

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

LPS által előidézett sejtszintű gyulladásos folyamatok és védő hatású anyagok tesztelése
IPEC-J2 bélhámsejt modellrendszeren

Készítette: Piros Andrea Gabriella

Témavezetők: Pásztiné Dr. Gere Erzsébet PhD
SzIE ÁOTK, tanszéki gyógyszerész

Prof. Dr. Gálfi Péter
SzIE ÁOTK, tudományos rektor-helyettes,
tanszékvezető, egyetemi tanár

Budapest

2013

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1 A lipopoliszacharid jelátviteli módja.....	6
2.2 IPEC-J2 sejt vonal	7
2.3 Tight junction	7
2.4 Hozamfokozó antibiotikumok betiltása.....	8
2.5 Bélflóra	10
2.6 Probiotikumok	11
2.7 Oxidatív stressz	14
2.7.1 Oxidatív stressz és a citokinek szerepe	14
2.7.2 Oxidatív stressz meghatározás módjai	16
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	17
3.1 IPEC-J2 sejt vonal tenyésztése és LPS kezelések	17
3.2 Baktérium törzsek sejtmentes felülúszóinak előkészítése	18
3.3 Citotoxicitás vizsgálat	18
3.4 Probiotikumok LPS elleni védőhatásának vizsgálata	19
3.4.1 Kalibrációs görbe	20
3.4.2 Védőhatás vizsgálata	20
3.5 ROS mennyiségének mérése Amplex red reagenssel	21
3.6 IPEC-J2 sejt vonal IL-8 termelésének mérése.....	21
3.7 Statisztikai módszerek	23
4. EREDMÉNYEK	24
4.1 A citotoxicitás vizsgálata	24
4.2. LPS és a probiotikumok hatásának vizsgálata TER és FD4 átjutás mérésével	25
4.3 LPS által produkált H ₂ O ₂ meghatározás	27
4.4 IPEC-J2 sejt vonal IL-8 termelésének mérése	28
5. MEGBESZÉLÉS	31
6. ÖSSZEFOGLALÁS	33
7. SUMMARY	34
8. IRODALOMJEGYZÉK	35
9. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	40

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AMPK = AMP-aktivált protein-kináz

B. = *Bacillus*

B. amylo = *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940

BL = *Bacillus licheniformis* CECT 5436

B. licheni = *Bacillus licheniformis* CECT 5436

DMEM/F12 = Dulbecco's Modified Eagle's medium és Ham's F-12 Nutrient Mixtrure

EGF = Epidermális növekedési faktor

ELISA= Enzyme-linked immunosorbent assay

FD4 = Fluorescein-isothiocyanate 4 kDa - dextran

GALT = Gut-associated lymphoid tissue (bélhez kapcsolódó immunrendszer)

GM-CSF = Granulocita-makrofág kolonia-stimuláló faktor

H2DCF = 2,7-dichlorofluorescein

HRP = Horseradish peroxidase (torma-peroxidáz)

IL = Interleukin

L. = *Lactobacillus*

LB = Luria Bertani

LBP = Lipopolysaccharid-binding protein (lipopoliszacharid-kötő fehérje)

Lp 2142 = *Lactobacillus plantarum* 2142

LPS = Lipopoliszacharid

mCD14 és sCD14 = membrán CD14 és szolubilis CD14

NR = Neutral red

PAMP = Pathogen-associated molecular pattern (patogénekre jellemző molekuláris mintázat)

PBS = Phosphate buffered saline (foszfát pufferált sóoldat)

PRR = Pattern recognition receptor (mintázat felismerő receptor)

PUFA = Polyunsaturated fatty acid (többszörösen telítetlen zsírsav)

ROS = Reactive oxygen species (reaktív oxigén származékok)

SH = Szulfhidril-csoport

SCFA = Short-chain fatty acid (rövid szénláncú zsírsav)

SCS = Spent culture supernatant (sejtmentes felülúszó)

TER = Transepithelial electrical resistance (transzepiteliális elektromos rezisztencia)

TJ = Tight junction

TLR = Toll-like receptor

TNF- α = Tumor necrosis factor- α (tumor-nekrózis faktor- α)

TSB = Tryptone Soya Broth

1. BEVEZETÉS

A humán- és állatgyógyászat túlzott mértékű antibiotikum használata miatt kialakuló rezisztens törzsek elterjedésének növekedése miatt az Európai Unió kis dózisú antibiotikumok hozamfokozásra való felhasználását teljes körűen betiltotta minden tagországában 2006. január 1.-i hatállyal, így széleskörű kutatás indult meg ezen antibiotikumok helyettesítésére [1]. A hozamfokozó antibiotikumok hatásukat a napi súlygyarapodás növekedésével és takarmányhasznosítás javításával, valamint a bélflóra összetételének megváltoztatásával érték el, így ezek betiltása a haszonállatok egészségének romlásához, termelésük csökkenéséhez, hatalmas gazdasági károkhoz vezetett [2], helyettesítésükre többek között a probiotikumok megfelelő alternatívaként merültek fel.

