



Állatorvostudományi Egyetem
Élettani és Biokémiai Tanszék
Biokémiai Osztály

**A gyulladásos válasz vizsgálatára alkalmas *in vitro*
bél-máj modellrendszer kialakítása sertésben**

Készítette: Mátyási Klaudia

Témavezetők: Dr. Mátis Gábor
egyetemi docens

Dr. Lajos Andrea
PhD hallgató

Budapest, 2024

1	Tartalom	
2	Rövidítések jegyzéke	3
3	Bevezetés	4
4	Irodalmi áttekintés	5
4.1	A gyulladás folyamatainak áttekintése	5
4.1.1	A gyulladásos citokinek.....	5
4.1.1.1	Interleukin-4.....	8
4.1.1.2	Intcerleukin-6.....	8
4.1.1.3	Interleukin-8.....	9
4.1.1.4	Interferon-gamma (INF- γ)	9
4.1.1.5	Tumor nekrosis faktor (TNF- α).....	10
4.1.1.6	Granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor (GM-CSF).....	10
4.2	Az oxidatív stressz.....	11
4.3	Antimikrobiális rezisztencia a sertéságazatban és a humán egészségügyben ...	11
4.4	Az antimikrobiális rezisztencia elleni küzdelem legfontosabb eszközei.....	13
4.5	Az <i>in vitro</i> és <i>in vivo</i> sejtmmodellek összehasonlítása	14
4.5.1	Gyulladásos sejtmmodellek	15
5	Célkitűzés.....	17
6	Anyag és módszer.....	18
6.1	Kísérleti állatok.....	18
6.2	Vegyszerek	18
6.3	Előkészületek	18
6.4	Máj eredetű sejtenyészet készítése	18
6.4.1	Sejtek izolálása.....	18
6.4.2	Sejtek lerakása	20
6.5	Bél explantátumok készítése	20
6.6	A sejtenyészetek kezelése	21
6.7	A sejtenyészetek és explantátumok lizálása.....	21
6.8	Laboratóriumi mérések	22
6.8.1	CCK-8 teszt.....	22
6.8.2	LDH aktivitás.....	22
6.8.3	H ₂ O ₂ koncentráció mérése.....	23

6.8.4	Lipidperoxidáció meghatározása	23
6.8.5	Gyulladásos mediátorok koncentrációjának mérése	23
6.9	Statisztika	24
6.10	Saját munka	24
7	Eredmények	26
7.1	Májsejttenyészetek	26
7.1.1	A sejtek metabolikus aktivitásának mérése	26
7.1.2	A sejtmembrán integritásának vizsgálata	26
7.1.3	A sejtek redox-homeosztázisának vizsgálata	27
7.1.3.1	A tápfolyadék extracelluláris H ₂ O ₂ koncentrációjának meghatározása 27	
7.1.3.2	A sejtlizátumok MDA koncentrációjának meghatározása	27
7.1.4	A sejtek tápfolyadékában található gyulladásos mediátorok koncentrációjának mérése	28
7.1.4.1	Az IL-4 koncentráció meghatározása	28
7.1.4.2	Az IL-6 koncentráció meghatározása	28
7.1.4.3	Az IL-8 koncentrációjának meghatározása	29
7.1.4.4	Az IFN- γ koncentrációjának meghatározása	29
7.1.4.5	A TNF- α koncentrációjának meghatározása	30
7.1.4.6	A GM-CSF koncentrációjának meghatározása	30
7.2	Bél explantátumHiba! A könyvjelző nem létezik.	
7.2.1	A sejtek metabolikus aktivitásának mérése	30
7.2.2	A sejtmembrán integritásának vizsgálata	31
7.2.3	A sejtek tápfolyadékában található gyulladásos mediátorok koncentrációjának mérése	31
7.2.3.1	Az IL-6 koncentráció meghatározása	31
7.2.3.2	Az IL-8 koncentráció meghatározása	32
8	Megbeszélés	33
9	Összefoglalás	39
10	Summary	40
11	Irodalomjegyzék	41
12	Köszönetnyilvánítás	44

2 Rövidítések jegyzéke

AMP = antimikrobiális peptid

AMR = antimikrobiális rezisztencia

CCK = Cell Counting Kit

DMEM = Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO = dimetil-szulfoxid

EDTA = etilén-diamin-tetraecetsav

FBS = magzati szarvasmarha szérum

GM-CSF = granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor

HDP = host defense peptide

HRP = torna-peroxidáz

IFN = interferon

IL = interleukin

LDH = laktát-dehidrogenáz

LPS = lipopoliszacharid

LTA = lipoteikólsav

MDA = malondialdehid

M-PER = Mammalian protein extraction reagent

NK-sejt = natural killer (természetes ölő) sejt

PAMP = pathogen-associated molecular patterns

PBS = foszfáttal pufferolt sóoldat

Poli I:C = poliinozin-policitidilsav

ROS = reaktív oxigén származék

RNS = reaktív nitrogén származék

Th2-sejt = T-helper 2-sejtek

TNF- α = tumor nekrosis faktor

TLR = toll-like receptor

WST-8 = vízdoldható tetrazólium-só

3 Bevezetés

Sertéseket intenzív hizlalási körülmények között tartva fokozott a fertőzések kockázata, kiemelten a légúti és a gyomor-bélrendszeri eredetűeké. Az intenzív súlygyarapodás, a zsúfolt tartás, a szállítási stressz egyaránt hozzájárulhatnak a mikrobiom egyensúlyának felborulásához, amely az immunrendszer gyengeségéhez, csökkent termelési mutatókhoz és magasabb elhullási arányhoz vezethet. Az elmúlt évtizedekben a termelési mutatók javítása érdekében (összefüggésben az emberiség megnövekedett fehérjeigényének kielégítésével) nagy mennyiségben használtak az állományokban antibiotikumokat, azonban az antimikrobiális rezisztencia egyre nagyobb fenyegetést jelent mind az állategészségügyben, mind a humán gyógyászatban. Az Európai Unió kiterjedten próbálja csökkenteni az antibiotikum felhasználást az élelmiszerláncban, beleértve az állattenyésztést is, így kiemelten fontossá válik az egyéb antimikrobiális hatással rendelkező terápiás szerek és immunmoduláns tulajdonsággal bíró alternatívák kifejlesztése. Az antimikrobiális rezisztencia elleni küzdelem legfontosabb eszközei közé tartoznak a probiotikumok, posztbiotikumok, a növényi eredetű bioaktív anyagok, valamint az antimikrobiális peptidek is. A probiotikumok és posztbiotikumok, valamint a növényi eredetű bioaktív anyagok egyaránt rendelkeznek gyulladáscsökkentő és antioxidáns hatásokkal, így nagymértékben támogatják az immunrendszer védekező mechanizmusait a fertőző eredetű megbetegedések esetén. A növényi eredetű bioaktív anyagok gátolják a patogén mikroorganizmusok tapadását a célsejtekhez, ezenfelül pedig a biofilmek képződésének gátlásával is hozzájárulnak a gazdaszervezet mikróbák elleni küzdelméhez. Az antimikrobiális peptidek mikróba ellenes hatásukon kívül immunmoduláns, daganatellenes és sebgyógyulást elősegítő tulajdonságokkal is rendelkeznek. Immunmoduláló tevékenységük közvetett módon segíthet a baktériumok szaporodásának csökkentésében és a káros gyulladós folyamatok leküzdésében. Az antibiotikum-alternatívák vizsgálatához olyan sejtenyészetek szükségesek, melyeken *in vitro* körülmények között hasonló fokú gyulladás kelthető, mint a szervezetben enterális vagy szisztémás fertőzések esetén. Különböző gyulladást előidéző molekulák alkalmazásával, bél és máj eredetű sejtenyészeteken kiváltott gyulladás segítségével, jól modellezhető a szisztémás gyulladásokban központi szerepet betöltő bél-máj tengely működése. A gyulladós modellek kidolgozása tehát releváns alapot nyújthatnak az antibiotikum-alternatívák biológiai funkcióinak igazolásához és jótékony hatásaik felméréséhez. Az antibiotikum-alternatívák *in vitro* vizsgálatai elengedhetetlenek a későbbi *in vivo* terápiás ágensként való alkalmazásukhoz, mely nagyban hozzájárulhat az antimikrobiális rezisztencia visszaszorításához.

4 Irodalmi áttekintés

4.1 A gyulladás folyamatainak áttekintése

A gyulladás a szervezet veleszületett védekező mechanizmusának része, komplex biológiai válasza a külső károsító ingerekre, mint például a fertőzések, sérülések vagy felvett toxinok. A gyulladásos válasz fő célja a sérült szövetek helyreállítása és a károsító tényezők eliminálása. A gyulladás folyamata az immunrendszer különböző sejtjeinek és molekuláinak koordinált tevékenysége révén zajlik és 4 fázisra osztható. Az első az akut fázis, melynek részeként, az endotélsejtek által kiválasztott gyulladásokeltő mediátorok (hisztaminok, bradykininek) hatására az érintett terület érhalózata kitágul. Az erek áteresztőképessége is megnő, így a második fázisban, amely a szubakut fázis, a vérplazma és a benne található immunsejtek az érpályából a gyulladás helyére jutnak, ahol az adaptív immunválasz fehérvérsejtjei a természetes immunitás makrofág sejtjeivel együttműködve megszüntetik a kiváltó okot. A harmadik fázis a helyreállítás, melynek folyamán például fagocitózis segítségével tisztul meg a sérült szövet a törmelékektől és megindul a szöveti regeneráció. Az első három fázissal az élettaninak tekinthető, önmagát korlátozó gyulladás befejeződik, azonban, ha a kiváltó káros ingert a szervezet nem képes eliminálni, és a gyulladás állandósul, krónikus gyulladás jön létre, melyet a T-limfociták és plazmasejtek a gyulladás helyére való migrációja jellemez (Gálfi et al., 2014). A krónikus gyulladás gyógyulás nélkül idővel szövetkárosodáshoz, funkciócsökkenéshez, végül funkcióvesztéshez vezethet. A gyulladás folyamatának szabályozásában fontos szerepet játszanak a citokinek, mivel képesek további gyulladásos sejtek toborzására és aktiválására, hatást gyakorolnak az immunsejtekre és egymásra, illetve, egyik fő funkciójuk, hogy lehetővé teszik a limfociták, a különféle gyulladásos sejtek és a hemopoetikus sejtek közötti kommunikációt, koordinálva ezzel az immunválaszt (Hannoodie and Nasuruddin, 2024).

4.1.1 A gyulladásos citokinek

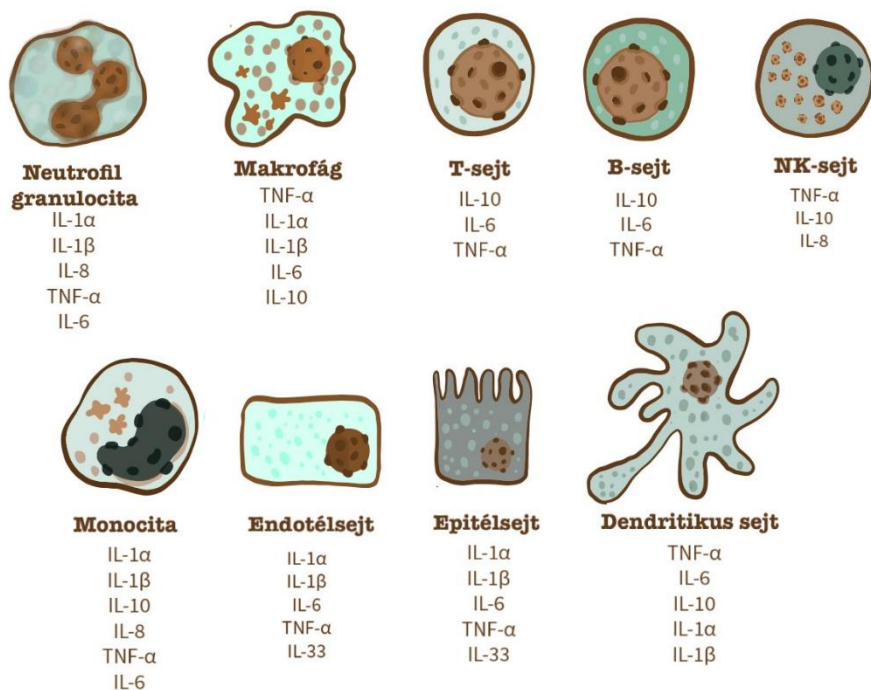
A citokinek sokrétű csoportját kisméretű fehérje molekulák alkotják, amelyek az immunmoduláló tulajdonságaikon túl részt vesznek az immunrendszertől független folyamatokban is, mint például a sejt differenciálódás (Dinarello, 2009). A citokinek úgynevezett szupercsaládokból állnak, egy család hasonló struktúrákat foglal magába, ezt mutatja be az **1. táblázat** (Testar, 2024).

Citokin család	Funkció
Hematopoetinek	Sejtprolifерáció és sejt differenciáció elősegítése
Interferon család	Vírusellenes fehérjék
Interleukin család	Interleukintól és sejtípustól is függő különféle működések
Kemokin család	Sejtvándorlás, adhézió és aktiváció irányítása
Transzformáló növekedési faktor béta család	Immunsejtek szabályozása
Tumor nekrosis faktor család	Gyulladásos és immunválaszok szabályozása

1. táblázat: A citokinek és funkcióik.

Forrás: <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/receptors-molecules/cytokines-introduction>

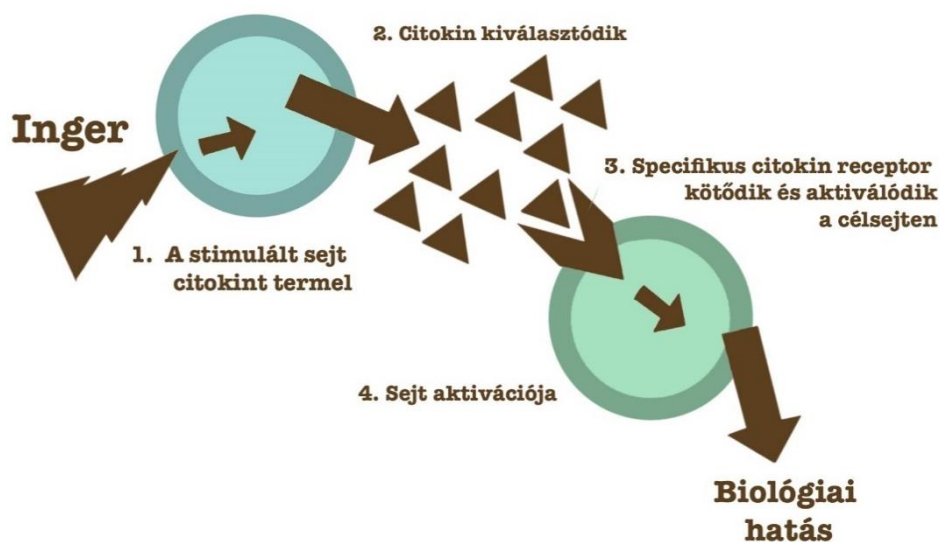
A citokinek fő termelői a T-helper sejtek és makrofágok, bár a legtöbb magvas sejtben indukálható a képződésük és kiválasztásuk, így a neutrofil granulociták, B-sejtek, natural killer sejtek (NK sejt), monociták, endotélsejtek, epitél sejtek és dendritikus sejtek, fibroblasztok is



1. ábra: Citokineket kiválasztó sejtípusok sematikus ábrája. *Saját ábra*

termelhetnek citokineket. Ezen kívül megfigyelhető még, hogy különböző sejttípusok is termelhetik ugyanazt a citokint, ahogy az 1. ábrán is látható (Kany et al., 2019).

Az adott citokin hatásai akkor jelentkeznek, amikor az nagy affinitással kötődik a célsejt felszínén kifejezett receptorához. Ez a hatás lehet autokrin, parakrin vagy endokrin, utóbbi a legkevésbé jellemző a citokin válaszokra. Autokrin esetben a citokin ugyanarra a sejtre hat, amelyen a receptor kifejeződött, parakrin esetben egy közeli sejtet érint a hatás, endokrin esetben pedig egy távoli sejtet befolyásol. A citokin receptorhoz való kapcsolódása intracelluláris jelátviteli kaszkádot indít el, és ez a kaszkád megváltozott génexpresszióhoz vezet a célsejtben, ennek következménye a biológiai hatás (**2. ábra**) (Kany et al., 2019).



2. ábra: A citokinek képződésének folyamata. *Saját ábra.*

Az immunválasz szabályozásában szerepet játszó citokinek közül, a pro-inflammatorikus citokinek felszabadulása vezet az immunsejtek aktiválódásához, illetve további citokinek keletkezéséhez így a korábban a „citokinvihar” kifejezéssel utaltak a citokinek hirtelen felszabadulására a túlzott gyulladásokért, azonban, a legújabb kutatások szerint mind a pro-inflammatorikus, mind az anti-inflammatorikus citokinek felszabadulására szükség van az immunválasz komplex folyamatához (Kany et al., 2019). A citokinek hatása a célsejttől függ, ezért pleiotrópikusnak nevezzük őket, amely azt jelenti, hogy egy gén több tulajdonság megváltoztatásáért felelős, vagy egy gén több fenotípus meghatározásában is részt vesz (Charo et al., 2006). Különböző citokinek kifejezhetik ugyanazt a hatást is, illetve egymás hatását is felerősíthetik szinergistaként (Ibrahim et al., 2017). Kísérletünkben a gyulladás mértékének feltérképezése céljából, különböző pro-és anti-inflammatorikus citokinek koncentrációjának

mérését végeztük el, a továbbiakban a kísérlet szempontjából releváns citokinek rövid jellemzése következik.

