellegéből adódik. A kitozán életképesség-csökkentő hatása 0,1% koncentrációban a membránintegritás csökkentésével függ össze. Elsőként igazoltam a konfokális mikroszkópos felvételekkel a kitozán *L. plantarum* sejtfalához történő adszorpcióját.

Eredményeim alapján ezért javaslom a probiotikus készítmények preformulációs vizsgálata alatt a felhasznált segédanyagok MIC értékének meghatározását és a kioldódás során kialakuló segédanyag koncentráció meghatározását, hogy következtetéseket tudjunk levonni a készítmény várható hatékonyságáról és stabilitásáról.

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények



**DEBRECENI
EGYETEM**

DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/121/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Erdélyi Lóránd József
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10083518

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Kovács, R. L.^{*}, Erdélyi, L. J.^{*}, Fenyvesi, F., Balla, N., Kovács, F., Vámosi, G., Klusóczki, Á., Gyöngyösi, A., Bácskay, I., Vecsernyés, M., Váradi, J.: Concentration-Dependent Antibacterial Activity of Chitosan on *Lactobacillus plantarum*. *Pharmaceutics*. 15 (1), 1-11, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics15010018>
^{*} These authors contributed equally to this work.
IF: 6.525 (2021)
2. Erdélyi, L. J., Fenyvesi, F., Gál, B., Haimhoffer, Á., Vasvári, G., Budai, I., Gálné Remenyik, J., Bereczki, I., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Bácskay, I., Vecsernyés, M., Kovács, R. L., Váradi, J.: Investigation of the Role and Effectiveness of Chitosan Coating on Probiotic Microcapsules. *Polymers*. 14 (9), 1-16, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/polym14091664>
IF: 4.967 (2021)

További közlemények

3. Erdélyi, L. J., Váradi, J.: Lokális antibiotikum-felhasználás csökkentése, illetve kiváltása sebkezelésben. *Gyógyszerészet*. 67, 199-202, 2023.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 11,492

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 11,492

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.04.24.



Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom Dr. Váradi Judit témavezetőmnek, hogy még hallgatóként, a TDK keretein belül kísérletes kutatómunkára adott lehetőséget a Gyógyszertechnológiai tanszéken. Iránymutatásával elkészíthettem szakdolgozatomat, majd folytathattam a munkát PhD hallgatóként. Köszönöm, hogy bármikor számíthattam ötleteire, tanácsaira és szaktudására. Köszönöm a kezdetektől való támogatását, az építő szakmai kritikákat és azt a baráti munkakapcsolatot, ami jellemezte közös munkánkat.

Köszönetet kell mondanom Prof. Dr. Bácskay Ildikónak és Prof. Dr. Vecsernyés Miklósnak, hogy lehetőséget biztosítottak a Gyógyszertechnológiai Tanszéken a kísérleti tudományos munka végzésére és hogy későbbiekben a PhD doktori kutatásaimhoz az anyagi hététeret biztosították.

Köszönettel tartozok a Petz Aladár Egyetemi Oktató Kórház vezetésének, illetve a Gyógyszerészeti Osztály vezetőjének, Hutyánné Dr. Somogyi Aranka Főgyógyszerész Asszonynak, hogy engedélyezték a PhD képzésbe való belépésemet.

Hálás vagyok Dr. Remenyik Judit a Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar tudományos főmunkatársának és a kar vezetésének, hogy a TDK munkám alap gondolatát adták és anyagi támogatást adtak. Külön köszönöm Tanárnő tutori támogatását is a PhD munkám során.

Köszönöm a segítséget a Gyógyszertechnológiai Tanszékről Dr. Haimhoffer Ádámak és Dr. Gál Bernadettek a fluidizációs eljárás kidolgozásáért és kivitelezéséért, Dr. Vasvári Gábornak a zselatin kapszulák bevonásában és töltésében nyújtott segítségéért. Budai Istvánnak, a Debreceni Egyetem Műszaki Karán készült SEM felvételekért, Dr. Bakai Bereczki Ilonának a Debreceni Egyetem Gyógyszerésztudományi Kar Gyógyszerészeti Kémiai Tanszékén a FITC-el jelölt kitozán elkészítéséért, Dr. Vámosi Györgynek a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetében készült konfokális mikroszkópos felvételek.

Külön köszönetet szeretnék mondani Dr. Kovács Renátónak, valamint Kovács Fruzsina és Balla Noémi PhD hallgatóknak, a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Mikrobiológiai Intézetében végzett segítő munkájukért, a baktériumok tenyésztésért, az életképességi vizsgálatokért, a CFU meghatározásokért, a MIC érték meghatározásáért és az ezzel járó számtalan leoltásért.

Köszönöm továbbá a segítséget Dr. Fenyvesi Ferencnek, a Gyógyszertechnológiai Tanszék munkatársának az áramlási citometriás mérések elvégzéséért, valamint köszönettel tartozom még a sok szakmai iránymutatásért, amit kaptam tőle.

Köszönetet szeretnék még mondani a Gyógyszertechnológiai Tanszék minden név szerint nem említett munkatársának.

Végül, de nem utolsó sorban, kifejezhetetlen hálával tartozok a Családomnak a támogatásukért és azért, hogy megteremtették azt a kiegyensúlyozott, nyugodt háttérrel, ami lehetővé tette, hogy eddig eljussak.

Támogatások

Az értekezés alapjául szolgáló kutatásokat az Innovációs és Technológiai Minisztérium által meghirdetett Tématerületi Kiválósági program (TKP2021-EGA-18) támogatta.

A disszertációt a GINOP-2.3.4-15-2020-00008 projekt támogatja. A projekt az Európai Unió és az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósul meg.

Az értekezés létrejöttét az EFOP-3.6.1-16-2016-00022 „Debrecen Venture Catapult Program” támogatta.