A probiotikumok jótékony hatása az emberek és állatok egészségére már évszázadok óta ismert. Bizonyították számos intesztinális fertőzés ellen kedvező hatásukat, javítanak a bélflóra összetételén, a patogén baktériumokkal a bélben kompetícióba lépnek tápanyagokért és kötőhelyekért [3], antimikrobális metabolitokat termelnek [4], immunmodulátorként állandó stimulusban tartják a bél immunrendszerét [5], és a tight junctionra (TJ) stabilizáló hatással rendelkeznek [6]. A probiotikumok hozamfokozóként való felhasználásának előnyeit már korábban számos esetben igazolták [7,8,9]. Kísérleti munkám célja egy olyan *in vitro* tesztrendszer kifejlesztése, mely alkalmas a Gram negatív baktérium sejtfalalkotó lipopoliszacharid (LPS) kezelés által előidézett bélbeli gyulladós folyamatok sejtszintű hatásainak folyamatos követésére, és a probiotikus baktériumok anyagcsere termékeinek potenciális gyulladáscsökkentő hatásának tanulmányozására. A bélben lévő osztódó vagy elpusztuló Gram negatív baktériumból az LPS felszabadulva a bélepitélium enterocitáinak pro-inflammatorikus citokin (GM-CSF, IL-1 α , IL- β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α) termelődését váltja ki [10].

A vékonybélben lejátszódó *in vivo* komplex kölcsönhatások modellezésére poliészter membrán inzerten tenyésztett IPEC-J2 sejtvonalat alkalmaztam, amely újszülött, kolosztrumot nem kapott sertés jejunumából származik. Fiziológiás bélnyálkahártya epitéliuma az apikális és basolaterális tér között TJ sejtkapcsoló struktúrákat képez, amely a bélnyálkahártya barrier szerepét tölti be, korlátozva a transzepteliális transzportot [11]. Kutatásom célja, hogy az LPS kezelés sejtréteg integritására gyakorolt hatását a transzepteliális elektromos ellenállás mérésével (TER) és fluoreszcein izotiocianát-dextrán (FD4) átjutás vizsgálatokkal kövessem nyomon.

A védőhatás vizsgálatok megkezdése előtt neutral red (NR) citotoxicitás vizsgálatot végeztem az alkalmazni kívánt probiotikum felülúszók (2,5; 5; 13,3 %) és LPS koncentrációfüggő (1 és 10 μ g/ml) sejthalált okozó mértékének meghatározása.

További kísérleteim során célom számos probiotikum bélbarriert erősítő és gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata volt. A következő baktériumtörzsek és vizsgálati anyagok kerültek kiválasztásra: *Lactobacillus plantarum* 2142, *Bacillus licheniformis* CECT 4536, *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 sejtmentes felülúszói, valamint a nátrium-*n*-butirát bakteriális fermentációs termék. Kutatásom során azt vizsgáltam, hogy a baktériumtörzsek sejtmentes felülúszói és a nátrium-*n*-butirát fermentációs termék milyen mértékben képesek az IPEC-J2 sejteket az LPS által okozott károsodástól megvédeni. A védőhatást elsősorban jelzőmolekula (FD4) átjutásával vizsgáltam, amely a paracelluláris permeabilitás változás mértékéről ad információt, míg az enterociták integritás vizsgálatát TER méréssel tanulmányoztam.

Munkám során az LPS által kiváltott gyulladási folyamatban termelődő reaktív oxigén fajták (ROS) mennyiségét Amplex red alapú fluorimetriás méréssel követtem nyomon. A ROS vegyületek instabilak, fokozott reakcióképességük miatt minden sejtalkotóval reakcióba lépnek [12]. Termelődésük mérésével meg akartam állapítani, hogy a TJ funkcióvesztéséhez mekkora mértékben járulnak hozzá.

A TDK munkám során, nyomon követtem, hogy az apikálisan 1 és 10 µg/ml koncentrációban alkalmazott LPS mekkora mértékben emeli meg az enterociták IL-8 termelődését. A probiotikumok számos anti-inflammatorikus anyagcsere terméket szintetizálnak. Ezek gyulladáscsökkentő hatásának pontos részletei még nem ismertek, így azt kívántam megvizsgálni, hogy sejtmentes felülúszójukkal történő kezelés mekkora mértékben képes a gyulladási citokin (IL-8) termelés mérséklésére.

Távlati célja a kutatásnak egy olyan alternatív, természetes és biztonságosan alkalmazható takarmány-kiegészítő (probiotikum) előállítása, amely a hozamfokozó antibiotikumok pozitív hatásai közül a patogén baktériumokkal szembeni védelmet és állati termelés növekedését ötvözi az antibiotikum rezisztencia további növelése nélkül. Amennyiben a probiotikus baktérium törzsek bélnyálkahártya barrier funkciójára gyakorolt hatásmechanizmusát megismerjük, és az kedvező, akkor lehetőség nyílik a különböző kóroktanú enteritiszek okozta kártételek mérséklésére és megelőzésére a humán és az állatorvosi terápiában egyaránt.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A lipopoliszacharid jelátviteli módja

A baktérium sejtfal strukturális merevítő funkciót lát el, a baktérium életének feltétele. Sejtfal nélkül a baktérium sejtben fennálló hatalmas ozmotikus nyomásnak a sejthártya nem tud elegendően ellenállni, a sejt szétrobban. Gram negatív baktériumok sejtfal felépítésében peptidoglikán váz vesz részt, amely N-acetil-glükózaminból és muraminsavakból épül fel, ezt a vázat kívülről a lipoproteid-lipopoliszacharid (LPS) komplex borítja. Az LPS a baktérium sejt felületén helyezkedik el, a Gram negatív baktériumok endotoxinja. Felosztható magra (core), amely cukormolekulákból áll, egy sejtfalantigénre (O antigén) és az ehhez kapcsolódó O-specifikus oldalláncra [13].