4.1.1.1 Interleukin-4

Az interleukin-4-et (IL-4) több sejttípus képes szekretálni, legfőbb termelői a CD4⁺ T-sejtek, az NK-sejtek, a B-sejtek és a masztociták. Az IL-4 fontos szerepet játszik a gyulladásos folyamatok szabályozásában, többek között az allergiás gyulladásokban is. Ez a citokin egyaránt lehet gyulladásgátló és gyulladáskeltő hatású is, attól függően, hogy milyen sejttípusokon és receptorokon hat. Az anti-inflammatorikus hatását az úgynevezett alternatív makrofágok aktivációján keresztül valósítja meg, mivel az IL-4 a T-sejtek differenciálódását a T-helper 2-sejtek (Th2-sejtek) keletkezésének irányába mozdítja. Th2-sejtek megnövekedett száma növeli az Ig-E termelést a B-sejtekben, ezzel elősegítve az alternatív makrofágok aktivációját (Junttila, 2018). Az IL-4 által aktivált makrofágok gyulladásgátló tulajdonsággal rendelkeznek, valamint hozzájárulnak a szöveti regenerációhoz is. Az IL-4 receptorokkal kapcsolatos kutatások rámutattak, hogy az IL-4 által kiváltott sejtválaszokat a receptor komplexek különböző összetevőinek aránya és eloszlása befolyásolja (Gärtner et al., 2023).

4.1.1.2 Interleukin-6

Az interleukin-6 (IL-6) a T-sejtekben, monocitákban, endotélsejtekben és fibroblasztokban szekretálódik, és fontos szerepet tölt be az autoimmun betegségek, illetve a bakteriális fertőzések folyamataiban (Rose-John, 2018). Az IL-6-nak pro- és anti-inflammatorikus tulajdonságai is vannak. Az IL-6 felismerésének mechanizmusa két különböző módon valósul meg, az első jelátviteli út tanulmányozását követően megállapították, hogy az IL-6 szisztémás hatása a klasszikus jelátvitel révén korlátozott. Fő korlátja, hogy receptorjának elérhetősége, amely csak bizonyos sejttípusokon expresszálódik (Kang et al., 2020). Az IL-6 felismerésének második mechanizmusa lesz így felelős a molekula gyulladáskeltő képességeinek nagy részéért, ezt a mechanizmust transz-szignálásnak nevezik (Rose-John, 2018). Az IL-6 anti-inflammatorikus tulajdonságai, szemben a pro-inflammatorikusokkal, az eddigiekben kiaknázatlanok maradtak a klinikai gyakorlatban, noha anti-inflammatorikus tulajdonsága több mechanizmus révén képes érvényesülni. Alapvető szerepet játszik az úgynevezett leukocita váltásban, melynek lényege, hogy a korai gyulladás uralkodó sejttípusának, a neutrofil granulocitáknak toborzását csökkenti, hogy a késői gyulladásban domináló monociták vehessék át a helyüket. A makrofág kolóniastimuláló faktor (M-CSF) receptor expresszióját is növeli, elősegítve ezzel a monociták makrofággá való differenciálódását (Jenkins et al., 2004). Az IL-6 klasszikus jelátvitelére szükség van a szervezetben a regeneratív és védelmi folyamatok

lejátszódásához (Luig et al., 2015). Az elmúlt évtizedekben több betegség patogenezisével is kapcsolatba hozták, illetve tanulmányozták biomarkerként való felhasználását, mivel prognosztikai értéke van a korai gyulladásban, azonban a klinika gyakorlatba való átültetés elmaradt (Gentile et al., 2013).

4.1.1.3 Interleukin-8

Az interleukin-8 (IL-8) kettős szerepet játszik a gyulladásos folyamatokban, mivel mind pro-inflammatorikus, mind anti-inflammatorikus hatásokkal rendelkezik. Számos sejttípus szekretálja ezt a citokint, köztük a monociták, neutrofil granulociták, fibrociták, endoteliális, mesoteliális, epiteliális sejtek és a tumorsejtek is. Gyulladáscsökkentő hatását különböző fertőzőes, gyulladásos és daganatos modellekben igazolták. A gyulladás gátlásának egyik mechanizmusa, hogy gátolja a leukociták kitapadását az aktivált endoteliális sejtekhez. Kimutatták azonban számos krónikus gyulladásal járó betegséggel (pl. pikkelysömör, akut respiratorikus stressz szindróma, rheumatoid arthritis, daganatos megbetegedések) összefüggésben az IL-8 receptorainak túlzott expresszióját. A krónikus gyulladásos folyamatokkal összefüggésbe hozza a molekulát proangiogén mivoltja, mivel ezek a megbetegedések kritikusan függenek az angiogenezistől. Az IL-8 kemotaktikus vonzó hatással van minden ismert vándorló immunsejttípusra. Különleges tulajdonsága, melyben különbözik minden más citokintól, hogy képes specifikusan aktiválni a neutrofil granulocitákat, ezzel serkentve a gyulladást. A citokinek egymásra is hatással lehetnek, így például az interleukin-1 és a tumor nekrosis faktor serkenti az IL-8 termelődését több sejttípusban. Egy kutatásban kimutatták, hogy a bakteriális lipopoliszacharidok - melyek a Gram-negatív baktériumok sejtfalát alkotják, szintén serkentik az IL-8 szekretálódását, ezzel fokozva a gyulladást (Matsushima et al., 2022).

4.1.1.4 Interferon-gamma (INF- γ)

Az INF- γ egy pro- és anti-inflammatorikus tulajdonságokkal is rendelkező citokin, melyet elsősorban a T-sejtek, valamint az NK-sejtek termelnek. Az INF- γ kulcsszerepet tölt be az immunrendszer aktiválásában. Gyulladást elősegítő funkciói közé tartozik, hogy fokozza a makrofágok aktivitását, elősegítve az intracelluláris kórokozók elpusztítását, emellett növeli a fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) I. és II. osztályú molekulák expresszióját, ezáltal javítva az antigén-prezentáció hatékonyságát. A gyulladáskeltés mellett az INF- γ paradox módon képes a gyulladás szabályozására is, például gátolja az IL-17 által kiváltott inflammatorikus folyamatokat, illetve elősegíti a szabályozó T-sejtek kialakulását, melyek elnyomják a túlzott gyulladásos választ (Kopitar-Jerala, 2017).

4.1.1.5 Tumor nekrosis faktor (TNF- α)

A TNF- α -val kapcsolatos első kutatások a citokin tumorsejtekre gyakorolt citotoxikus hatását vizsgálták, melyet az immunsejteken keresztül fejt ki. Elsődleges termelői a makrofágok és a T-sejtek, de szekretálják a B-sejtek, neutrofil granulociták és endotélsejtek is. A citokin célpontjai közé tartozó két fontosabb receptor a TNFR-I és a TNFR-II receptorok, előbbi az enterociták kivételével minden sejten képes expresszálni, azonban a TNFR-II csak az endotélsejteken és az immunsejteken található meg. A TNF- α funkciói közé tartozik, hogy proinflammatorikus válaszokat közvetít és a sejthalálhoz vezető jelátviteli útvonalakat indít el (Zelová and Hošek, 2013). A TNF- α -val kapcsolatos kutatások igazolták, hogy szoros összefüggés van a hepatikus gyulladás és a citokin között. A TNF- α által beindított gyulladásos kaszkád folyamán további gyulladásos citokinek, például IL-1 és IL-6 szintje is megnő, így tovább fokozva a gyulladást. A gyulladásos kaszkád folyamán makrofágok és neutrofil granulociták aktiválódnak, és kerülnek toborzásra a májban, majd még több TNF- α -t és további gyulladásos mediátorokat szabadítanak fel, ezáltal folyamatosan fokozva a májsejtek károsodását. A megnövekedett TNF- α szint fokozza a reaktív oxigénfajták (ROS) termelését, így növeli az oxidatív stresszt a májban. Az oxidatív stressz közvetlenül hozzájárul a sejtkárosodáshoz, a hepatociták apoptózisához, ami súlyosbítja a májgyulladást (Dąbrowska, 2024). Hosszan tartó gyulladás esetén a TNF- α folyamatosan magas szintje krónikus májbetegségekhez, például fibrózishoz vagy cirrózishoz vezethet (Kany et al., 2019).

4.1.1.6 Granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor (GM-CSF)

A GM-CSF számos funkcióval rendelkezik, hematopoetikus növekedési faktor és immunmodulátor is, ezenfelül fontos szerepet játszik a gyulladásos folyamatokban (pro-inflammatorikus hatása révén) és az autoimmun betegségek kialakulásában. Különböző T-sejt altípusok szekretálják a GM-CSF-et, mint például a Th1 és a Th17. Gyulladásos folyamatokban betöltött szerepéhez tartozik, hogy fokozza a gyulladásos sejtek, így a neutrofil granulociták és monociták, valamint a makrofágok proliferációját és differenciálódást, valamint a gyulladás helyére való toborzását és aktiválását, ezzel felerősítve a gyulladásos folyamatokat. Kiemelkedően fontos ez a folyamat a különböző autoimmun betegségekben, például a rheumatoid arthritisben. A GM-CSF nemcsak a gyulladást fokozza, hanem szabályozza az adaptív immunválaszt is. Támogatja a dendritikus sejtek érését, amelyek fontosak a T-sejtek számára az antigének prezentálásához, ezáltal elősegítve a specifikus válaszreakciókat (Shiomi et al., 2016).

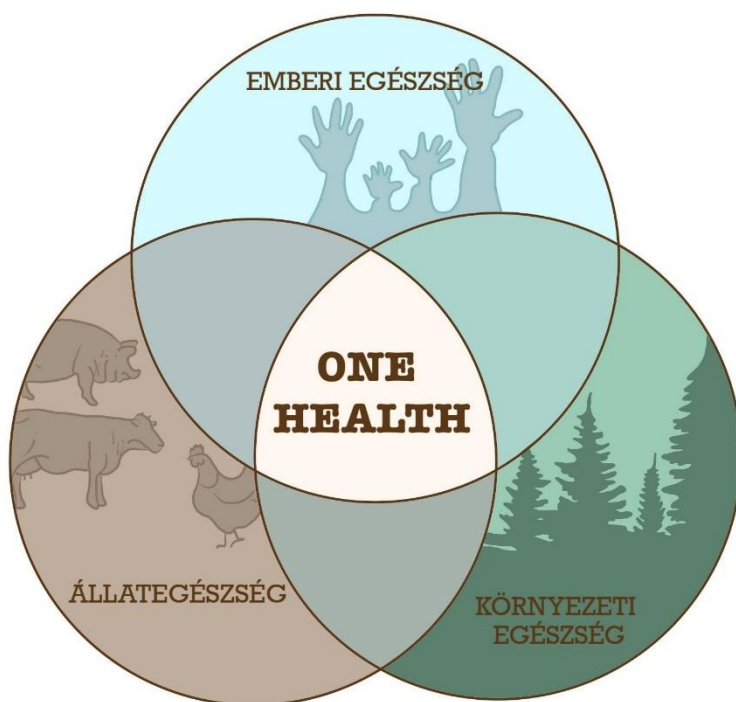
4.2 Az oxidatív stressz

A gyulladásos válaszhoz kapcsolódóan számos esetben oxidatív stressz is kialakulhat. Oxidatív stressz esetén a sejtben túlsúlyba kerülnek a reaktív oxigén származékok (ROS) vagy a reaktív nitrogén származékok (RNS), miközben az antioxidáns védekezés nem képes megfelelően semlegesíteni ezeket a káros molekulákat. A ROS, mint például a hidrogén-peroxid, és a szuperoxid, a sejtek anyagcseréjének természetes melléktermékei, amelyek élettani körülmények között szerepet játszanak például a sejtszintű jelátvitelben és az immunválaszokban is, azonban, ha a szervezet nem képes semlegesíteni a termelődő reaktív oxigénszármazékokat, oxidatív stressz alakul ki, melynek következtében a fehérjék és lipidek is károsodnak. Az oxidatív stressz okozhat gyulladást, mitokondriális működési zavarokat, előidézhet sejthalált és kulcsszerepet játszik a krónikus betegségek kialakulásában (Kotha, et al., 2022). Az oxidatív stressz az állatorvosi gyakorlatban is kiemelt jelentőséggel bír, a haszonállatok esetében hozzájárulhat a takarmány-hasznosításának romlásához, a termelési mutatók csökkenéséhez, gyulladásos betegségek kialakulásához, fertőzések és anyagcsere problémák kialakulásához egyaránt. Az oxidatív stressz csökkentésére az állatorvosi gyakorlatban például vitaminokat (E- és C-vitamint) és szelén alapú kiegészítőket is gyakran alkalmaznak, melyek antioxidáns hatásuk révén hozzájárulnak az oxidatív károsodás csökkentéséhez. A legújabb kutatások, új megközelítések, például fitokemikáliák alkalmazását vizsgálják, mint új terápiás beavatkozások az oxidatív stressz csökkentésére (Ponnampalam, et al., 2022).

4.3 Antimikrobiális rezisztencia a sertéságazatban és a humán egészségügyben

Az antimikrobiális szerek alkalmazása a mezőgazdaságban és az állattenyésztésben lehetővé tette az intenzív fejlődést és fejlesztést, melyet ezekben az ágazatokban tapasztalhatunk, azonban az állattenyésztésben és állattartásban alkalmazott antimikrobiális szerek széleskörű használata hozzájárult a globális mértékű antimikrobiális rezisztencia (AMR) kialakulásához. A legfrissebb adatok szerint a haszonállattartásban felhasznált antibiotikumok biomasszára vetített mennyisége meghaladta az emberi betegségek kezelése során felhasznált mennyiséget, ennek ellenére, a haszonállatgyógyászatban alkalmazott antibiotikumok valós hozzájárulása az AMR terjedéséhez jóval kisebb, mint az előzetes becslések által előre vetített. Azok a haszonállat szektorok, melyekben az antimikrobiális készítmények szájon át, azaz takarmányba vagy ivóvízbe keverve is alkalmazhatóak, jóval nagyobb hányadát teszik ki az ágazatban felhasznált antibiotikumok mennyiségének, így a baromfi-, illetve sertéságazat kiemelt jelentőséggel bírnak az AMR kialakításában. Jelenleg az AMR világszerte kritikus jelentőségű

mind a humán, mind az állategészségügyben, mivel a bakteriális fertőzések kezelése egyre nehezebbé válik, és egy korábban enyhének gondolt fertőzés is súlyos problémákat okozhat egy multirezisztens baktérium esetében. Bizonyos kutatások szerint az emberi bakteriális fertőzések mintegy 26%-a jelenleg rezisztens az első vonalbeli antimikrobiális szerekre. Egy 2022-es becslés szerint 2019-ben 1,27 millió halálesetet okozott közvetlenül az antimikrobiális rezisztencia. Az elérhető szerek hatékonyságának megőrzése és a rezisztencia terjedésének megelőzése, mind az állatorvosi, mind a humángyógyászati szektorban kiemelt jelentőségű, ennek érdekében hozták létre a „One Health” koncepciót (**3. ábra**), amely egy integrált, egységesítő megközelítés, és célja az emberek, az állatok és az ökoszisztémák egészségének és egységességének elősegítése (Rhouma et al., 2022). Az elmúlt évek intézkedései megkövetelik az egészségügyi szektorok együttműködését, segítik az élelmiszertermelő állatokban felhasznált antimikrobiális szerek mennyiségének visszaszorítását, előírják a felhasznált gyógyszerek pontos vezetését, elrendelik a különböző rezisztenciavizsgálatokat a haszonállat szekcióban, kötelezik az állatorvosokat a továbbképzésekre az AMR-rel kapcsolatban, átfogó gondolkodásra sarkalják az élelmiszerláncban dolgozókat, és nem utolsósorban szorgalmazzák az antibiotikumok alternatíváinak kutatását (Mulchandani et al., 2023).



3. ábra: A „One Health” megközelítés. *Saját ábra*

4.4 Az antimikrobiális rezisztencia elleni küzdelem legfontosabb eszközei

A multirezisztens bakteriális törzsek globális elterjedése nagy fenyegetést jelent a humán- és állategészségügy számára, így folyamatos nyomást gyakorolva a tudományra, hogy új módszereket fejlesszenek ki a kórokozók leküzdésére (Zhang et al., 2009). Szükség van tehát új stratégiák kidolgozására az antibiotikum rezisztencia leküzdésének érdekében. Az antibiotikum alternatívák közé tartoznak például a probiotikumok, a posztbiotikumok, a növényi eredetű bioaktív anyagok és az antimikrobiális peptidek is, mivel ezek az alternatívák nem csak közvetlen antimikrobiális hatást fejtenek ki, hanem fontos szerepet játszanak a gyulladás és az oxidatív stressz szabályozásában, ami jelentősen hozzájárulhat az egészségkárosító hatás csökkentéséhez (Helmy et al., 2023).

A probiotikumok élő mikroorganizmusok, amelyek segítséget nyújtanak az immunrendszer számára a bélflóra egyensúlyának fenntartásában és gyulladásgátló hatással is rendelkeznek. A posztbiotikumok a probiotikumok anyagcsere termékei, tehát inaktív mikroorganizmusok. A pro-és posztbiotikumok egyaránt modulálják a gyulladásos folyamatokat, valamint védik a bélrendszer integritását, és segítenek az oxidatív stressz csökkentésében, így hozzájárulva a szisztémás gyulladásos állapotok kezeléséhez (Hijová, 2024).

A növényi eredetű bioaktív anyagok, másnéven fitokemikáliák is ígéretes antibiotikum alternatívák. Antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatással rendelkeznek, valamint segítenek csökkenteni a patogén mikroorganizmusok tapadását a sejtekhez, ezenfelül képesek gátolni a baktériumok növekedését és csökkenthetik a biofilm képződést is. Ilyen növényi kivonatok például a polifenolok, flavonoidok, és a terpenoidok is (Nataraj et al., 2020).

Az antimikrobiális peptidek (AMP) olyan fehérje molekulák, melyek 8-50 aminosavból állnak, nagy eltérések lehetnek közöttük, figyelembe véve a felépítésüket, szerkezetüket és töltésüket. A prokarióta és eukarióta szervezetekben egyaránt megtalálhatóak, a fejlettebb immunrendszerű fajok esetében ezek a peptidek a veleszületett immunitás részét képezik (Zasloff, 2002). A rovarok és növényi szervezetek számára az AMP-k jelentik az elsődleges védelmi vonalat a kórokozók ellen (Li et al., 2021). Az AMP-k kevésbé vagy egyáltalán nem hajlamosak az antimikrobiális rezisztencia kialakítására, így jelenleg számos kutatás vizsgálja ezeket a peptideket. Ezek a molekulák nem csak potenciális antibakteriális gyógyszerek hatóanyagaként szolgálhatnak, hanem intenzív klinikai vizsgálatok folynak immunmodulációs alkalmazásukra, sebgyógyulást elősegítő használatukra, hegek megelőzésére való felhasználásukra (Mahlapuu et al., 2020). Antimikrobiális spektrumuk rendkívül széleskörű,

ilyen aktivitást mutathatnak a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokkal, a gombákkal, a vírusokkal, valamint az egysejtű protozoonokkal szemben egyaránt (Marr et al, 2006). Az AMP-k terápiás felhasználására vonatkozó kísérletek beszámolnak a molekulák gyulladáscsökkentésben betöltött szerepéről, illetve a patogén toxinok semlegesítéséről is szólnak (Kosikowska and Lesner, 2016). Egyéb funkcióik közé tartozik, hogy a fejlettebb élőlények esetében az immunrendszer szabályozásában is részt vesznek (Mookherje and Hancock, 2007). Számos immunmoduláns tulajdonsággal rendelkeznek, amelyek közé tartozik többek között a kemotaxis stimulálása, a kemokinek indukciója, az immunsejt- differenciálódás modulálása, az angiogenezis és a sebgyógyulási válaszok elősegítése, valamint a fertőzések eliminálása. Ezen tulajdonságok egy része elősegíti a gyulladást, azonban az AMP-k valójában csökkentik az LPS-ek által stimulált gyulladást okozó citokinek, például a TNF- α termelését. Ezenfelül serkentik az anti-endotoxin aktivitást, így összességében gátolják a túlzott és káros proinflammatorikus válaszokat (Mahlapuu et al., 2016). A következő években várhatóan ezek a kutatások felgyorsulnak, hogy minél jobban megérthessük az AMP-k működési mechanizmusait, és felhasználási stratégiákat építhessünk, valamint tisztázhassuk a terápiás célra való felhasználásuk korlátjait (Mahlapuu et al., 2020).

Összességében a felsorolt alternatívák nem csak a kórokozók elleni harcban töltenek be kiemelt szerepet, hanem a szervezet természetes védekezőképességének támogatásával mérsékelhetik a gyulladásos és oxidatív károsodásokat, így hozzájárulva az antimikrobiális rezisztencia elleni küzdelemhez.

4.5 Az *in vitro* és *in vivo* sejtmodellek összehasonlítása

Az *in vitro* és *in vivo* sejtmodellek összehasonlítása alapvető fontosságú a biológiai kutatásokban, mivel mindkét módszer különböző előnyökkel és korlátokkal jár. Az *in vitro* modellek, amelyek laboratóriumi körülmények között, kontrollált környezetben végzett kísérleteket jelentenek, gyakran sejtenyészeteket vagy szöveti mintákat használnak. Előnyeik közé tartozik a kísérletek könnyű reprodukálhatósága és a környezet szoros szabályozása, ami pontosabb, akár sejtszinten történő vizsgálatokat tesz lehetővé. Az *in vitro* módszerek azonban nem tükrözik teljes mértékben az élő szervezet komplex biológiai környezetét, így a kísérletek eredményei nem mindig vihetők át közvetlenül a klinikai gyakorlatba. Ezzel szemben az *in vivo* modellek élő szervezeteket alkalmaznak, és jobban reprezentálják az emberi vagy állati test komplex interakcióit. Az *in vivo* vizsgálatok segítségével a kutatók teljes körű képet kaphatnak a biológiai folyamatokról, beleértve a farmakokinetikai és farmakodinámiás folyamatokat is (Pampaloni et al., 2007). Az ilyen modellek egyik legfőbb hátránya a bonyolultabb kísérleti

körülmények és az etikai kérdések, amelyek felmerülnek az élő állatok használatával kapcsolatban. Mindkét megközelítés szükséges a preklinikai kutatásokban, mivel az *in vitro* modellek lehetőséget biztosítanak a mechanizmusok vizsgálatára, míg az *in vivo* modellek igazolják a kísérletek relevanciáját a teljes szervezet szintjén (Saeidnia et al., 2015).

4.5.1 Gyulladásos sejtmodellek

A gyulladásos válaszok kiváltására *in vitro* sejtenyészetekben különböző molekuláris mintázatok, PAMP-ok (pathogen-associated molecular patterns) állnak a rendelkezésünkre. Ezek a molekulák a patogén mikroorganizmusok felszínén található szerkezetek, amelyek a sejtfelszíni receptorokkal kölcsönhatásba lépve aktiválják a gyulladásos jelátviteli útvonalakat. Ilyen sejtfelszíni receptorok például a toll-like receptorok (TLR), melyek felismerik a PAMP-okat és elindítják a gyulladásos folyamatokat. A TLR4 receptor például érzékeli a lipopoliszacharidokat, míg a TLR3 a virális nukleozid analóg poliinozin-policitidilsavat. Ezek a receptorok aktiválják a downstream jelátviteli útvonalakat, végül pedig gyulladásos citokinek termelődéséhez vezetnek, mint az IL-6 és TNF- α (Kang and Lee, 2011).

Az *in vitro* sejtmodellekben leggyakrabban alkalmazott PAMP-ok például a flagellin, a foszfatidilinozitol, a mannan, a különböző oligonukleotidok, a lipopoliszacharidok (LPS), a lipoteikólsav (LTA), a peptidoglikánok, a virális nukleozid analóg poliinozin-policitidilsav (Poli I:C) és a zymosan (Takeuchi and Akira, 2010).

Kutatásunkban az LPS-ek, az LTA, a flagellin és a Poli I:C gyulladáskeltő hatását vizsgáltuk sertés eredetű primer májsejt, és bélhámsejt-tenyészeteken. Munkacsoportunk által végzett korábbi kutatások során több gyulladásos sejtmodellt fejlesztettünk ki csirke máj- és bélhámsejtek tenyésztésére. Két- és háromdimenziós májsejtmodelleket alkalmaztunk annak vizsgálatára, hogy milyen úton aktiválható a csirkék veleszületett immunválasza különböző PAMP-ok révén. A Cells folyóiratban megjelent tanulmányunkban kimutattuk, hogy a háromdimenziós sejt kultúrák eltérő gyulladásos profillal reagálnak a hagyományos kétdimenziós sejtmodellekkel összehasonlítva. Ez az eredmény rávilágít, hogy a háromdimenziós modellek szövettanilag közelebb állnak az *in vivo* kísérletekhez, így jobban modellezik a sejtkörnyezet komplexitását (Sebők et al., 2021). A munkacsoport egy másik tanulmányban csirke eredetű bélhámsejt-tenyészeteket hozott létre, melynek segítségével vizsgálhatóvá váltak a csirke immunrendszerének válaszreakciói, a cathelicidin-2 AMP hatására. A kutatás folyamán a tenyészeteken LPS-sel, valamint Poli I:C-vel fertőzést indukáltunk, így megfigyelve, hogy ezen anyagok jelentősen növelik a különböző gyulladásos citokinek termelődését. Azonban cathelicidin-2-t alkalmazva tanulmányunk rávilágított ezen

AMP potenciális immunmoduláló hatására, csirke bélrendszerében fellépő eltérő eredetű fertőzések esetében kialakuló gyulladásos választ kiváltó környezetben (Mátis et al., 2024).

A gyulladásos sejtmodellek rendkívül fontosak a gyulladás mechanizmusainak megértésében ezenfelül kiemelt szerepet töltenek be az új gyulladáscsökkentő vagy immunmodulátor anyagok tesztelésében is. Ezek a modellek különösen hasznosak lehetnek antibiotikum-alternatívák, mint például antimikrobiális peptidek hatásainak vizsgálatában is, azonban ehhez feltétlenül szükséges a különböző gyulladásokkeltő anyagok hatásának vizsgálata is. Munkacsoportunk által a gazdasági haszonállatok közül, csirke eredetű modellek már rendelkezésre állnak, azonban sertések esetében még nem fejlesztettek ki hasonló *in vitro* gyulladásos modelleket, ami a jövőbeli kutatások egyik fő irányvonala lehet.

5 Célkitűzés

Munkánk során különböző gyulladásos állapotok *in vitro* modellezését terveztük megvalósítani, melynek érdekében, sertés eredetű primer májsejt-tenyészeteket és bél explantátumokat kívántunk létrehozni. Céljaink között szerepelt a sejttenyészetek kezelése különböző gyulladásokeltő anyagok felhasználásával, ezáltal modellezve a bél-máj tengelyt sertésben, nyomon követni a gyulladásokeltő anyagok által kiváltott helyi és szisztémás oxidációs folyamatok összességét és az immunválasz alakulását a gyulladás következtében.

Következő lépésként tehát a létrehozott sejttenyészeteken és explantátumokon kívántunk kezeléseket végrehajtani. A gyulladásos folyamatok és az oxidatív stressz kiváltásához a tenyészeteken különféle eredetű gyulladásokeltő ágenseket kívántunk alkalmazni, ezt követően pedig a májsejt-tenyészetek és bél explantátumok reakcióit terveztük összehasonlítani. Eltérő kezelési csoportokat kívántunk létrehozni, melyeket Gram-pozitív baktérium eredetű LTA-val valamint flagellinnel, Gram-negatív baktériumok LPS endotoxinjával és Poli I:C-val terveztünk kezelni, majd a különböző gyulladásokeltő anyagok által kiváltott gyulladás hatásait és az oxidatív stresszválaszt kívántuk megfigyelni különböző laboratóriumi módszerek segítségével.

A sejtek életképességének nyomon követése céljából, a kezeléseket követően, a sejtek metabolikus aktivitását, illetve a sejtek membrán integritásának változását terveztük monitorozni CCK-8 teszt segítségével, és LDH enzim aktivitás mérésével. A sejtek redox-homeosztázisának vizsgálata céljából különféle redox-paramétereket is mérni kívántunk, például az extracelluláris H_2O_2 mennyiségét, és az intracellulárisan megjelenő MDA-t. Végül pedig a gyulladás mértékének meghatározása céljából több gyulladásos citokin, például: IL-4, IL-6, IL-8, INF- γ , TNF- α és GM-CSF koncentrációjának mérését kívántuk elvégezni újszerű Luminex módszer segítségével.

Összefoglalva tehát kutatásunk célja olyan sertés eredetű májsejttenyészetek és bél explantátumok létrehozása volt, melyek alkalmasak a különböző gyulladásos folyamatok modellezésére, így bemutatva a szisztémás gyulladásos folyamatokban központi szerepet játszó bél-máj tengely működését. Mindemellet a jövőben további céljaink közé tartozik a sejttenyészetek természetes és mesterséges AMP-kel való kezelése, így következő lépésként a mesterséges IDR-1002 antimikrobiális peptid, illetve a sertésspecifikus PR-39 jótékony hatásait tervezzük feltérképezni, eredményeinkkel pedig igazolni a molekulák immun- és redox modulátor hatását, valamint a gyulladásos folyamatokban betöltött előnyös, reguláló szerepét.

6 Anyag és módszer

6.1 Kísérleti állatok

A kísérletünk folyamán egy 15 kg testtömegű választás utáni magyar nagyfehér ártány sertést, vágóhídi körülmények között extermináltak. A sertéstelepet üzemeltető cég a Dunahy Kft, a telep Szekszárd külterületén található. Kutatásunkban közvetlenül nem élő állatokkal, hanem vágóhídi körülmények között exterminált sertésből származó szervrészekkel dolgoztunk, így a Munkahelyi Állatjóléti Bizottság hatályos állásfoglalása alapján nem volt szükségünk állatvédelmi projektengedélyre.

6.2 Vegyszerek

A feltüntetett kivételektől eltekintve a kísérletben használt vegyszereket a Merck Kft.-től (Darmstadt, Németország) szereztük be.

6.3 Előkészületek

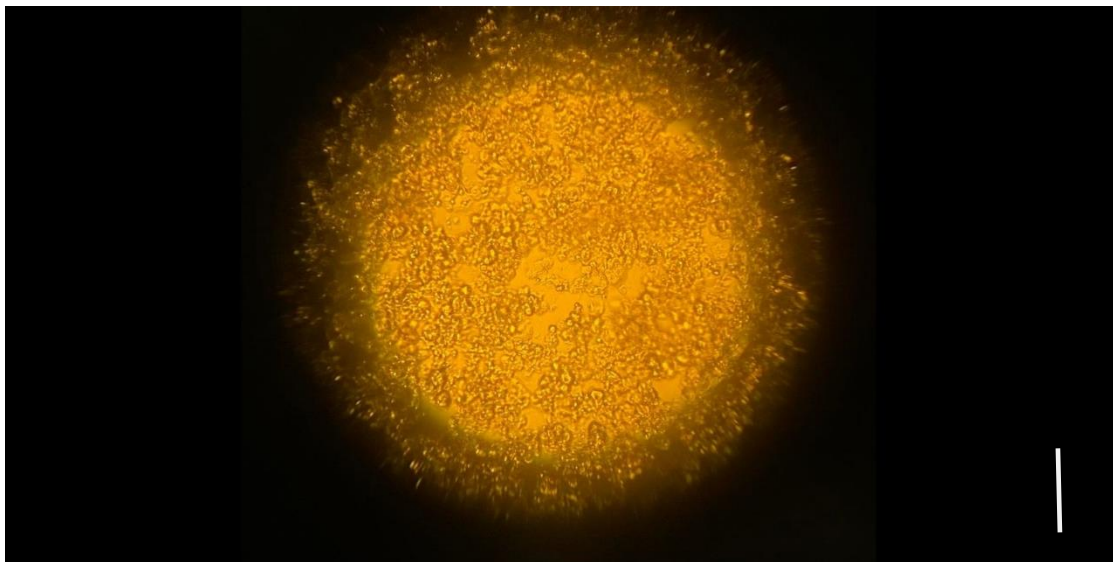
A kísérleti állat exterminálását és kivéreztetését követően került sor a szervek kivételére. Eltávolítottuk a máj *lobus caudatus* lebenyét, és előkészítettük az *ex vivo* perfúzióhoz. A bél explantátum kísérlethez a csípőbélből az *ileocaecalis junctio*-tól proximalisan kimértünk egy 10 cm hosszúságú szakaszt, majd ettől a ponttól proximalis irányban távolítottunk el egy 15 cm hosszúságú bélszakaszt, amelyet felhasználtunk a kísérletben.

6.4 Máj eredetű sejtenyészet készítése

6.4.1 Sejtek izolálása

A máj *lobus caudatus* lebenyét steril, 1% penicillin-sztreptomicinnel kiegészített foszfáttal pufferolt sóoldatban (PBS) (Pen-Strep, Gibco [Waltham, MA, Amerikai Egyesült Államok]), jégbe hűtve a sejtlaboratóriumba szállítottuk. A májsejtek izolálását 3 lépcsős *ex vivo* perfúzió segítségével, steril fülkében végeztük el, melynek folyamán a steril pufferoldatokat a metszéslapon, a látható nagyereken keresztül, kanül nélkül, közvetlenül a lebenybe vezettük, miközben a májlebenyt egy steril fém szűrőre helyeztük, az elfolyó pufferoldatokat pedig felfogtuk és elöntöttük. A máj állományába Carbogennel (95% O₂, 5% CO₂) átbuborékolattott, 37 °C hőmérsékletre előmelegített pufferoldatokat juttattunk, 100 ml/perc sebességgel. Első lépésként a májat 500 ml etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA, 1 g/l) tartalmazó HANKS oldattal mostuk át, majd ezt követően 600 ml EDTA-mentes HANKS puffert használtunk, utolsó lépésként pedig a máj állományát 300 ml IV. típusú kollagenázzal (1 g/l, 7 mM MgCl₂ [Nordmark, Uetersen, Németország]) kiegészített HANKS puffer segítségével emésztettük.