LPS szabadul fel önmagában vagy baktérium felületi fehérjéivel komplexben, amikor a baktérium osztódik vagy elpusztul. Az immunrendszer kritikusan fontos feladata, hogy felismerje a behatolót, megkülönböztetve azt a szervezet sajátjától. A baktérium bejutását a veleszületett immunrendszer érzékeli, melyhez az adaptív immunrendszerre nincs szükség. A szervezetbe jutott baktérium fő virulencia faktora az LPS, de a baktériumnak bármely része potenciálisan idegen lehet a szervezet számára, amelyeknek felismerése ismert mechanizmus alapján történik. Legtöbb antigén egy molekuláris mintázattal „pathogen-associated molecular pattern”-nel (PAMP) rendelkezik. Veleszületett immunrendszer receptorai képesek a PAMP-ok felismerésére. Ezek a pattern-recognition receptorok (PRR), melyek a PAMP-ok megkötésével intracelluláris folyamatokat indítanak el.

Az alap mechanizmus szerint az LPS először az LPS-kötő fehérjéhez (LBP) kapcsolódik, mellyel kialakul az LPS-LBP komplex, ami ezután a monociták felületén lévő membrán-CD14-hez (mCD14) kötődik. A kötődés után a monocitákban LPS indukálta sejtaktiváció következik be. Az LPS-LBP komplex a vérben és egyéb folyékony közegben lévő szolubilizált CD14-hez (sCD14) is kapcsolódhat. A CD14-en kötött LPS kiváltotta szignált a sejtbe Toll-like receptorok (TLR) közvetítik. LPS-t mint PAMP-ot a TLR család tagjai ismerik fel [14]. A TLR-ok felfedezésére 1985-ben került sor az ecsetmuslinca embrió fejlődésének vizsgálata során. Ezen receptorokkal hasonlóságot mutató receptorokat mutattak ki többek közt az egerekben és emberekben, innen ered a Toll-like elnevezés [15]. Azóta bebizonyosodott, hogy a TLR-ok a természetes immunitás rendkívül fontos elemei, hiszen aktiválódásukkor citokinek termelése kezdődik meg, amely az akut fázis reakción át az adaptív immunrendszert indítja be. Tíz féle TLR-t azonosítottak, melyek mindegyike egy PAMP felismerésére képes PRR. A különféle TLR-ok eltérő ligand megkötésére képesek, így a TLR-4 a Gram negatív baktérium sejtfalát alkotó LPS-nek felismerésére és megkötésére képes [14].

Az előbb vázoltakat követően, két további úton folyhatnak a reakciók. Egyik során a sejtmagban IL-8 génnek átíródása kezdődik meg, míg a másik úton a nukleáris faktor- κ B (NF- κ B) transzkripció faktor aktiválódik, majd a sejtmagba jutva pro-inflammatorikus kemokin és citokin gének expresszióját indítja be. Ennek eredményeképpen interleukin-1 és -6, valamint tumor nekrozis faktor- α (TNF- α) termelődik [15].

2.2 IPEC-J2 sejtvonal

A felhasznált IPEC-J2 egy nem transzformált sejttenyészet, amely membrán inzerten monolayert alkot, *in vitro* körülmények között fenntartható, jejunumból származó bélhám sejtvonal, melyet újszülött malacból nyernek szigorúan a kolosztrum felvétele előtt. A sejtvonal számos tulajdonsága alkalmassá teszi arra, hogy a bélnyálkahártya epitéliumát megfelelően modellezze [17].

Morfológiájáról elmondható, hogy apikálisan mikrobolyhokat fejleszt, bazális és apikális felületén citoplazma-nyúlványokat, mikrobolyhokat bocsájt az intercelluláris részbe, felületét glycocalix fedi, azonban eltérően az élő állatokban található bélnyálkahártya sejtrétegtől, az IPEC-J2 sejtvonal sejtszomszédai között nem találhatók kehelysejteket. A sejtek polarizálódnak, különböző sejtkapcsoló struktúrákkal összekapcsolódnak. A sejtek apikális részén tight junction (TJ) komplexek, bazolaterális felületén zonula adherenssek találhatók, míg bazális kapcsoló struktúrái a desmosomák. Az apikális és a bazolaterális felület között fennálló transzepiteliális elektromos rezisztencia (TER) bizonyítja, hogy az egy rétegű sejtvonal integritása megfelelő [18].

Bakteriális hatásra, oxidatív stresszre gyulladásos citokinek termelésével válaszol: IL-1 α , IL-6, IL-7, IL-8, IL-18, TNF- α , GM-CSF (granulocita-macrophág kolóniastimuláló faktor) génexpressziója figyelhető meg [18,19,20]. TJ felépítésében részt vevő molekulák károsodása a TER érték drasztikus csökkentését vonja maga után [21].