Az *ex vivo* perfúziót a sejtek kinyerése és tisztítása követte, steril körülmények között, folyamatos jégen történő hűtés mellett. A Glisson-tok felvágása után, a korábban emésztett máj parenchimát 100 µm pórusméretű steril mull-lapon szűrtük át, így eltávolítottuk a megmaradt sejtaggregátumokat. Az emésztett máj parenchimát ezt követően 75 percen keresztül inkubáltuk 5%-os BSA tartalmú Hanks pufferben. Az inkubáció után a primer sejtszuspenziót háromszor centrifugáltunk (50g, 75 másodperc, 4 °C), az üledéket pedig mindhárom esetben William's Medium E (kiegészítve: 0,22 % NaHCO₃, 50 mg/ml gentamycin, 2 mM glutamin, 4 µm/l dexametazon, 20 NE/L inzulin, 0,5 µm/ml amfotericin-B és 5% magzati szarvasmarha szérum [FBS]) tápfolyadék segítségével reszuszpendáltuk, így a szűrési folyamat végére egy májsejtekben gazdag sejtszuspenziót kaptunk. Ezután került sor a sejtek életképességének ellenőrzésére és számának meghatározására tripánkékes festéssel. A tripánkék azokba a sejtekbe képes behatolni, melyeknek sejtmembránja károsodott, ezeket a sejteket kékre színezi, az intakt, élő sejtek színe nem változik. Így az eljárás lehetővé teszi az élő és nem élő sejtek elkülönítését, és arányainak meghatározását, mely a mi esetünkben 95% élő sejtet jelentett. A sejtszámlálást fénymikroszkóppal, Bürker-kamra segítségével végeztük, ezt követően a sejtkoncentrációt 4 x 10⁵/ml-re állítottuk be. A **4. ábrán** frissen lerakott izolált májsejteket látunk, a konfluens tenyészetek kialakulása előtti állapotban.



4. ábra: Izolált, frissen lerakott sertés eredetű májsejtek fénymikroszkópos képe

40x nagyítás, méretvonal=100µm

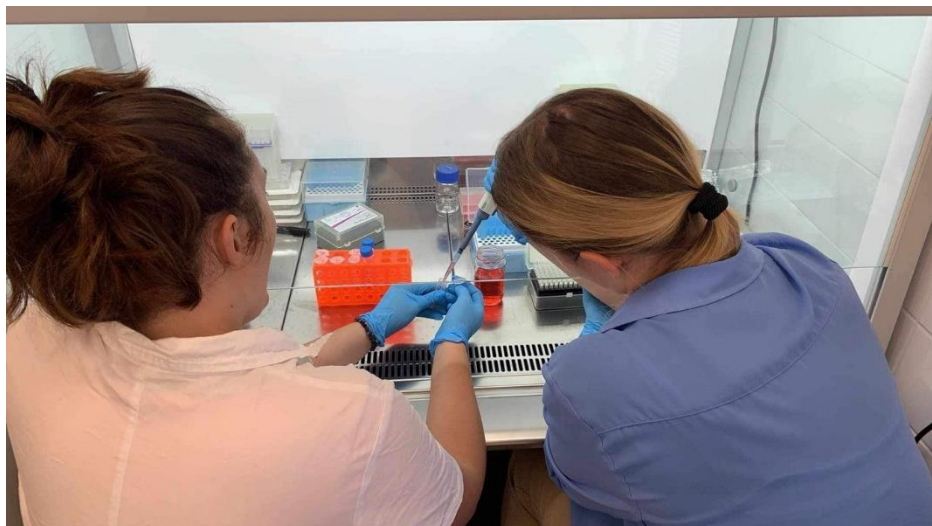
6.4.2 Sejtek lerakása

A sejtszuszpénzió lerakása 24-lyukú tenyésztőedényekre (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Németország) történt, melyeket előzetesen I-es típusú kollagénnel oldattal vontunk be (300 µl/lyuk). Ezután a tenyészeteket 4 órán keresztül 37 °C-on, 5%-os CO₂ tartalom mellett inkubálunk, majd elvégeztük az első tápfolyadék cserét a fent leírt, megfelelően kiegészített William's Medium E tápfolyadékkal. A sejtek metabolikus aktivitásának nyomon követésére a sejtszuszpénziót 96-lyukú lemezekre (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Németország) raktuk le (100 µl/lyuk), és a 24-lyukú edényekkel azonos módon inkubáltuk. 24 óra elteltével egyrétegű, konfluens tenyészetek képződtek.

6.5 Bél explantátumok készítése

A bél explantátumok kialakításához ugyanazon állat került felhasználásra. Az explantátumok elkészítéséhez a csípőbél 15 cm hosszúságú szakaszát használtuk fel, majd a zsírszövet eltávolítását követően PBS (1% penicillin-sztreptomocinnal [5 ml] kiegészítve) segítségével mostuk a bélfal visceralis felületét. Ezt követően a bélszakaszt hosszában felvágtuk, majd mindkét oldalát 4 alkalommal PBS segítségével öblítettük, így helyeztük steril üvegedénybe. A tenyészet készítésének további lépéseit steril fülke alatt végeztük, folyamatos hűtés mellett.

A bélhám sejtmmodelleket a bélnyálkahártyából nyert kis szövetdarabok, úgynevezett explantátumok kinyerésével hoztuk létre. A csípőbelet a korábbiakban leírt mosási lépéseket követően egy steril laphoz rögzítettük, majd a bélfalból 1,5 mm átmérőjű bélhámдарabokat vágunk ki, biopsziás körkés (MDE GmbH; Heidelberg, Németország) segítségével. A bélhámдарabokat egyesével 96-lyukú tenyésztőedénybe helyeztük, és az így nyert explantátumokra lyukanként 200 µl DMEM-F12 tápfolyadékot mértünk. A DMEM-F12 tápfolyadékot az alábbiakkal kiegészítve alkalmaztuk: (2,5% FBS [hőkezelt], 1% L-glutamin, 1% penicillin-sztreptomycin, és HCMTM SingleQuots™ Kit (Lonza-Biocenter [Szeged,Hungary] kiegészítőt tartalmazó tápfolyadék). Két óra inkubációt (37 °C, 5% CO₂) és egyszeri tápfolyadékcserét követően sor került a vékonybélhám explantátumok kezelésére, amely 12 órán keresztül tartott (**5. ábra**).



5. ábra: A sejtek mosása, a sejtenyészetek készítése és kezelése steril fülke alatt

6.6 A sejtenyészetek kezelése

A kezeléseket a májsejt-tenyészetek esetében 24 óra elteltével, míg a bél explantátumok esetében 2 óra múlva végeztük. 9 kezelési csoportot alakítottunk ki, mindegyik csoporthoz 6 máj eredetű sejtenyészet vagy bél explantátum tartozott. Mind a májsejt-tenyészetek, mind a bél explantátum esetében létrehoztunk egy-egy kontrollcsoportot, amelyek nem részesültek kezelésben. Mindkét sejt kultúra esetében kialakítottunk egy 10 µg/ml és egy 50 µg/ml (*Escherichia coli*-ból [O55:B5] származó) LPS-sel kezelt csoportot. A következő két csoportot a 10 µg /ml és 50 µg/ml *Staphylococcus aureus* eredetű LTA-val egészítettük ki. Ezenfelül használtunk még *Salmonella* Typhimurium eredetű flagellint 100 ng/ml és 250 ng/ml koncentrációkban, míg az utolsó kezelési csoportjainkat Poli I:C-val egészítettük ki, 50 µg/ml és 100 µg/ml koncentrációkban. A protokollnak megfelelően a Poli I:C-t 50 °C-on melegítettük 3 percen át, majd visszahűtöttük, mielőtt a sejtenyészetekhez adtuk volna.

6.7 A sejtenyészetek és explantátumok lizálása

A kezelési idő letelte után, a 24-lyukú tenyésztőedények tápfolyadékaiából mintákat vettünk és ezeket további felhasználásig -80 °C-on tároltuk. A tápfolyadékok leszívása után a sejteket óvatosan mostuk PBS-sel. A mosást követően elvégeztük a sejtek lizálását szakaszos ultrahangos kezeléssel (1/s), lyukanként 40 µl M-PER (Mammalian protein extraction reagent) lízis puffert felhasználva. A homogenizátorral történő kezeléseket 5 másodpercig alkalmaztuk. A folyamat elvégzésével a sejt lizátumokat is Eppendorf csövekbe gyűjtöttük, ezt követően a tápfolyadékok tárolásával megegyező módon a lizátum mintákat is -80 °C-on tároltuk a további felhasználásig.

6.8 Laboratóriumi mérések

6.8.1 CCK-8 teszt

A Cell Counting Kit (CCK)-8 teszt (Dojindo Molecular Technologies, Rockville, MD, Amerikai Egyesült Államok) a sejtek metabolikus aktivitásának mérésére alkalmas, amely a sejtek redukált koenzim ($\text{NADH} + \text{H}^+$, $\text{NADPH} + \text{H}^+$) termelő kapacitásának mérésén alapszik. A mérés kolorimetriás módszerrel történt, amelynek segítségével nyomon követtük a színintenzitás változását, ami egyenesen arányos a reakcióban keletkezett, a redukált koenzimek hatására kialakuló színes kelát mennyiségével. A vizsgálatokat a gyártó utasításainak megfelelően végeztük, a tesztet mind a májsejt-tenyészetek, mind a bél explantátumok esetében elvégeztük. A sejt kultúrák kezelését követően, valamint a minták tápfolyadékának eltávolítása után minden lyukba, minden mintához 100 μl friss tápfolyadékot és 10 μl CCK-8 reagenst helyeztünk, majd 2 órán át inkubáltuk ezeket 37 °C-on a korábbiakban leírt körülmények között. A májsejt-tenyészetek esetében friss William' Medium E tápfolyadékot, a bél esetében DMEM-et alkalmaztunk. A CCK-8 reagens vízzel oldható tetrazólium-sót (WST-8) tartalmaz, ami redukálódik a sejtek által termelt dehidrogenáz enzimek hatására és formazánná alakul az inkubáció során. Az így keletkezett narancssárga vegyület a tápfolyadékban oldódik és fotometrálnak 450 nm-en, a keletkezett formazán mennyisége pedig a sejt metabolikus aktivitásának mérőszámaként szolgál. Az inkubáció után a tápfolyadékokat leszívtuk és egy tiszta 96 lyukú lemezre vittük, majd az abszorbanciát 450 nm-en Multiskan GO 3.2 olvasóval (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Amerikai Egyesült Államok) mértük.

6.8.2 LDH aktivitás

Az extracelluláris laktát-dehidrogenáz (LDH) enzim emelkedése jelezheti a sejtmembrán károsodását, így ezen enzim aktivitásának mérésével információt nyertünk a kezeléseket követően a sejtek állapotáról. A vizsgálatot mind a májsejt-tenyészetek, mind a bél explantátumok esetében elvégeztük. Az LDH mennyiségi meghatározására kolorimetriás LDH Assay Kitet (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok). A gyártó utasításait követve a komponenseket szobahőmérsékleten kevertük össze, majd standard hígítási sorozatot készítettünk. Az előzetes próbamérések alapján a következő hígítási koncentrációkkal dolgoztunk: a májsejt-tenyészetek esetében 25 μl mintát, a bél explantátumok esetében 8 μl mintát egy tiszta 96 lyukú lemezre mértünk és a kapott pufferoldattal 50 μl végtérfogatra hígítottuk. Az abszorbancia változását 450 nm-en mértük Multiskan GO 3.2 olvasóval percenként, addig az időpontig, amíg el nem érték a legkoncentráltabb standardok értékét. Ezt követően az enzimaktivitást a protokollban feltüntetett kalibrációs görbével számítottunk ki.

6.8.3 H₂O₂ koncentráció mérése

A hidrogén-peroxid (H₂O₂) az egyik legfontosabb reaktív oxigén származék, melynek megfigyelése információval szolgál a sejtek redox állapotáról. A májsejt-tenyészetek esetében fluorometriás Amplex Red technikát (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Amerikai Egyesült Államok) alkalmaztuk az extracelluláris H₂O₂ szint mérésére a sejtenyészetek tápfolyadékában. Amplex Red munka oldatot (100M) készítettünk, amelyhez a gyártó előírása szerint 20mM hidrogén-peroxid oldatot, 50 µl Amplex Red törzsoldatot (700 µl dimetilszulfoxidban (DMSO) feloldva), és torna-peroxidázt (HRP) (0,2 U/ml), és 4,85 ml Amplex puffert használtunk fel. Ezt követően a frissen készített munkaoldatból minden lyukra 50 µl-t és 50 µl tápfolyadékot mértünk, majd szobahőmérsékleten (21 °C) 30 percig fénytől védve inkubáltuk. Peroxidáz jelenlétében az Amplex Red reagens a H₂O₂-vel 1:1 sztöchiometrikus reakcióba lép és vörös fluoreszcens oxidációs termék, resorufin keletkezik. Az inkubációs idő letelte után detektáltuk a resorufin gerjesztési (ex= 560 nm) és emissziós (em= 590 nm) fluoreszcenciáját Victor X2 2030 fluoriméterrel (Perkin Elmer, Waltham, MA, Amerikai Egyesült Államok).

6.8.4 Lipidperoxidáció meghatározása

A májsejt-tenyészetek esetében a lipidperoxidáció meghatározására speciális kolorimetriás tesztet alkalmaztunk. A malondialdehid (MDA) a lipidperoxidáció alacsony molekulatömegű végterméke, aminek mennyiségét a tiobarbituráttal történő reakciója során keletkező színes termék mennyiségének mérésével lehet meghatározni. Az MDA koncentrációt a sejtlizátumok centrifugálása után mértük a gyártó utasításai szerint. 300 µl frissen készített tiobarbitursav törzsoldatot kevertünk össze 100 µl hígított sejtlizátummal a gyártó protokollja szerint, és az oldatot 1 órán keresztül 95 °C-on inkubáltuk, majd 10 percig jégen hűtöttük. Ezt követően az abszorbanciát 532 nm-en mértük Multiskan GO 3.2 olvasóval (7. ábra).

6.8.5 Gyulladásos mediátorok koncentrációjának mérése

A Luminex technológia segítségével határoztuk meg különböző pro- és anti-inflammatorikus hatású citokin, illetve kemokin koncentrációját a sejtek tápfolyadékából. A GM-CSF, IFN-γ, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 és TNF-α koncentrációjának mérését végeztük el a gyártó utasításai szerint. A mintákat 96 lyukú lemezen, duplikátumban mértük, vakpróba és standard sor segítségével határoztuk meg az egyes koncentrációkat. A lemezre felvittünk 25 µl-t a mintákból, a standard hígítási sorból és a vakpróbából, mindegyikhez 25 µl puffert (gyártó által biztosítva), és további 25 µl mikrogöngy keveréket (melyben az egyes fehérjékre specifikus befogó

antitesttel bevont, és egyedi színkóddal megjelölt mikrogyöngyök keveréke volt) adtunk. Az egy éjszakán át tartó inkubációt (4 °C) és a megfelelő mosási lépéseket követően biotinilált detektáló antitestek és sztreptavidin-fikoeritrin keverékét vittük fel a lemezre. A megadott inkubálási idő után és az utolsó mosást követően a gyöngyöket visszaoldottuk köpenyfoliadékban, és további 5 percig rázógépen kevertük. A gyöngyök fluoreszcens intenzitását Luminex MAGPIX® műszerrel detektáltuk, a kapott adatokat Milliplex Belysa 1.1 szoftverrel dolgoztuk fel (Merck Millipore, Darmstadt, Németország)., melynek során a gyöngyök medián fluoreszcencia intenzitásának (MFI) adatait felhasználva az ötparaméteres, logaritmikus regressziós görbéket használtunk a minták fehérje tartalmának meghatározásához.

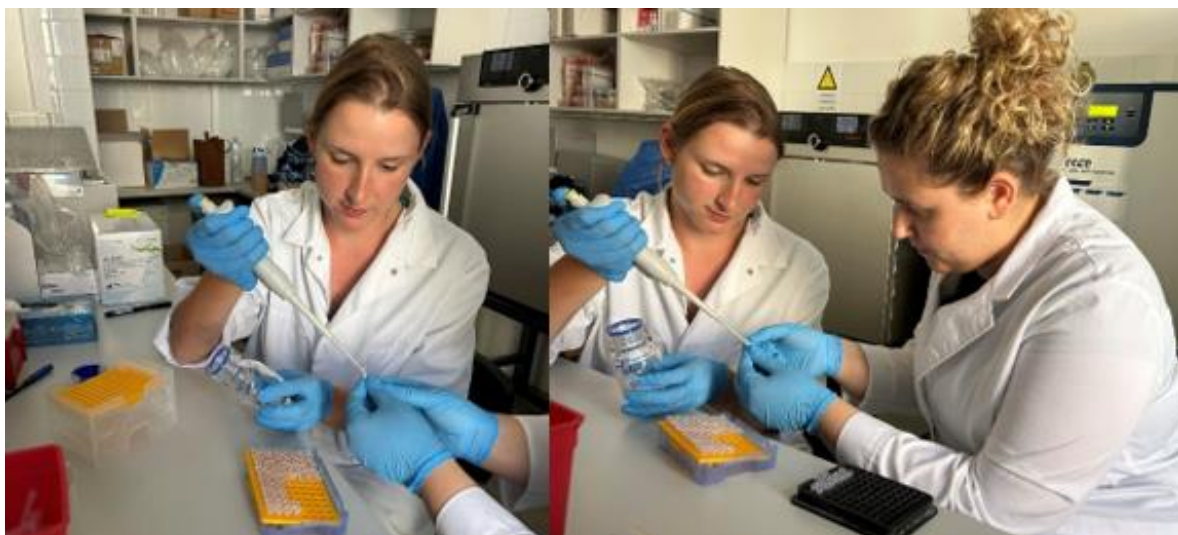
6.9 Statisztika

A statisztikai elemzéséhez az R 4.0.3-as verziójú szoftvert használtuk, az eredmények normál eloszlást mutattak. A kiértékeléshez egyutas ANOVA és post-hoc tesztek alkalmaztunk. Az eredményeket átlagként és az átlag standard hibájaként (SEM) értékeltük. A kezelt csoportokat minden esetben a kontroll csoporthoz hasonlítottuk. Szignifikánsnak tekintettük a különbséget, ha p-érték kisebb volt, mint 0,05. A grafikonok a GraphPad Prism 9 szoftverrel (Graphpad Software Inc., San Diegóban, CA, Amerikai Egyesült Államok) készültek.

6.10 Saját munka

Kísérletünk folyamán az első naptól részt vehettem a laboratóriumi munkában a tanszék munkatársaival. Segédkeztem a májsejt, illetve bélhámsejt-tenyészetek létrehozásában, a sejtek izolálásában, a sejtek lerakásában, illetve a későbbiekben a sejttenyészetek kezelésében is. Ezekben a folyamatokban többször dolgoztam steril fülke alatt témavezetőmmel Dr. Mátis Gáborral. Kutatásunk következő lépéseiben is figyelemmel kísérhettem társtémavezetőm dr. Lajos Andrea munkásságát, és több teszt előkészítésében és elvégzésében is segítségére lehettem, részt vettem tehát a CCK8- teszt, az extracelluláris LDH-aktivitás mérés, az Amplex Red teszt, valamint az MDA koncentráció mérésében is (**6. ábra**).

A gyulladásos citokinek méréséhez szükséges Luminex technológia a Pécsi Tudományegyetemen volt számunkra elérhető, ahol a konkrét mérést Dr. Kemény Ágnes egyetemi docens végezte el, de a minták előkészítése szintén saját feladataim közé tartozott. Ezenfelül pedig saját munkámhoz tartozott a GraphPad Prism 9 szoftver megismerése, és a program segítségével az eredmények elemzése, és a grafikonok szerkesztése.



6. ábra: Lipidperoxidáció meghatározása az MDA mennyiségének tiobarbiturát reagenssel történő reakciója alapján

7 Eredmények

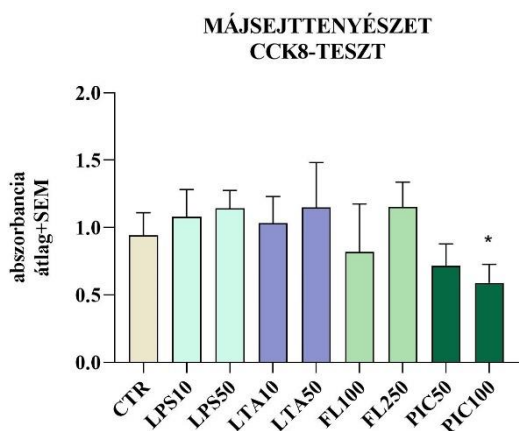
7.1 Májsejttenyészetek

7.1.1 A sejtek metabolikus aktivitásának mérése

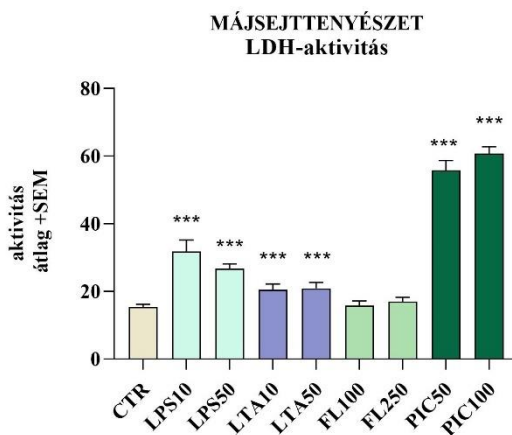
A májsejttenyészetben a sejtek metabolikus aktivitása a 100 µg/ml koncentrációban alkalmazott Poli I:C kezelést követően szignifikánsan csökkent ($P < 0,033$) a kontroll csoporthoz képest. A többi csoportban nem tapasztaltunk szignifikáns változást a sejtek aktivitásában (7. ábra).

7.1.2 A sejtmembrán integritásának vizsgálata

A LDH-enzim aktivitásának mérését követően több kezelési csoportban is szignifikáns változások voltak megfigyelhetők. Az extracelluláris LDH-enzim aktivitás szignifikánsan megemelkedett a kontroll csoporthoz képest a következő kezelési csoportokban: 10 µg/ml és 50 µg/ml koncentrációban alkalmazott LPS esetén, 10 µg/ml koncentrációban és 50 µg/ml koncentrációban alkalmazott LTA kezelést követően, valamint 50 µg/ml és 100 µg/ml koncentrációban alkalmazott Poli I:C esetén, a P érték minden esetben kisebb, mint 0,001. A flagellinnel kezelt csoportokban szignifikáns eltérés nem volt tapasztalható (8. ábra).



7. ábra: A sejtek metabolikus aktivitásának nyomon követése különböző gyulladáskeltő molekulákkal való kezelést követően. CTR=kontroll, LPS10=10 µg /ml lipopoliszacharid (LPS), LPS50= 50 µg /ml lipopoliszacharid, LTA10=10 µg /ml lipoteikólsav (LTA), LTA50=50 µg /ml lipoteikólsav, FL100=100 ng/ml flagellin (FL), FL250=250 ng/ml flagellin, PIC50=50 µg /ml poli I:C (PIC), PIC100= 100 µg /ml poli I:C (n=6/csoport, átlag+-SEM, * $P < 0,05$)



8. ábra: Az extracelluláris LDH-enzim aktivitásának nyomon követése különböző gyulladáskeltő molekulákkal való kezelést követően. CTR=kontroll, LPS10=10 µg /ml LPS, LPS50= 50 µg /ml LPS, LTA10=10 µg /ml LTA, LTA50=50 µg /ml LTA, FL100=100 ng/ml FL, FL250=250 ng/ml FL, PIC50=50 µg /ml PIC, PIC100= 100 µg /ml PIC (n=6/csoport, átlag+-SEM, *** $P < 0,001$)

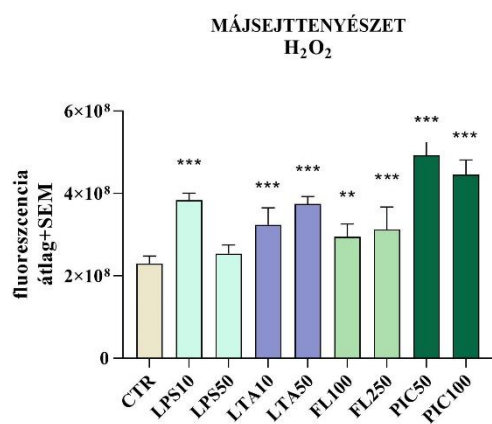
7.1.3 A sejtek redox-homeosztázisának vizsgálata

7.1.3.1 A tápfolyadék extracelluláris H_2O_2 koncentrációjának meghatározása

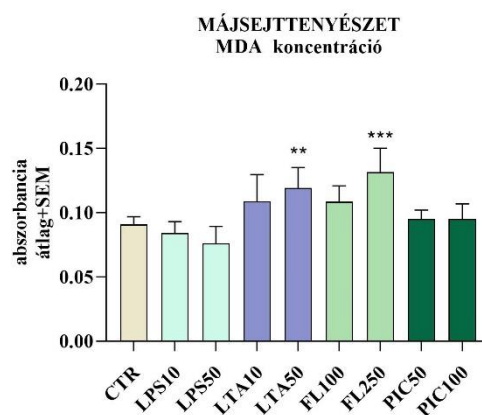
Az Amplex Red teszt eredményei között a legtöbb kezelési csoport szignifikáns eltérést mutatott az extracelluláris H_2O_2 koncentrációt illetően a kontroll csoporthoz képest. A szignifikáns emelkedést mutató csoportok a következők voltak: 10 μ g/ml koncentrációban alkalmazott LPS ($P<0,001$), 10 μ g/ml és 50 μ g/ml koncentrációban alkalmazott LTA ($P<0,001$), 100 ng/ml ($P=0,008$), 250 ng/ml koncentrációban alkalmazott flagellin ($P=0,001$), valamint 10 μ g/ml és 50 μ g/ml koncentrációban alkalmazott Poli I:C ($P<0,001$). Az 50 μ g/ml koncentrációban alkalmazott LPS esetén nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a kontroll csoporthoz képest (9. ábra).

7.1.3.2 A sejtizátumok MDA koncentrációjának meghatározása

A lipidperoxidáció mértékének meghatározása érdekében végzett MDA koncentráció mérés eredményeiben két kezelési csoportban tapasztaltunk szignifikáns emelkedést a kontroll csoporthoz képest: 50 μ g/ml koncentrációban alkalmazott LTA esetében ($P=0,006$), illetve a 250 ng/ml koncentrációban alkalmazott flagellin esetében ($P<0,001$). A többi kezelési csoport nem produkált szignifikáns változásokat a kontroll csoporthoz képest (10. ábra).



9. ábra: Az extracelluláris H_2O_2 koncentráció nyomon követése különböző gyulladásos faktorokkal való kezelést követően. CTR=kontroll, LPS10=10 μ g/ml LPS, LPS50= 50 μ g /ml LPS, LTA10=10 μ g /ml LTA, LTA50=50 μ g /ml LTA, FL100=100 ng/ml FL, FL250=250 ng/ml FL, PIC50=50 μ g /ml PIC, PIC100= 100 μ g /ml PIC (n=6/csoport, átlag+-SEM, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$)



10. ábra: A lipidperoxidáció mértékének nyomon követése különböző gyulladásos faktorokkal való kezelést követően. CTR=kontroll, LPS10=10 μ g /ml LPS, LPS50= 50 μ g /ml LPS, LTA10=10 μ g /ml LTA, LTA50=50 μ g /ml LTA, FL100=100 ng/ml FL, FL250=250 ng/ml FL, PIC50=50 μ g /ml PIC, PIC100= 100 μ g /ml PIC (n=6/csoport, átlag+-SEM, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$)

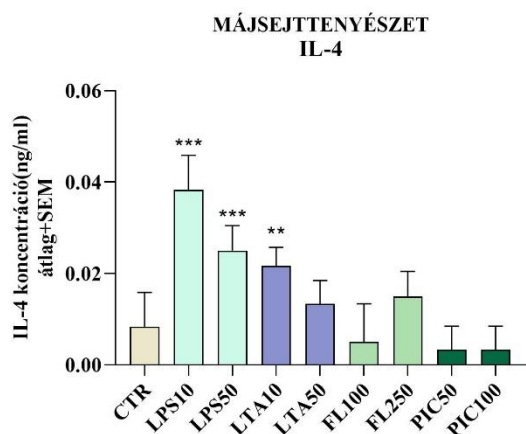
7.1.4 A sejtek tápfolyadékában található gyulladásos mediátorok koncentrációjának mérése

7.1.4.1 Az IL-4 koncentráció meghatározása

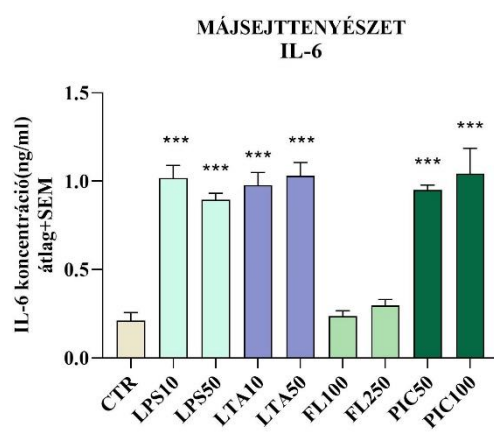
A sejtek tápfolyadékából mért IL-4 koncentrációk közül három kezelési csoport esetében fordultak elő szignifikáns eltérések a kontroll csoporthoz képest, a citokin koncentrációja szignifikánsan emelkedett 10 µg/ml koncentrációban ($P<0,001$) és 50 µg/ml koncentrációban ($P<0,001$) alkalmazott LPS kezelés esetén, illetve 10 µg/ml koncentrációban ($P=0,003$) alkalmazott LTA kezelés esetén. A többi kezelési csoportban nem tapasztalhattunk szignifikáns eltéréseket a kontroll csoporthoz képest (11. ábra).

7.1.4.2 Az IL-6 koncentráció meghatározása

A májsejttenyészetek tápfolyadékából mért IL-6 koncentrációk között több kezelési csoportban is szignifikáns koncentráció emelkedést figyelhattunk meg a kontroll csoporthoz képest. Az IL-6 koncentrációja szignifikánsan megnőtt a 10 µg/ml és 50 µg/ml koncentrációban alkalmazott LPS kezelés, a 10 µg/ml és 50 µg/ml koncentrációban alkalmazott LTA kezelés, és az 50 ng/ml és 100 ng/ml koncentrációban alkalmazott Poli I:C kezelés esetén. A P érték mindegyik esetben kisebb, mint 0,001. A flagellinnel kezelt csoportokban nem volt tapasztalható szignifikáns LDH koncentráció eltérés a kontroll csoporthoz képest (12. ábra).



11. ábra: Az IL-4 koncentráció nyomon követése különböző gyulladásos faktorokkal való kezelést követően. CTR=kontroll, LPS10=10 µg /ml LPS, LPS50= 50 µg /ml LPS, LTA10=10 µg /ml LTA, LTA50=50 µg /ml LTA, FL100=100 ng/ml FL, FL250=250 ng/ml FL, PIC50=50 µg /ml PIC, PIC100= 100 µg /ml PIC (n=6/csoport, átlag+-SEM, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$)



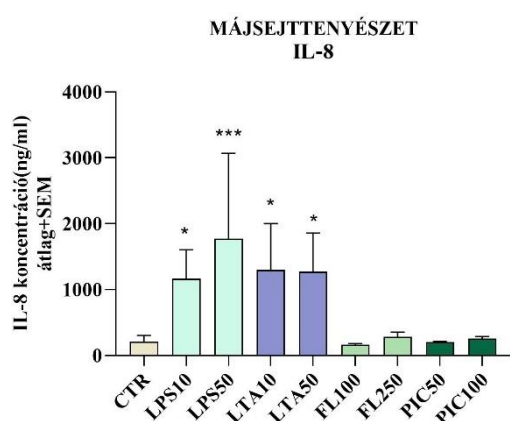
12. ábra: Az IL-6 koncentráció nyomon követése különböző gyulladásos faktorokkal való kezelést követően. CTR=kontroll, LPS10=10 µg /ml LPS, LPS50= 50 µg /ml LPS, LTA10=10 µg /ml LTA, LTA50=50 µg /ml LTA, FL100=100 ng/ml FL, FL250=250 ng/ml FL, PIC50=50 µg /ml PIC, PIC100= 100 µg /ml PIC (n=6/csoport, átlag+-SEM, *** $P<0,001$)

7.1.4.3 Az IL-8 koncentrációjának meghatározása

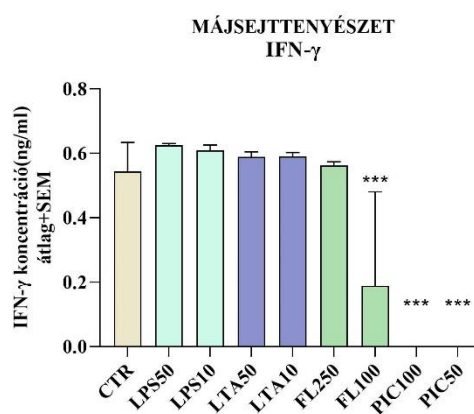
Az IL-8 koncentrációja szignifikáns emelkedést mutatott a kontroll csoporthoz képest az LPS-el, illetve az LTA-val kezelt csoportokban. A szignifikáns eltéréseket mutató csoportok: 10 µg/ml koncentrációban alkalmazott (P=0,038) és 50 µg/ml koncentrációban alkalmazott (P<0,001) LPS-el kezelt csoportok, illetve 10 µg/ml koncentrációban alkalmazott (P=0,014) és 50 µg/ml koncentrációban alkalmazott (P=0,017) LTA -val kezelt csoportok. A további kezelési csoportokban nem tapasztalhattunk szignifikáns eltérést a kontroll csoporthoz képest (13. ábra).