2.3 Tight Junction

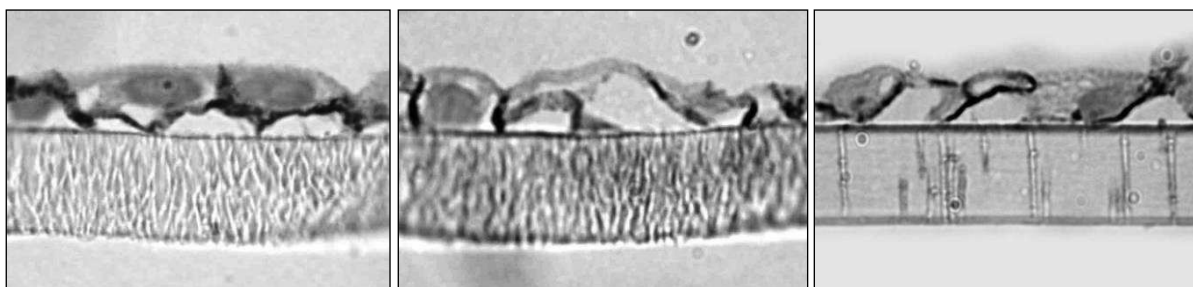
Bélnyálkahártya epitélsejtszomszédai egymáshoz sejtkapcsoló struktúrákkal kötődnek, a kialakuló TJ barriert képez az apikális és bazolaterális tér között, nagy molekulatömegű extracelluláris molekulák fennakadtak ezen a diffúziós barrieren, azonban ez nem képez egy abszolút gátat, hiszen víz és ionok képesek átjutni [22]. TJ-t felépítő molekulák között találhatóak transzmembrán fehérjék, a claudin és occludin családjába tartozó fehérjék, melyek kapcsolódnak a zonula occludenshez, (ZO), amely a sejt citoskeletális struktúrájához köti a transzmembrán egységeket [23]. Claudin az a fehérje, mely a transzepiteliális elektromos rezisztenciát (TER), paracelluláris ionszelektivitást és transzportot fenntartja [24].

TJ két típusát különböztethetjük meg, a szivárgó és a teljesen szoros TJ-t, utóbbinak a permeabilitása kicsi (magas TER mérhető), ilyen található a vesében és a vér-agy gátban

[22]. Vesében claudin-1-t mutattak ki elsősorban [25], ezt bizonyítja, hogy ennek overexpressziója magasabb TER-t eredményezett [26]. Szivárgó TJ rendkívül fontos a bélben, hiszen itt hatalmas mennyiségű folyadék transzportja szükséges, ezért nagyobb paracelluláris transzport lehetséges (ezáltal kisebb TER mérhető) [22].

Gyulladást keltő faktorok, mint *E. coli* és oxidatív stressz, gyulladáshoz vezető citokinek és TJ fehérjék expressziójának csökkenését okozták Caco-2 sejteken [27].

A bélnyálkahártya epitélium sejtjeinek polaritását és barrier funkcióját az apikális és bazolaterális tér között a TJ tartja fenn, melynek integritásának és megfelelő funkciójának vizsgálata során szükséges a TER meghatározása, továbbá különböző jelzőanyagok használatával az apikális és bazolaterális tér közötti paracelluláris permeabilitás is mérhetővé válik [28]. Az inzerteken növekedő egyrétegű sejtvonalak spontán differenciálódásra és polarizációra képesek, sejtkapcsoló struktúrákat kialakítva, hasonlóan a fiziológiás *in vivo* körülményekhez. Apikális sejtkapcsoló struktúra, a TJ kialakul a felhasznált IPEC-J2 sejtvonalban is, mely felépítésében rendkívül nagy szerepe van a claudin-3,-4 valamint occludin molekuláknak (**1. ábra**).



1.ábra: Immunhisztokémiai módszerrel Claudin-1 (bal), claudin-4 (középen) TJ alkotó és E-cadherin (jobb) adherens junction alkotó fehérjék kimutatása kollagén inzerten tenyésztett IPEC-J2 sejtvonalon. A sejtek közötti barna elszíneződés mutatja a pozitív reakciót. Jól megfigyelhetők a membrán inzert pórusai is. (Dr. Jakab Csaba felvétele). Vonal 10 μ m.

A TJ által szabályozott paracelluláris transzport vizsgálata lehetővé válik a TER mérésével, ennek csökkenése azt mutatja, hogy a két tér közötti rezisztencia csökkent, vagyis víz és ionok átjutása fokozódik a két tér között [29].

2.4 Hozamfokozó antibiotikumok betiltása

Az állat- és humángyógyászatban egyre nagyobb aggodalomra ad okot, hogy mára széles körben jelentek meg antibiotikumokkal szemben rezisztens baktérium törzsek. Az antibiotikumok hozamfokozás céljára történő betiltását magyarázza, hogy Európa szerte hatalmas mennyiségben alkalmaztak antibiotikumokat. FEDESA/FEDANA által 1997-ben publikált adatok szerint az Európa Unióban élelmiszertermelő állatok esetében 3494 tonna antibiotikum használtak fel hozamfokozás céljából [30].

Az antibakteriális szerek az egyik leggyakrabban alkalmazott gyógyszercsoport az állatgyógyászatban. *Terápiás* használatkor a meglévő bakteriális fertőzöttség kezelésére adnak

antibiotikumot. Nagy állatlétszám esetén sokszor az egyedi állatkezelés nehezen megoldható, ilyenkor a *metaphylaxis* alkalmaznak. Ebben az esetben a beteg állatokat gyógykezelés céljából, az egészségeket preventíve kezelik antibiotikumokkal. A metaphylaxis tehát antibakteriális terápia és prevenció egyszerre. *Prophylaxis* során a bakteriális fertőzés kialakulása előtt megelőző célból adnak terápiás dózisban antibiotikumokat. Még a profilaxisnál is kritikusan fogadott eljárás az antibiotikumok *hozamfokozásra* történő felhasználása, mely során az antibiotikumok szubterápiás dózisban kerülnek felhasználásra [30]. Az antibiotikumok hozamfokozó hatására az 1940-es években derült fény. 1951-ben az Amerikai Egyesült Államokban állatorvosi vény nélkül alkalmazták az antibiotikumokat, az 50-es és 60-as években Európában az országok saját döntése alapján váltak hozzáférhetővé [31].

Bár a hozamfokozó hatásának pontos mechanizmusa részleteiben nem ismert, de az elfogadott, hogy alkalmazásukkor a napi súlygyarapodás és a takarmány hasznosítás növekszik. Hatásukra az állat természetes bél mikroflórája átalakul, az emésztést és a takarmány hasznosítását jobban lehetővé tevő mikroorganizmusok szaporodnak el, továbbá patogén baktériumokat gyérítő és megbetegedést megelőző hatásuk van [33].

Az antibiotikumok használatával egyidős jelenség az antibiotikum rezisztencia kialakulása. Minden antibiotikum esetében szelektálódnak rezisztens baktériumok, melyek a rezisztenciát horizontálisan és vertikálisan is terjeszthetik. A rezisztencia kialakulását a szubterápiás dózisban történő alkalmazás nagy fokban elősegíti. Az állat és humán terápiában egyre fontosabb a felelősségteljes (prudens) antibiotikum használat, valamint a túlzott, vagy szükségtelen alkalmazás visszaszorítása, ezért az európai országok az állatorvosi és humán klinikai felhasználást szabályozták, majd hatalmas erővel fordultak a mezőgazdasági felhasználás csökkentése felé, mely végül Európában az antibiotikumok hozamfokozásra történő felhasználásának teljes körű beszüntetéséhez vezetett [31,33]. Először 1986-ban Svédországban drasztikus módon minden antibiotikum hozamfokozásra való felhasználását betiltották. Ezt követően 1998-ban az Európai Unió valamennyi tagországra hatályos módon kiterjesztve hét antibiotikum (avoparcin, bacitracin spiramycin és tylosin, virginiamycin, olaquinox, carbadox) hozamfokozásra történő felhasználását tiltották be [30, 32]. 2006-ra már csak négy hozamfokozás céljára alkalmazható antibiotikum (monensin, salinomycin, avilamycin, flavofosfolipol) maradt engedélyezve az Európai Unióban, amelyek 2006. január 1-i hatályba levő tiltásával megszüntették az antibiotikumok hozamfokozásra való alkalmazásának lehetőségét [1].

Köztudott, hogy azok az állati élelmiszerek, melyek a rezisztens baktériummal fertőzött állatokból származnak potenciálisan fertőzőképesek lehetnek az emberekre nézve, azonban ezen kívül más fertőzési lehetőségek is léteznek. Szennyvíz által kontaminálódhat a

környezet, melyből nemcsak az élelmiszertermelő állatok, de szinte bármi és bárki felvehet rezisztens törzseket. Környezettel való érintkezés útján vadállatok, háziállatok, élelmiszertermelő állatok, emberek fertőződhetnek, továbbá a kontaminálódott öntözővíz a növényeket is potenciális forrássá teszi [33].

Az antibiotikumok hozamfokozás céljára történő betiltásának negatív hatásai is megmutatkoznak az állatok egészségi állapotának romlásában (elsősorban a nem megfelelő higiénias viszonyok között tartott állatok esetében) hatalmas gazdasági károkat okozva, azonban ez a tény sokszor figyelmen kívül marad. A betiltás után szignifikánsan mutatkozott meg az antibiotikumok pozitív hatásainak hiánya, így az alternatív, természetes és potenciálisan helyettesítő anyagok iránti kutatás igénye fokozottan jelentkezett [33].

2.5 Bélflóra

Rendkívül fontos az egészséges élet megtartása érdekében állatban és emberben egyaránt a megfelelő bél mikroflóra megléte. A bél hatalmas felülete ($100\text{-}200\text{m}^2$) a bélbolyhok és mikrobolyhok felületnövelésének köszönhető. Ezen hatalmas területen szerény becslések szerint is 10^{14} számú mikroorganizmus él, a jejunumban a számuk $10^2\text{-}10^4$, főleg streptococcusok és lactobacillusok, míg a colonban 10^7 -t is meghaladhatják, itt főleg streptococcusok, actinomycinek, corynebaktériumok és clostridiumok vannak nagy számban [34]. Számos kutatás azt mutatja, hogy a bélflóra összetétele az egyénre jellemző, az egyedekben relatíve állandó a mikroorganizmus populációk összetétele. Születés után betelepülő mikroorganizmusok, bélbaktériumok egy része az állandó bélflorát alkotja, míg vannak a tranziens bélflóra alkotók, melyek táplálkozás során, per os kerülnek be a környezetből és összetételük változó [35].