7.1.4.4 Az IFN-γ koncentrációjának meghatározása

A sejtek tápfolyadékának IFN-γ koncentrációjának meghatározását követően több kezelési csoportban szignifikánsan csökkent a citokin koncentrációja a kontroll csoporthoz képest. A 100 ng/ml koncentrációban alkalmazott flagellin, valamint az 50 µg/ml és 100 µg/ml koncentrációban alkalmazott Poli I:C esetén tapasztalhattunk szignifikáns csökkenést a kontroll csoporthoz képest, a P érték mindhárom esetben kisebb, mint 0,001. A többi kezelési csoportban nem tapasztaltunk szignifikáns eltéréseket a kontroll csoporthoz képest (14. ábra).



13. ábra: Az IL-8 koncentráció nyomon követése különböző gyulladásos faktorokkal való kezelést követően. CTR=kontroll, LPS10=10 µg /ml LPS, LPS50= 50 µg /ml LPS, LTA10=10 µg /ml LTA, LTA50=50 µg /ml LTA, FL100=100 ng/ml FL, FL250=250 ng/ml FL, PIC50=50 µg /ml PIC, PIC100= 100 µg /ml PIC (n=6/csoport, átlag+-SEM, *P<0,05, ***P<0,001)



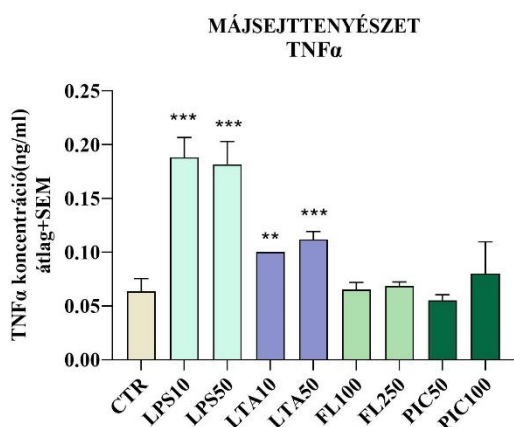
14. ábra: Az IFN-γ koncentráció nyomon követése különböző gyulladásos faktorokkal való kezelést követően. CTR=kontroll, LPS10=10 µg /ml LPS, LPS50= 50 µg /ml LPS, LTA10=10 µg /ml LTA, LTA50=50 µg /ml LTA, FL100=100 ng/ml FL, FL250=250 ng/ml FL, PIC50=50 µg /ml PIC, PIC100= 100 µg /ml PIC (n=6/csoport, átlag+-SEM, ***P<0,001)

7.1.4.5 A TNF- α koncentrációjának meghatározása

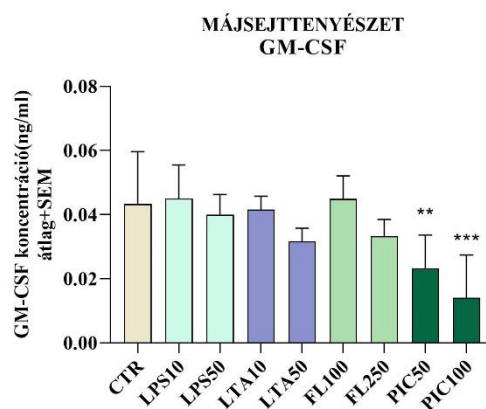
A TNF- α koncentrációjának mérését követően a következő csoportokban tapasztalhattunk szignifikáns eltéréseket a kontroll csoporthoz képest: 10 μ g/ml és 50 μ g/ml koncentrációban alkalmazott LPS kezelés esetén ($P<0,001$), illetve 10 μ g/ml koncentrációban alkalmazott ($P=0,001$) és 50 μ g/ml koncentrációban alkalmazott ($P<0,001$) LTA esetén figyelhattunk meg szignifikáns TNF- α koncentráció emelkedést a kontroll csoporthoz képest. A további kezelési csoportjaink nem mutattak szignifikáns változást a kontroll csoporttal összehasonlítva (15. ábra).

7.1.4.6 A GM-CSF koncentrációjának meghatározása

A GM-CSF koncentrációja esetében két csoportban szignifikáns koncentráció csökkenést tapasztaltunk a kontroll csoporthoz viszonyítva. A Poli I:C-vel kezelt csoportok esetében 50 μ g/ml koncentráció esetében ($P=0,006$) és 100 μ g/ml koncentráció esetében ($P<0,001$) is szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető. Az egyéb kezelési csoportok nem mutattak szignifikáns eltérést a kontroll csoporthoz képest (16. ábra).



15. ábra: A TNF- α koncentráció nyomon követése különböző gyulladásos faktorokkal való kezelést követően. CTR=kontroll, LPS10=10 μ g /ml LPS, LPS50= 50 μ g /ml LPS, LTA10=10 μ g /ml LTA, LTA50=50 μ g /ml LTA, FL100=100 ng/ml FL, FL250=250 ng/ml FL, PIC50=50 μ g /ml PIC, PIC100= 100 μ g /ml PIC (n=6/csoport, átlag+-SEM, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$)



16. ábra: A GM-CSF koncentráció nyomon követése különböző gyulladásos faktorokkal való kezelést követően. CTR=kontroll, LPS10=10 μ g /ml LPS, LPS50= 50 μ g /ml LPS, LTA10=10 μ g /ml LTA, LTA50=50 μ g /ml LTA, FL100=100 ng/ml FL, FL250=250 ng/ml FL, PIC50=50 μ g /ml PIC, PIC100= 100 μ g /ml PIC (n=6/csoport, átlag+-SEM, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$)

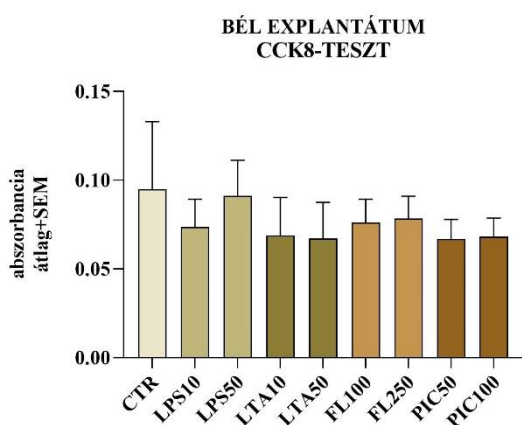
7.1.5 A sejtek metabolikus aktivitásának mérése

A bél explantátum tenyészeteken végzett CCK-8 teszt elvégzését követően egyik kezelési csoportban sem találtunk szignifikáns eltéréseket a kontroll csoporttal összehasonlítva a sejtek

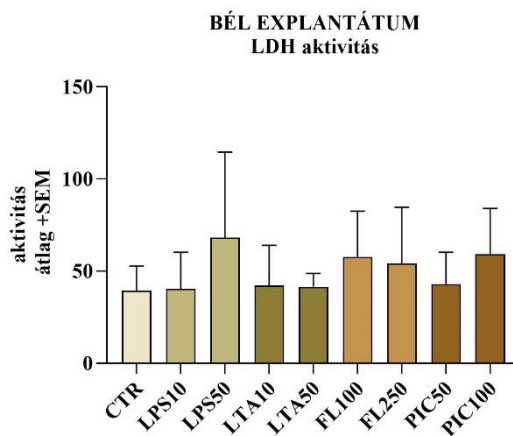
metabolikus aktivitását illetően. Minden kezelési csoportban trendszerű aktivitás csökkenés volt megfigyelhető a kontroll csoport metabolikus aktivitásához képest (**17. ábra**).

7.1.6 A sejtmembrán integritásának vizsgálata

Az LDH-enzim extracelluláris aktivitásának értékei nem mutattak szignifikáns eltérést a kezelt csoportokban a kontroll csoporthoz hasonlítva. A legtöbb kezelési csoportban a kontroll csoporthoz nagyon hasonló, vagy nem szignifikáns mértékben emelkedett LDH-enzim aktivitás volt megfigyelhető (**18. ábra**).



17. ábra: A sejtek metabolikus aktivitásának nyomon követése különböző gyulladásos faktorokkal való kezelést követően. CTR=kontroll, LPS10=10 µg /ml LPS, LPS50= 50 µg /ml LPS, LTA10=10 µg /ml LTA, LTA50=50 µg /ml LTA, FL100=100 ng/ml FL, FL250=250 ng/ml FL, PIC50=50 µg /ml PIC, PIC100= 100 µg /ml PIC (n=6/csoport, átlag+-SEM)



18. ábra: Az extracelluláris LDH-enzim aktivitásának nyomon követése különböző gyulladásos faktorokkal való kezelést követően. CTR=kontroll, LPS10=10 µg /ml LPS, LPS50= 50 µg /ml LPS, LTA10=10 µg /ml LTA, LTA50=50 µg /ml LPS, FL100=100 ng/ml FL, FL250=250 ng/ml FL, PIC50=50 µg /ml PIC, PIC100= 100 µg /ml PIC (n=6/csoport, átlag+-SEM)

7.1.7 A sejtek tápfolyadékában található gyulladásos mediátorok koncentrációjának mérése

A bél explantátumokkal végzett vizsgálatok esetében legtöbb gyulladásos citokin koncentrációja a mérési határ alatt volt, így Luminex xMAP multiplexing technológiával nem tudtuk őket vizsgálni, ennek következtében eredményeink csak az IL-6 és IL-8 koncentrációk alakulásáról számolnak be.

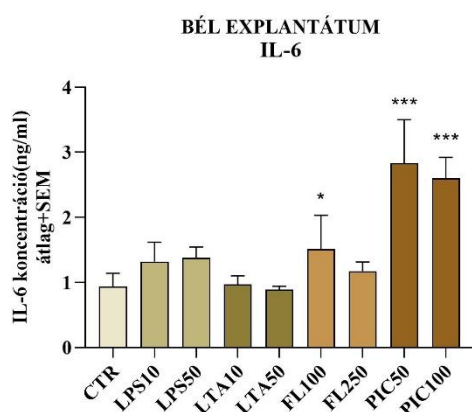
7.1.7.1 Az IL-6 koncentráció meghatározása

Az IL-6 koncentráció mérését követően több csoportban is szignifikáns koncentráció emelkedést figyelhattunk meg a kontroll csoporttal összehasonlítva. A 100 ng/ml koncentrációban alkalmazott flagellin (P= 0,033), valamint az 50 µg/ml és 100 µg/ml

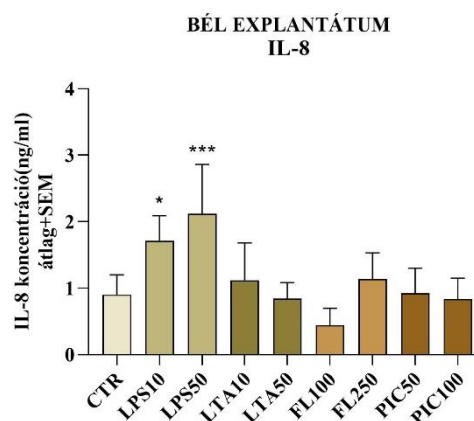
koncentrációban alkalmazott Poli I:C ($P<0,001$) esetében is szignifikáns emelkedést tapasztaltunk. A többi csoport IL-6 koncentrációjában nem volt szignifikáns eltérés a kontroll csoporthoz képest (**19. ábra**).

7.1.7.2 Az IL-8 koncentráció meghatározása

A bél explantátumok tápfolyadékából mért IL-8 koncentrációk az LPS-sel kezelt csoportokban szignifikáns emelkedést mutattak a kontroll csoporthoz viszonyítva. A 10 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban alkalmazott ($P=0,011$) és az 50 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban alkalmazott ($P<0,001$) LPS kezelés esetén is szignifikáns emelkedés volt tapasztalható. Az egyéb csoportokban nem volt megfigyelhető szignifikáns eltérés a kontroll csoporttal összehasonlítva (**20. ábra**).



19. ábra Az IL-6 koncentráció nyomon követése különböző gyulladásos faktorokkal való kezelést követően. CTR=kontroll, LPS10=10 $\mu\text{g/ml}$ LPS, LPS50= 50 $\mu\text{g/ml}$ LPS, LTA10=10 $\mu\text{g/ml}$ LTA, LTA50=50 $\mu\text{g/ml}$ LTA, FL100=100 ng/ml FL, FL250=250 ng/ml FL, PIC50=50 $\mu\text{g/ml}$ PIC, PIC100= 100 $\mu\text{g/ml}$ PIC (n=6/csoport, átlag+SEM, * $P<0,05$, *** $P<0,001$)



20. ábra Az IL-8 koncentráció nyomon követése különböző gyulladásos faktorokkal való kezelést követően. CTR=kontroll, LPS10=10 $\mu\text{g/ml}$ LPS, LPS50= 50 $\mu\text{g/ml}$ LPS, LTA10=10 $\mu\text{g/ml}$ LTA, LTA50=50 $\mu\text{g/ml}$ LTA, FL100=100 ng/ml FL, FL250=250 ng/ml FL, PIC50=50 $\mu\text{g/ml}$ PIC, PIC100= 100 $\mu\text{g/ml}$ PIC (n=6/csoport, átlag+SEM, * $P<0,05$, *** $P<0,001$)

8 Megbeszélés

Napjainkban globális problémát jelent az antimikrobiális rezisztencia széleskörű terjedése, melynek egyik fő oka az állattenyésztő szektorokban alkalmazott túlzott és nem megfelelő antibiotikum-használat. Így a sertéságazatot is egyre nagyobb kihívások elé állítja az antimikrobiális rezisztencia problémája, de ezzel párhuzamosan az a törekvés is, hogy az emberi társadalom egyre jobb minőségű és nagyobb mennyiségű állati fehérjére tartana igényt. Feltétlenül szükséges tehát olyan molekulák kutatása és fejlesztése az állattenyésztés és állatorvoslás számára, melyek nem antibiotikum természetűek, nem alakul ki velük szemben rezisztencia, s emellett elősegítik a jó minőségű és biztonságos állati termék előállítását, valamint a beteg állatok kezelésére is alkalmasak lehetnének. Ennek megfelelően kutatásunk egyik jövőbeni célja olyan anyagok, pl. AMP-k (antimikrobiális peptidek) vizsgálata, melyek antibakteriális hatásuk mellett, gyulladáscsökkentő és immunerősítő tulajdonságaik révén csökkenthetik, és bizonyos esetekben szükségtelenné is tehetnék az antibiotikumok felhasználását az állattartásban.

Munkánk során elsődleges céljaink közé tartozott, olyan primer sertés eredetű májsejt és bél explantátumokat létrehozni, melyeket különböző gyulladáskeltő anyagokkal kezelve, a sejttenyészeteken eltérő mértékű gyulladást válthatunk ki, ezáltal lehetővé téve további vizsgálatok elvégzését a gyulladásos válaszreakciók mérséklésével, így például az AMP-k immunmoduláló és gyulladáscsökkentő hatásaival kapcsolatban. Ennek érdekében alakítottuk ki a dolgozatban leírt májsejt-tenyészeteket, illetve bél explantátumokat, melyek így megfelelő eszközzül szolgálhatnak a sertés fertőzésre talán legérzékenyebb szerveinek együttes tanulmányozására, a bél-máj tengely *in vitro* modellezésére. *In vivo* körülmények között a legtöbb enterális kórokozó és azok toxinjai a bélrendszerből a portális keringésen keresztül a májba jutnak, ahol aktiválják a máj specifikus immunsejtjeit, elsősorban a Kupffer-sejteket. Ez a mechanizmus jelentős gyulladásos citokin-termelést vált ki, amely gyulladásos állapotot indukál a májszövetben (Zhang et al., 2022). Ezt a komplex folyamatot kívántuk *in vitro* rendszerünkben modellezni.

In vitro bél-máj tengely modellünk lehetőséget biztosított tehát a különböző gyulladáskeltő anyagok hatásainak tanulmányozására, mivel, a fent leírtak szerint is az enterális kórokozók és toxinjaiknak felszívódása a bélből kulcsszerepet játszanak a bél-máj tengely gyulladásos folyamataiban. Sejttenyészeinket ezért a gyulladáskeltő molekulák kezelési koncentrációjának meghatározása és a megfelelő gyulladásos válasz kialakítása érdekében két különböző koncentrációban kezeltük a kiválasztott anyagokkal. A kialakított kezelési

csoportokban 10 µg/ml és 50 µg/ml koncentrációban alkalmaztunk *Salmonella* Typhimurium eredetű LPS-t és *Staphylococcus aureus* eredetű LTA-t, 100 ng/ml és 250 ng/ml koncentrációban *Escherichia coli* eredetű flagellint, valamint 50 µg/ml és 100 µg/ml koncentrációban Poli I:C-t. A felsorolt bakteriális és vírusos faktorok napjainkban is komoly kihívást jelentenek az intenzív sertéstartásban, mivel súlyos enterális kórképek hátterében gyakran ezek a kórokozók húzódnak meg, az állomány mentesítése pedig kifejezetten nehéz feladat, így ezek a faktorok jól alkalmazhatóak a telepeken előforduló megbetegedések okozta gyulladások modellezésére (Bonardi, 2017).