A bélflóra elsődleges feladata az epitéliumban egy intestinális barrier felállítása, mely megakadályozza patogén mikroorganizmusok bejutását, megtapadását, de emellett számtalan tulajdonsága van, mely nélkül az egészséges élet elképzelhetetlen. A probiotikumok és bélben élő baktériumok a gazda által meg nem emésztett szénhidrátból (pl. cellulóz) rövid szénláncú zsírsavak sóit (acetátot, propionátot és butirátot) fermentálnak, melyek a vastagbélben lévő enterociták energiaellátásának nagy részét tehetik ki, emellett fontos faktorok lehetnek a postnatalis epitheliális adaptációban és normál bélflóra kolonizációjának kialakításában. Caco-2 sejtvonalon végzett kísérletben a butiráttal való kezelés javította az intestinális barrier funkciót, amely a TER szignifikáns emelkedésében mutatkozott meg. Vizsgálatok azt mutatták, hogy nem közvetlenül az occludin, claudin-1,-4 és ZO-1 fehérjék expressziójára hatott, hanem az AMPK aktivitását növelte. Az AMP-aktivált protein-kináz irányítja a TJ proteinjeinek összerendezését [36]. Béلبen élő baktériumok további szerepe az, hogy B-vitaminokat, emésztő és védekező enzimeket termelnek, metabolizálnak potenciálisan karcinogén anyagokat, az immunrendszert állandóan stimulálják [37].

A nyálkahártyához kötött immunrendszer bélben a GALT nevet viseli. Per os bejutó antigéneknek, toxikus anyagoknak, mikroorganizmusoknak a bélrendszer állandóan kitett terület, csakis a megfelelően kialakult immunrendszer tudja ekkora veszély ellen megvédeni a szervezetet. A GALT-ban lévő limfociták száma megegyezik a lépben lévőkével. A limfociták nagy része a mucosában található Peyer-plakkokban helyezkedik el [38,39]. Kis nyirokcsomók a gastrointestinalis traktus egész hosszában fellelhetők, ezen felül limfociták az epitélium bazolaterális terében is előfordulnak. Születés után bélben nincsenek mikrobák, nyálkahártyához kötött immunrendszer sincs jelen, hiszen eddig antigén hatás nem érte a szervezetet. Az anyatej felvétele során a mikrobák folyamatosan települnek be a bélbe, kialakítva ezzel az egyedre jellemző mikflórát. Ez a folyamat egyben hozzájárul a bélhez kötött immunrendszer kialakulásához, éréséhez. Mikroorganizmusok és enterociták közötti interakciók fontosak a kontrollált mértékű citokin és kemokin termelés kialakulásához [40].

Genetikai predispozíció mellett környezeti tényezők is részt vehetnek olyan autoimmun betegség kialakulásában mint például a sclesoris multiplex (SM), melynek folyamata során gyulladásos reakciót váltanak ki a myelin réteget pusztító antitestek. A SM-es és egészséges emberek mikrobiális genomjának vizsgálata során arra keresnek választ, hogy a mikróba populáció összetétele összefüggésbe hozható-e a betegség kialakításában [41]. A bélmikrobák összetételének megváltozása szerepet játszhat krónikus immunmediált gastrointestinalis betegségek (Crohn betegség, idiopátikus patológiás ulceratív colitis) kialakulásában [42].

2.6 Probiotikumok

2.6.1 Történelem és fogalom

Ételek és italok fermentálása hatalmas múltra tekint vissza, hiszen a tartósítás egy legrégebbi módszere. A probiotikumok jótékony hatását az egészségre már az Ótestamentumban is leírták, hiszen Ábrahám hosszú életét az elfogyasztott savanyú tejnek köszönhette. Pliniusz k.e. 76-ban bélbántalmak kezelésére fermentált tejet ajánlott, majd Mecsnyikov volt, aki megfigyelte, hogy kaukázusi emberek a kefir fogyasztásának köszönhetően sokkal tovább éltek, mint akik kefirt nem fogyasztottak. A probiotikum elnevezés a „pro bios” kifejezésből származik, melynek jelentése „az életért”. Ezt a szót a mai megfogalmazás szerint először Parker használta, aki szerint a probiotikumok olyan mikroorganizmusok és azok vegyületei, melyek hozzájárulnak a bél mikroflóra egyensúlyához. Fuller 1989-ben próbálta tovább fejleszteni a probiotikum fogalmát, majd 1992-ben Havenaarnak és munkatársainak szélesített fogalomköre következett, akik úgy határozták meg a probiotikumot, hogy az egy mono vagy kevert mikroorganizmus kultúra, melyet állatnak vagy embernek adva jótékonyan befolyásolja a gazda szervezetét. Legjobb definíció végülis Huis In't Veld és Havenaar nevéhez kötődik, hiszen ők azt is kihangsúlyozták, hogy

figyelembe kell venni azt, hogy a probiotikum csakis megfelelő mennyiségben adva fejt ki jótékony hatást a bélflóra módosítása révén a gazdára [43].

2.6.2 Kritériumok

A probiotikumokkal szemben támasztott kritériumok között szerepel a hasnyálmirigy enzimek és epesavval szembeni rezisztencia, valamint a gyomorsavval szembeni ellenállóképesség. A gastrointestinalis traktusban a probiotikum túlélése függ a gyomor pH-tól, az ott tartózkodás idejétől valamint a mikroorganizmus fajától [44]. A bélnyálkahártyához való kötődési képesség szintén fontos szempont, mivel ezáltal kiszoríthatja a patogén mikroorganizmusokat. A biztonság alapvető fontosságú, számos vizsgálatnak kell alávetni a feltételezett probiotikus tulajdonsággal rendelkező baktériumot mielőtt kereskedelmi forgalmazásba kerülne, többek között, hogy dokumentált, valós egészségre pozitív hatással rendelkezzen, és lehetséges legyen ipari mértékű előállítás [45,46]. A legjobb túlélést gastrointestinalis traktusban a *Lactobacillus acidophilus* 2415, 2401, 2409, *L. longum* valamint a *Bifidobacterium pseudolongum* mutatta [44]. A *L. casei* és a *L. plantarum* hosszabb ideig képes tejben életben maradni, mint a *L. acidophilus*, a *L. reuteri* és a *Bifidobacterium*. A *L. plantarum* bírja legjobban a savas közeget [47].