Kutatásunk folyamán több olyan vizsgálatot végeztünk el a sejtenyészeten, melyek a sejtek életképességéről, illetve a sejteket ért károsító hatások mértékéről szolgálnak információval, ezzel alapot biztosítva a későbbi kísérletek elvégzéséhez is. A májsejtenyészeten, illetve bél explantátumokon egyaránt elvégeztük a CCK-8 tesztet és az LDH-enzim extracelluláris aktivitásának mérését. A CCK-8 teszt lehetőséget biztosított a sejtek metabolikus aktivitásának monitorozására a különböző kezelések után, ezáltal kvantitatív adatokat szolgáltatva a kezelések citotoxikus hatásának mértékéről. A májsejtenyészeten esetében mindkét Poli I:C-vel kezelt csoportban bizonyos mértékű metabolikus aktivitás csökkenést figyelhattunk meg, azonban ez az aktivitás csökkenés csak a 100 µg/ml koncentrációban alkalmazott Poli I:C esetében volt szignifikáns a kontroll csoporthoz képest, melyből arra következtethetünk, hogy ez a molekula az adott koncentrációban károsíthatta a sejteket. Ezzel az eredménnyel korrelált a májsejtenyészeten elvégzett extracelluláris LDH-enzim aktivitás mérés eredménye is, mivel ez a teszt alkalmas a sejtmembrán integritásának vizsgálatára, így minél magasabb extracelluláris LDH-aktivitást mérünk, annál erőteljesebb volt a gyulladáskeltő anyagok citotoxikus hatása. A 100 µg/ml koncentrációban alkalmazott Poli I:C esetében amellett, hogy a metabolikus aktivitás csökkent, szignifikáns extracelluláris LDH-aktivitás emelkedést tapasztalhattunk, ez pedig bizonyította, hogy ez a molekula az alkalmazott koncentrációkban sejtkárosodást vált ki. Az LDH-enzim aktivitása a májsejtenyészeten az LPS-sel és LTA-val kezelt csoportok esetében is szignifikánsan emelkedett, tehát a gyulladás következtében ezekben a kezelési csoportokban is membránintegritás-csökkenést tapasztalhattunk.

A bél explantátumokon végzett CCK8-teszt és extracelluláris LDH-enzim aktivitás mérés nem mutatott szignifikáns eltéréseket a kezelt csoportokban a kontroll értékekhez képest, a kezelésekkel szemben tehát a bél explantátumok kevésbé voltak érzékenyek, mint a májsejtenyészeten.

A májsejttenyészetek esetében két olyan tesztet is elvégeztünk, melyek a sejtek redox homeosztázisával kapcsolatban szolgálnak információval. Az Amplex Red teszt folyamán az extracelluláris H_2O_2 szintjét kívántuk megfigyelni, mely korrelál a reaktív oxigéngyökök (ROS) szintjével, ezzel pedig jellemezhető a sejtek oxidatív állapota, hogy milyen mértékű oxidatív stressznek vannak kitéve a sejtek. A kezelt csoportok közül az 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentrációban alkalmazott LPS kezelés kivételével, minden csoportban szignifikánsan megemelkedett a H_2O_2 szintje, tehát a sejttenyészetek oxidatív stressznek vannak kitéve, legkiemelkedőbben a Poli I:C-vel kezelt csoportok, mely ismételten egybevág a korábbi tesztek eredményéből e csoportra vonatkozóan levont következtetésekkel. A lipidperoxidáció folyamán a sejtmembránt alkotó lipidek szerkezete és funkciója is károsodik, amely sejthalálhoz vezethet, a lipidperoxidációt pedig általában a reaktív oxigéngyökök jelenléte idézi elő. A lipidperoxidáció mértéke a malonaldehid koncentrációjának mérésével számszerűsíthető, mivel ez a molekula a folyamat alacsony molekulatömegű végterméke. Kísérletünkben a H_2O_2 , és egyéb reaktív oxigéngyökök membránkárosító hatása elsősorban a magas koncentrációban alkalmazott LTA-val és flagelinnel kezelt sejttenyészeteken fejeződött ki, melyből arra következtethetünk, hogy bár a további kezelési csoportok is ki vannak téve az oxidatív stressznek, a molekulák lipidkárosító hatása még nem érvényesül.

A sejttenyészetek életképességének és redox homeosztázisának felmérését követően, a különböző gyulladásos citokinek koncentrációit kívántuk megfigyelni, hogy következtetéseket vonhassunk le a gyulladáskeltő anyagok hatékonyságát illetően. A gyulladáskeltés megfigyelésének érdekében a következő gyulladásos citokinek koncentrációjának mérését végeztük el a májsejttenyészeteken: IL-4, IL-6, IL-8, IFN- γ , GM-CSF, és TNF- α . A bél explantátumokon pedig az IL-6 és az IL-8 koncentrációját mértük. A gyulladásos citokinek kiválasztását olyan hasonló tudományos publikációkra alapoztuk, melyek szintén sertés eredetű sejttenyészeteken kívánták felmérni a gyulladás mértékét, ehhez pedig a fent említett gyulladásos citokinek koncentrációjának mérését végezték el. Egy korábbi tanulmányban, mely sertés eredetű intesztinális epitélsejt modelleket használt a bélhámsejtek gyulladásos és immunológiai funkcióinak vizsgálatához, szintén az IL-6, IL-8 és TNF- α koncentrációk mérése történt meg különböző *Salmonella* fajokkal való kezelést követően (Wang et al., 2014). Egy 2021-ben publikált kutatás sertések különböző légzőszervi vírusfertőzéseinek citokinprofilját vizsgálta, elsődleges célja a tüdőben zajló helyi immunválasz feltérképezése volt, különböző gyulladásos citokinek szintjének mérése segítségével, mint az IL-6, IL-8, IFN- γ és TNF- α , melyek kulcsszerepet töltenek be a gyulladásos folyamatokban (Turliewicz-Podbielska et al., 2021).

A májsejttenyészeteken végzett gyulladásos mediátorok szintjének mérése egyértelmű adatokat szolgáltatott a gyulladás mértékének meghatározásához. A Poli I:C-vel kezelt sejtek esetében, már a korábbi vizsgálatok is alátámasztották, hogy ezekben a koncentrációkban ez a molekula citotoxikus. Ezt a megfigyelést erősíti meg a legtöbb citokin koncentrációja is, melyek nem változtak, vagy több esetben szignifikánsan csökkentek a kontroll csoporthoz képest, ami arra utal, hogy a sejtek nagy részének életfunkciói csökkentek, és feltehetőleg nem voltak képesek megfelelő mértékű gyulladásos válaszreakció kialakítására. A flagellinnel kapcsolatos előzetes hipotéziseink, amelyek szerint ez a faktor kiválóan alkalmas gyulladásokkeltésre, nem igazolódtak, ugyanis a legtöbb gyulladásos citokin koncentrációja ezekben a kezelési csoportokban nem változott a kontroll csoporthoz képest, szignifikáns emelkedést egyik citokin esetében sem tapasztalhattunk. Az LTA-val kezelt csoportokban több citokin esetében is szignifikáns koncentráció emelkedés volt megfigyelhető a kontroll csoporttal összehasonlítva. Az IL-6, IL-8 és TNF- α koncentrációja mindkét koncentrációban alkalmazott LTA kezelés esetén szignifikánsan megemelkedett, ebből arra következtethetünk, hogy ez a molekula megfelelő koncentrációban alkalmas lehet a további kísérletekben való gyulladásokkeltésre májsejttenyészeteken. A legjelentősebb eredmények az LPS-sel kezelt csoportok esetében figyelhetők meg. Ez a faktor a legtöbb vizsgált gyulladásos citokin koncentrációját (IL-4, IL-6, IL-8 és TNF- α) szignifikánsan megemelte, mindkét alkalmazott koncentrációban, így ez az eredmény egybevág a korábbi kutatásokkal, amelyek szerint az LPS képes aktiválni a toll like receptor 4 útvonalat, amely közvetlenül fokozza az IL-6 és TNF- α termelését (An et al., 2022). Az IL-8 kiemelkedően magas koncentrációja pedig összhangban áll azokkal a kutatásokkal, melyek ezt a citokint a neutrofil granulociták kemotaxisának és aktivációjának egyik legfőbb faktoraként azonosítják, különösen a Gram-negatív baktériumok által kiváltott gyulladások esetén (Matsushima et al., 2022).

A bél explantátumok esetében a legtöbb gyulladásos citokin koncentrációja mérési határ alatt volt, így Luminex xMAP multiplexing technológiával nem tudtuk őket vizsgálni, ennek következtében eredményeink csak az IL-6 és IL-8 koncentrációk alakulásáról számolnak be a bél explantátumokat illetően. Az LPS-sel kezelt csoportokban az IL-8 koncentráció szignifikáns emelkedést mutatott a kontroll csoporthoz viszonyítva, amely eredmény egybevág a LPS-sel kezelt májsejttenyészeteken megfigyelhető hatással. Ezenfelül az IL-8 koncentrációjának szignifikáns emelkedése megerősíti az LPS gyulladásokkeltő hatásait bél explantátumok esetében és összhangban van más tanulmányokkal, amelyek az IL-8 szerepét hangsúlyozzák a gyulladásos folyamatokban, különösen a veleszületett immunválasz során. Egy 2021-ben megjelent cikk, arról számol be, hogy a sertés bélhámsejt-modell fontos eszköze lehet további

kutatásoknak, a bél immunfunkcióinak megértésével kapcsolatban és az alternatív terápiás vegyületek tesztelésében. Továbbá az IL-8 expressziójának jelentős növekedése ezen modellekben olyan potenciális célpontokat azonosíthat, amelyek hozzájárulhatnak a gyulladásos betegségek kezelési stratégiáinak kialakításához (Wang et al., 2021).

Az eredményekből arra következtethetünk, hogy a virális eredetű Poli I:C, illetve a bakteriális eredetű flagellin kevésbé alkalmasak a további kutatásokban való gyulladáskeltésre. Összességében azonban az eredmények alapján kijelenthetjük, hogy mindkét bakteriális eredetű molekula, az LTA és az LPS is erőteljes gyulladásos választ váltanak ki a velük kezelt májsejttenyészeteken, így ezek a gyulladáskeltő anyagok, és elsősorban az LPS, kiváló alapjául szolgálhatnak a későbbi kísérletekben való gyulladáskeltésnek. Kutatásunk folyamán minden gyulladáskeltő anyag esetében két koncentrációt alkalmaztunk, melyek közül általában már az alacsonyabb koncentráció esetén is megfigyelhettük a gyulladásos válasz kialakulását, a magasabb koncentrációjú kezelés során pedig általában még kifejezettebb, szignifikáns gyulladásos citokin emelkedést tapasztalhattunk, melyből arra következtethetünk, hogy a következő kísérletekben egy köztes koncentráció használata vezetne a legideálisabb nem túlzottan nagymértékű, de hatékony gyulladásos válaszreakció kialakításához.

Munkacsoportunk már a korábbiakban is végzett hasonló vizsgálatokat gyulladáskeltő anyagokkal, azonban ezekben az esetekben csirke eredetű sejttenyészeteket hoztunk létre, melyeken többek között az LPS és a Poli I:C hatásait elemeztük. Jelen kutatásunkban, a sertés eredetű sejtmodellekkel összehasonlítva szembeötlő különbségek tapasztalhatóak az oxidatív stresszválaszok, valamint a gyulladásos citokinprofilok terén is. Csirke eredetű májsejttenyészetek esetén a Poli I:C mérsékelten csökkentette a sejtek metabolikus aktivitását és enyhe sejtkárosodáshoz vezetett, illetve jelentős IL-6 és IL-8 szint emelkedést idézett elő, ezzel szemben a sertés eredetű májsejt tenyészeteken ez a PAMP jelentős metabolikus aktivitás csökkenést és sejtkárosodást váltott ki, melynek következtében az IL-6 és IL-8 szintek szignifikánsan csökkentek a kontrollcsoporthoz képest. 2021-ben megjelent kutatásunkban a csirke eredetű sejttenyészetek ellenállónak tűntek az LPS kezeléssel szemben, köszönhetően a madarak gyulladásos jelátviteli útvonal sajátosságainak, míg jelenlegi kutatásunkban az LPS által kiváltott gyulladás bizonyult a legerőteljesebbnek a vizsgált PAMP-ok közül (Sebők et al., 2021).

Eredményeink tehát összhangban állnak más munkacsoportok és a saját korábbi kutatásaink során nyert következtetésekkel is, melyek szerint a bél mikrobiális diszbiózisa és a májgyulladás között közvetlen kapcsolat áll fenn (de Jong et al., 2016). Vizsgálataink alátámasztják, hogy a bakteriális toxinok hatása nem csak a bélrendszerre korlátozódik, hanem

a felszívódást követően a májat is érinti, és szisztémás gyulladást válthat ki, különösen az intenzív sertéstartás során gyakran előforduló enterális patogének esetében.

Jövőbeni céljaink közé tartozik kutatásunk eredményei alapján létrehozott sejtenyészetekben az AMP-k sokszor említett, feltételezett jótékony hatásait vizsgálni, hiszen ezen peptidek potenciális alkalmazása a fertőző és gyulladással járó folyamatok modulálásában áttörést jelenthet mind az állatgyógyászat, mind a humán gyógyászat számára az antibiotikum-rezisztencia visszaszorításában.

9 Összefoglalás

Napjainkban a világ élelmiszerigénye, kiemelve a fehérje és hús iránti keresletet, folyamatosan növekszik, jelentős nyomást gyakorolva a sertéságazatra. Az intenzív sertéstartásban egyaránt cél a technológiai fejlődés, valamint a termelékenység maximalizálása, azonban egyre nagyobb veszéllyel fenyegeti az antimikrobiális rezisztencia terjedése. Az antimikrobiális szerek túlzó használata elősegíti a rezisztens baktériumtörzsek kialakulását, amely az állategészségügyben és a humán egészségügyben is aggasztóan káros hatást fejt ki. A rezisztencia terjedése elleni küzdelem egyik fontos alappillére olyan alternatív hatóanyagok kifejlesztése, melyekkel helyettesíthető vagy csökkenthető az antibiotikumok használata az állattartásban. Kutatásunk legfőbb hosszútávú célja az antimikrobiális peptidek tanulmányozása, melyek antibakteriális hatásuk mellett gyulladáscsökkentő és immunmoduláns tulajdonságokkal is rendelkeznek, így felhasználhatóak lehetnek a sertéstartásban gyakran előforduló enterális kórképek visszaszorításában. Kísérletünkben olyan *in vitro* májsejt, illetve bél explantátumokat hoztunk létre, melyek alkalmasak a szisztémás gyulladásos folyamatokban kulcsszerepet betöltő bél-máj tengely modellezésére. Kísérleti modellünk lehetőséget biztosított a különböző gyulladásos faktorokkal való gyulladáskeltésre, majd a gyulladásos válaszreakciók megfigyelésére. A kezeléshez olyan gyulladásos faktorokat választottunk, melyek napjainkban is jelentős termelés kiesést és veszteségeket okoznak a sertéságazatban, így a sejtenyészeteket *E. coli* eredetű lipopoliszachariddal, *S. aureus* eredetű lipoteikólsavval, *S. Typhimurium* eredetű flagellinnel, valamint virális nukleozid analóg poliinozinsav-policitidilsavval kezeltük. Minden esetben két koncentrációt alkalmaztunk, biztosítva ezzel a későbbi kutatásokban felhasználandó köztes koncentráció kiszámíthatóságát. Kísérletünk folyamán a sejtenyészetek állapotának feltérképezéséhez CCK-8 tesztet, extracelluláris LDH-enzim aktivitás mérést, Amplex Red tesztet, valamint MDA koncentráció mérést alkalmaztunk, majd a gyulladásos citokinek koncentrációjának mérését Luminex xMAP multiplexing technológia segítségével végeztük el. A vizsgált gyulladásos citokinek közül az IL-6, IL-8 és TNF- α szintjei emelkedtek meg a legszignifikánsabban, különösen lipopoliszacharid és lipoteikólsav stimuláció hatására, amelyek kiváló gyulladáskeltő ágensnek bizonyultak, így alkalmazásuk rendkívül ígéretes lehet az antimikrobiális peptidek gyulladáscsökkentő hatásának jövőbeni vizsgálatához. Kutatásunk következő lépéseként a mesterséges IDR-1002 antimikrobiális peptid és a sertésspecifikus PR-39 hatásait tervezzük feltérképezni. Vizsgálati eredményeink összhangban vannak a korábbi kutatásokkal, melyek igazolják, hogy az enterális kórokozók és toxinjaik felszívódása nemcsak a bélrendszerre korlátozódna, hanem a májat terhelve szisztémás gyulladásos válaszreakciókat váltanak ki, az inflammatorikus citokinszintek markáns emelkedésével.

10 Summary

The global demand for food, particularly for protein and meat, is continuously increasing, placing significant pressure on the porcine sector. In intensive pig farming, technological advancements and the maximization of productivity are common goals; however, the spread of antimicrobial resistance poses an escalating threat. The excessive use of antimicrobial agents promotes the development of resistant bacterial strains, which have alarmingly harmful effects on both veterinary and human health. One of the key pillars in combating the spread of resistance is the development of alternative compounds that can replace or reduce the use of antibiotics in livestock farming. The primary long-term goal of our research is to study antimicrobial peptides, which, in addition to their antibacterial effects, possess anti-inflammatory and immunomodulatory properties, making them potential candidates for mitigating enteric diseases commonly observed in pig farming. In our experiment, we developed *in vitro* liver and intestinal epithelial cell cultures suitable for modeling the gut-liver axis, a key player in systemic inflammatory processes. Our experimental model allowed for the induction of inflammation using various inflammatory factors and the subsequent observation of inflammatory responses. The inflammatory agents selected for treatment are responsible for significant production losses in the porcine sector today. Accordingly, the cell cultures were treated with *Escherichia coli*-derived lipopolysaccharide, *Staphylococcus aureus*-derived lipoteichoic acid, *Salmonella* Typhimurium-derived flagellin, and the viral nucleoside analog polyinosinic-polycytidylic acid. Two concentrations were applied in each case, ensuring the predictability of intermediate concentrations for future studies. Throughout our experiment, we employed CCK-8 tests, extracellular LDH enzyme activity measurements, Amplex Red assays, and MDA concentration measurements to map the condition of the cell cultures. The concentrations of inflammatory cytokines were measured using Luminex xMAP multiplexing technology. Among the inflammatory cytokines examined, the levels of IL-6, IL-8, and TNF- α increased most significantly, particularly in response to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid stimulation, which proved to be excellent pro-inflammatory agents. Therefore, their use shows great promise for future investigations into the anti-inflammatory effects of antimicrobial peptides. In the next phase of our research, we aim to explore the effects of the synthetic IDR-1002 antimicrobial peptide and the porcine-specific PR-39. Our findings are consistent with previous studies, which demonstrate that the absorption of enteric pathogens and their toxins is not limited to the intestines but burdens the liver, triggering systemic inflammatory responses with a marked elevation in inflammatory cytokine levels.

11 Irodalomjegyzék

1. Álvarez-Martínez, Francisco Javier, Enrique Barraón-Catalán, és Vicente Micol. 2020. „Tackling Antibiotic Resistance with Compounds of Natural Origin: A Comprehensive Review”. *Biomedicines* 8 (10): 405. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8100405>.
2. An, Linxguan, Ulrich Wirth, Dominik Koch, Moritz Drefs, Dionysios Koliogiannis, Hanno Nieß, Joachim Andrassy, és mtsai. 2022. „The Role of Gut-Derived Lipopolysaccharides and the Intestinal Barrier in Fatty Liver Diseases - ScienceDirect”. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2022. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1091255X23004948>.
3. Banchereau, Jacques, Virginia Pascual, és Anne O’Gara. 2012. „From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines | Nature Immunology”. *Nature immunology*. 2012. <https://www.nature.com/articles/ni.2406>.
4. Bonardi, S. 2017. „Salmonella in the Pork Production Chain and Its Impact on Human Health in the European Union”. *Epidemiology & Infection* 145 (8): 1513–26. <https://doi.org/10.1017/S095026881700036X>.
5. Charo, Israel F., és Richard M. Ransohoff. 2006. „The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation”. *New England Journal of Medicine* 354 (6): 610–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMr052723>.
6. Dąbrowska, Alicja, Bartosz Wilczyński, Jakub Mastalerz, Julia Kucharczyk, Julita Kulbacka, Anna Szewczyk, és Nina Rembiałkowska. 2024. „The Impact of Liver Failure on the Immune System”. *International Journal of Molecular Sciences* 25 (17): 9522. <https://doi.org/10.3390/ijms25179522>.
7. Dinarello, Charles A. 2009. „Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family”. *Annual Review of Immunology* 27 (Volume 27, 2009): 519–50. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>.
8. Gálfi, Péter, György Csikó, és Ákos Jerzsele. 2014. *Állatorvosi Gyógyszertan I.* Budapest: Bíró Family Nyomda és Könyvkiadó.
9. Gärtner, Yvonne, Lynn Bitar, Frauke Zipp, és Christina Francisca Vogelaar. 2023. „Interleukin-4 as a therapeutic target”. *Pharmacology & Therapeutics* 242 (február):108348. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2023.108348>.
10. Gentile, Lori F., Alex G. Cuenca, Erin L. Vanzant, Philip A. Efron, Bruce McKinley, Frederick Moore, és Lyle L. Moldawer. 2013. „Is there value in plasma cytokine measurements in patients with severe trauma and sepsis?” *Methods, Cytokine Methods*, 61 (1): 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.04.024>.
11. Hannoodde, Sally, és Dian N. Nasuruddin. 2024. „Acute Inflammatory Response”. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556083/>.
12. Helmy, Yosra A., Khaled Taha-Abdelaziz, Hanan Abd El-Halim Hawwas, Soumya Ghosh, Samar Sami AlKafaas, Mohamed M. M. Moawad, Essa M. Saied, Issmat I. Kassem, és Asmaa M. M. Mawad. 2023. „Antimicrobial Resistance and Recent Alternatives to Antibiotics for the Control of Bacterial Pathogens with an Emphasis on Foodborne Pathogens”. *Antibiotics* 12 (2): 274. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020274>.
13. Hijová, Emilia. 2024. „Postbiotics as Metabolites and Their Biotherapeutic Potential”. *International Journal of Molecular Sciences* 25 (10): 5441. <https://doi.org/10.3390/ijms25105441>.
14. Ibrahim, José Noel, Isabelle Jéru, Jean-Claude Lecron, és Myrna Medlej-Hashim. 2017. „Cytokine signatures in hereditary fever syndromes (HFS)”. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 33 (február):19–34. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.11.001>.
15. Jenkins, Brendan J., Dianne Grail, Melissa Inglese, Cathy Quilici, Steven Bozinovski, Peter Wong, és Matthias Ernst. 2004. „Imbalanced gp130-Dependent Signaling in Macrophages Alters Macrophage Colony-Stimulating Factor Responsiveness via Regulation of c-fms Expression”. *Molecular and Cellular Biology* 24 (4): 1453–63. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.4.1453-1463.2004>.
16. Jong, Petrus R. de, José M. González-Navajas, és Nicolaas J. G. Jansen. 2016. „The Digestive Tract as the Origin of Systemic Inflammation”. *Critical Care* 20 (1): 279. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1458-3>.
17. Junttila, Ilkka S. 2018. „Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes”. *Frontiers in Immunology* 9 (június). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00888>.
18. Kang, Jin Young, és Jie-Oh Lee. 2011. „Structural Biology of the Toll-Like Receptor Family”. *Annual Review of Biochemistry* 80 (Volume 80, 2011): 917–41. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-052909-141507>.
19. Kang, Sujin, Masashi Narazaki, Hozafa Metwally, és Tadimitsu Kishimoto. 2020. „Historical overview of the interleukin-6 family cytokine”. *Journal of Experimental Medicine* 217 (5): e20190347. <https://doi.org/10.1084/jem.20190347>.
20. Kany, Shinwan, Jan Tilmann Vollrath, és Borna Relja. 2019. „Cytokines in Inflammatory Disease”.

- International Journal of Molecular Sciences* 20 (23): 6008. <https://doi.org/10.3390/ijms20236008>.
21. Kopitar-Jerala, Nataša. 2017. „The Role of Interferons in Inflammation and Inflammasome Activation”. *Frontiers in Immunology* 8 (július). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00873>.
 22. Kosikowska, Paulina, és Adam Lesner. 2016. „Antimicrobial peptides (AMPs) as drug candidates: a patent review (2003–2015)”. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 26 (6): 689–702. <https://doi.org/10.1080/13543776.2016.1176149>.
 23. Kotha, Raghavendhar R., Fakir Shahidullah Tareq, Elif Yildiz, és Devanand L. Luthria. 2022. „Oxidative Stress and Antioxidants—A Critical Review on In Vitro Antioxidant Assays”. *Antioxidants* 11 (12): 2388. <https://doi.org/10.3390/antiox11122388>.
 24. Li, Junpeng, Shuping Hu, Wei Jian, Chengjian Xie, és Xingyong Yang. 2021. „Plant Antimicrobial Peptides: Structures, Functions, and Applications”. *Botanical Studies* 62 (1): 5. <https://doi.org/10.1186/s40529-021-00312-x>.
 25. Luig, Michael, Malte A. Kluger, Boeren Goerke, Matthias Meyer, Anna Nosko, Isabell Yan, Jürgen Scheller, és mtsai. 2015. „Inflammation-Induced IL-6 Functions as a Natural Brake on Macrophages and Limits GN”. *Journal of the American Society of Nephrology* 26 (7): 1597. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014060620>.
 26. Mahlapuu, Margit, Camilla Björn, és Jonas Ekblom. 2020. „Antimicrobial peptides as therapeutic agents: opportunities and challenges”. *Critical Reviews in Biotechnology* 40 (7): 978–92. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1796576>.
 27. Mahlapuu, Margit, Joakim Håkansson, Lovisa Ringstad, és Camilla Björn. 2016. „Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents”. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6 (december). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>.
 28. Marr, Alexandra K, William J Gooderham, és Robert EW Hancock. 2006. „Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook”. *Current Opinion in Pharmacology, Anti-infectives/New Technologies*, 6 (5): 468–72. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.04.006>.
 29. Mátis, Gábor, Patrik Tráj, Viktória Hanyecz, Máté Mackei, Rege Anna Márton, Júlia Vörösházi, Ágnes Kemény, Zsuzsanna Neogrady, és Csilla Sebök. 2024. „Immunomodulatory properties of chicken cathelicidin-2 investigated on an ileal explant culture | Veterinary Research Communications”. Springer Link. 2024. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11259-024-10428-7>.
 30. Matsushima, Kouji, De Yang, és Joost J. Oppenheim. 2022. „Interleukin-8: An evolving chemokine”. *Cytokine* 153 (május):155828. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.155828>.
 31. Mookherjee, N., és R. E. W. Hancock. 2007. „Cationic Host Defence Peptides: Innate Immune Regulatory Peptides as a Novel Approach for Treating Infections”. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64 (7): 922. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6475-6>.
 32. Mulchandani, Ranya, Yu Wang, Marius Gilbert, és Thomas P. Van Boeckel. 2023. „Global Trends in Antimicrobial Use in Food-Producing Animals: 2020 to 2030”. *PLOS Global Public Health* 3 (2): e0001305. <https://doi.org/10.1371/journal.pgph.0001305>.
 33. Nataraj, Basavaprabhu H., Syed Azmal Ali, Pradip V. Behare, és Hariom Yadav. 2020. „Postbiotics-parabiotics: the new horizons in microbial biotherapy and functional foods | Microbial Cell Factories”. Springer Link. 2020. <https://link.springer.com/article/10.1186/s12934-020-01426-w>.
 34. Pampaloni, Francesco, Emmanuel Reynaud, és Ernst H. K. Stelzer. 2007. „The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue | Nature Reviews Molecular Cell Biology”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007. <https://www.nature.com/articles/nrm2236>.
 35. Ponnampalam, Eric N., Ali Kiani, Sarusha Santhiravei, Benjamin W. B. Holman, Charlotte Lauridsen, és Frank R. Dunshea. 2022. „The Importance of Dietary Antioxidants on Oxidative Stress, Meat and Milk Production, and Their Preservative Aspects in Farm Animals: Antioxidant Action, Animal Health, and Product Quality—Invited Review”. *MDPI*. 2022. <https://www.mdpi.com/2076-2615/12/23/3279>.
 36. Rhouma, Mohamed, Leila Soufi, Schlasiva Cenatus, Marie Archambault, és Patrick Butaye. 2022. „Current Insights Regarding the Role of Farm Animals in the Spread of Antimicrobial Resistance from a One Health Perspective”. *Veterinary Sciences* 9 (9): 480. <https://doi.org/10.3390/vetsci9090480>.
 37. Rose-John, Stefan. é. n. „Interleukin-6 Family Cytokines”. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Elérés 2024. október 14. <https://cshperspectives.cshlp.org/content/10/2/a028415.short>.
 38. Saeidnia, Soodabeh, Azadeh Manayi, és Mohammad Abdollahi. 2015. „From in vitro Experiments to in vivo and Clinical Studies; Pros and Cons”. *Current Drug Discovery Technologies* 12 (4): 218–24.
 39. Sebök, Csilla, Patrik Tráj, Júlia Vörösházi, Máté Mackei, Márton Papp, Péter Gálfi, Zsuzsanna Neogrady, és Gábor Mátis. 2021. „Two Sides to Every Question: Attempts to Activate Chicken Innate Immunity in 2D and 3D Hepatic Cell Cultures”. *Cells* 10 (8): 1910. <https://doi.org/10.3390/cells10081910>.
 40. Shiomi, Aoi, Takashi Usui, és Tsuneyo Mimori. 2016. „GM-CSF as a Therapeutic Target in

- Autoimmune Diseases”. *Inflammation and Regeneration* 36 (1): 8. <https://doi.org/10.1186/s41232-016-0014-5>.
41. Takeuchi, Osamu, és Shizuo Akira. 2010. „Pattern Recognition Receptors and Inflammation: Cell”. *Cell*. 2010. [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(10\)00023-1?returnURL=http%3A%2F%EF%BF%BDlinkinghub.elsevier.com%EF%BF%BDretrieve%EF%BF%BDpii%EF%BF%BDS0092867410000231%EF%BF%BDshowall%EF%BF%BDtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(10)00023-1?returnURL=http%3A%2F%EF%BF%BDlinkinghub.elsevier.com%EF%BF%BDretrieve%EF%BF%BDpii%EF%BF%BDS0092867410000231%EF%BF%BDshowall%EF%BF%BDtrue).
 42. Testar, Joddie. 2024. „Cytokines: Introduction | British Society for Immunology”. British Society for Immunology. 2024. <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/receptors-molecules/cytokines-introduction>.
 43. Turlewicz-Podbielska, Hanna, Ewelina Czyżewska-Dors, és Małgorzata Pomorska-Mól. 2021. „Respiratory Viral Infections Drive Different Lung Cytokine Profiles in Pigs”. *BMC Veterinary Research* 17 (1): 5. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02722-8>.
 44. Wang, Jing, Guangdong Hu, Zhi Lin, Lei Xu, és Yanming Zhang. 2014. „Characteristic and Functional Analysis of a Newly Established Porcine Small Intestinal Epithelial Cell Line | PLOS ONE”. PLOS ONE. 2014. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0110916>.
 45. Wang, Jing, Wentao Lyu, Wei Zhang, Yonghong Chen, Fang Luo, Yamin Wang, Haifeng Ji, és Guolong Zhang. 2021. „Discovery of Natural Products Capable of Inducing Porcine Host Defense Peptide Gene Expression Using Cell-Based High Throughput Screening”. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 12 (1): 14. <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00536-0>.
 46. X, Li, Zuo S, Wang B, Zhang K, és Wang Y. 2022. „Antimicrobial Mechanisms and Clinical Application Prospects of Antimicrobial Peptides”. *Molecules (Basel, Switzerland)* 27 (9). <https://doi.org/10.3390/molecules27092675>.
 47. Zasloff, Michael. 2002. „Antimicrobial peptides of multicellular organisms”. *Nature*, 389–95.
 48. Zelová, Hana, és Jan Hošek. 2013. „TNF- α Signalling and Inflammation: Interactions between Old Acquaintances”. *Inflammation Research* 62 (7): 641–51. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0633-0>.
 49. Zhang, Lijuan, és Timothy J Falla. 2009. „Host Defense Peptides for Use as Potential Therapeutics”. *Current Opinion in Investigational Drugs (London, England)* 10 (2): 164–71.
 50. Zhang, Xue, Hong Liu, Kenji Hashimoto, Shiyang Yuan, és Jiancheng Zhang. 2022. „The Gut–Liver Axis in Sepsis: Interaction Mechanisms and Therapeutic Potential”. *Critical Care* 26 (1): 213. <https://doi.org/10.1186/s13054-022-04090-1>.

12 Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, dr. Lajos Andreának és Dr. Mátis Gábornak a szakmailag kiemelkedően magas színvonalú környezetért, amely rengeteg fejlődési lehetőséget biztosított számomra, valamint a fáradhatatlan támogatásért és rengeteg segítségnyújtásért a dolgozatom létrejöttéhez. Külön köszönettel tartozom Dr. Neogrady Zsuzsanna tanárnőnek az elengedhetetlen közreműködéséért és jelenléteért, továbbá Dr. Mackei Máténak a kísérlet megszervezésében nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért. Szeretném megköszönni dr. Papp-Sebők Csillának, dr. Márton Regének, Vörösházi Júliának és dr. Tráj Patriknak a laboratóriumi munkában nyújtott szíves segítségüket és közreműködésüket. Továbbá köszönettel tartozom dr. Kemény Ágnesnek, aki nélkül a Luminex xMAP multiplexing technológia segítségével való méréseink nem valósulhattak volna meg.

Hálámat szeretném kifejezni a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék minden munkatársának, amiért lehetőséget kaptam a laboratóriumuk használatára, amely elengedhetetlen volt a kísérletem megvalósításához. Az itt rendelkezésemre bocsátott eszközök és szakmai háttér nélkül a kutatásom nem jöhetett volna létre.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a páromnak, a családomnak és a barátaimnak a lelkesítést és támogatást, a türelmet és a biztatást, és hogy a dolgozatom elkészülte alatt mindenben a segítségemre voltak!