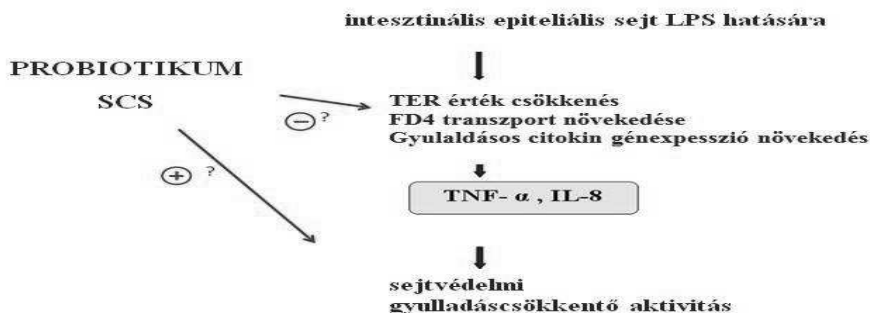
2.6.3 Probiotikumok hatása

Probiotikumok pozitív hatása rendkívül sokféle lehet, és a kutatási eredmények alapján ez a lista csak egyre bővül. Legfontosabb kedvező hatásai között tartják számon az egyén endogén mikroflórájának modulációját, a patogénekkal való versengést, ezáltal azok kiszorítását; a szérum koleszterin és triglicerid szint, valamint a vérnyomás értékének csökkentését; a laktóz intolerancia tüneteinek mérséklését; rota vírus okozta hasmenés csillapítását; karcinogén anyagok megkötését, ezáltal a méhnyakrák és húgyhólyagrák előfordulásának valószínűségének mérséklését [48]. Stimulálják a humorális és a sejtes immunrendszert; csökkentik a nemkívánatos metabolitok (ammónia, pro-carcinogén enzimek a vastagbélben) szintjét, valamint mérséklék az allergiás tüneteket; enyhítik az IBS kialakulásának lehetőségét; az ásványi anyagok metabolizmusát javítják, ezzel a csont denzitásra és stabilitásra jótékonyan hatnak [49]. A bélsár enzimek (β -glukuronidáz, béta-galukozidáz, nitroredukáz, ureáz) mennyiségét csökkenteni képesek [50]; baktérium-ellenes molekulákat termelnek (savak, hidrogén-peroxid, bacteriocin). Több kísérlet bizonyította, hogy humán daganatból származó transzformált bélsejtvonalon különböző patogének, mint *Salmonella*, *E. coli*, *Clostridium* ellen védőhatással voltak, kimutathatóan csökkentették a gyulladáshoz vezető molekulák és citokinek termelődését, ezáltal mérsékeltek a gyulladáshoz vezető választ a bélben [51].

A bélnyálkahártya felületét mucin védi, melynek a barrier funkció fenntartásában van szerepe. A *L. plantarum* 299v a MUC-2 és MUC-3 gén transzkripciójának növelésével több mucin termelését váltotta ki, ezzel megakadályozva a patogén mikroorganizmusok kötődését a bélfalhoz [52]. Mucin mellett, a barrier fenntartásában központi szerepe van az enterociták közötti sejtkapcsoló struktúrának, a TJ-nak. Patogén baktériumok képesek a citoszkeleton és a TJ proteinjeinek átrendezésével a barrier funkció nagymértékű csökkentésére. Probiotikummal való előkezelés javította a barrier funkciót és csökkentette a patogének kötődését a bélfalhoz. A TJ felépítésében szerepet játszó occludin szerin-foszforilációját és a ZO-1 tirozin-foszforilációját csökkentették, így azok funkciócsökkenését megelőzték [53].

A probiotikumok stimulálják az immunrendszert, az enterocitákkal való interakciójuk citokinek és kemokinek termelődéséhez vezet. *L. sakei* képes volt IL-1 α , IL-8, TNF- α termelés kiváltásához, *L. acidophilus* és *casei* szisztémás immunstimulációt okoztak, a fagocita aktivitást növelték, a *L. rhamnosus* up-regultálta a fagocita receptorok génexpresszióját. *L. rhamnosus* és *L. casei* a natural-killer sejtek aktivitását és citotoxikus potenciálját növelte. Kísérletek azt mutatják, hogy probiotikummal kezelés hatására bekövetkező IL-8 termelődés tűnik a fő citokinnek a kapott válasz során. A probiotikumok az adaptív idegrendszerre is hatással vannak, az IgA termelését stimulálják a bélben [54].

A reaktív szabad gyököknek az öregedéssel-összefüggő krónikus betegségekben, mint a szívelégtelenségben, diabetes mellitusban nagy szerepük van. Gastrointestinalis betegségekben (gasztrikus és duodenális fekélyekben, pancreatitisban, IBD-ben, vastagbélgyomor-nyelőcső rákban) is igazolták a reaktív oxigén gyökök (ROS) károsító hatásait. Ismert, hogy az antioxidánsok védelmet nyújtanak az oxidatív stresszel szemben. Egyes probiotikus baktérium fajokról is bebizonyosodott, hogy antioxidáns szereppel rendelkeznek, azonban ez nem általános hatása a probiotikumoknak, ezt csak a *L. paracasei*, *L. rhamnosus* GG esetében sikerült ezt idáig bizonyítani [55]. Új felfedezés a probiotikumokkal kapcsolatban, hogy képesek interakcióba lépni a központi idegrendszerrel [56], továbbá a fogszuvasodásért felelőssé tehető *Streptococcus mutans* valamint *Candida albicans* növekedését képes gátolni a *L. plantarum* 299v, 931, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. reuteri* [57]. Az *Enterococcus faecium* a normális bélflóra tagja, emellett törzskönyvezett táplálék kiegészítő. Kimutatható, hogy a hasmenés kialakulását és annak következményeit képes csökkenteni. A *Bacillus cereus* és *S. boulardii* probiotikummal takarmányozott malacok esetében harmincszor kevesebb mannit átjutást mértek a bélnyálkahártyán keresztül, tehát a bélnyálkahártya barrier funkcióját javította [58]. A jótékony hatások eléréséhez 10⁶-10⁹ sejt/nap elfogyasztás kell [47].



2. ábra: Probiotikum feltételezhetően gátló hatást fejtenek ki az LPS által kiváltott mérhető TER érték csökkenésre, jelzőmolekula (FD4) apiko-bazolaterális átjutásra és gyulladásos citokinek termelésének növekedésére. A sejtmentes felülűző (SCS) továbbá sekentően hat a gyulladáscsökkentő mechanizmusokra

2.6.4 Probiotikumok az Európai Unióban

Európai Unióban 2006 után minden antibiotikum felhasználása hozamfokozásra tiltottá vált, ami a mai napig hatalmas állategészségügyi és ezáltal gazdasági károkat okoz. A csökkent termelés mellett a növekvő morbiditás és mortalitás is növekvő gondot okoz, így az alternatívák keresése kiemelkedő jelentőségűvé vált. A 2.6.3 fejezetben felsorolt okokból a probiotikumok megfelelőnek tűnnek. Humán felhasználásra *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* fajokat, míg állatoknak *elsősorban Lactobacillus, Bacillus és Enterococcus* fajokat adnak [46]. Bár humán felhasználásra több évszázados történelem tekint vissza, az állatok általi felhasználására a hozamfokozásra történő antibiotikum betiltás után került sor. Régóta használt probiotikumokról tudjuk, hogy nem toxikusak, nincs káros hatásuk, azonban újabban felfedezett baktérium fajokról nem feltételezhetjük hogy ezek is ártalmatlanok, hatékonysági és biztonsági kísérletek szükségesek [59]. Egyes *Bacillus* fajok termelnek toxinokat, emiatt a SCAN (Scientific Committee on Animal Nutrition) azt javasolta, hogy *Bacillus cereus* törzsek használatát szüntessék be [60].

2.6.5 Prebiotikumok és synbiotikumok

A probiotikumok által felhasználható tápanyagot prebiotikumnak nevezik, melyek a gazda számára emészthetetlen tápanyagok, amelyek eljutnak a vastagbélig, ott tápanyagként szolgálnak a mikroflórának, így prebiotikum adása növelheti a hatékony probiotikus baktériumok számát, azok proliferációját és aktivitását. Prebiotikumnak nevezett szénhidrátok a laktulóz, az inulin és bizonyos oligoszacharidok, a melyeket a baktériumok képesek fermentálni, és belőlük rövid szénláncú zsírsavakat képezni. A pro- és prebiotikumokat együttesen a synbiotikumoknak nevezik [61].

2.7 Oxidatív stressz

2.7.1 Oxidatív stressz és a citokinek szerepe

Az oxidatív stressz egy olyan kóros állapot, melyről akkor beszélünk, amikor a szervezet antioxidáns védőmechanizmusai kimerülnek, és már a feleslegben lévő reaktív oxigén fajták

(ROS) megbontják a szervezet redox-homeosztázisát [62]. A külső környezetben számos folyamat billentheti ki a fiziológiás redox-homeosztázist, ilyenek lehetnek a táplálékban lévő különböző adalékanyagok és összetevők, ionizáló sugárzások, valamint a xenobiotikumok [63]. Számos betegség patomechanizmusában az oxidatív stressznek szerepe van: arteriosclerosisban [64], magas vérnyomásban [65], diabetes mellitusban [66], gyulladásos eredetű bélbetegségekben (IBD), mint például a Crohn betegség vagy ulceratív colitisben [67], gyomorfekélyben és gyomorrákban [68], neurodegeneratív betegségekben [69], reumatoid arthritisben [70]. Keletkező ROS azonban rendkívül fontosak is lehetnek, így fagocitózis során a monocitákban, a neutrofil granulocitákban és a macrofágokban, a bekebelezett mikroorganizmusok elpusztításában játszanak szerepet (oxidative burst) [71]. A mitokondriumokban megnövekedett ROS képződés az apoptózisban játszik központi szerepet (mitokondriális apoptózis) [72].

Az oxigén molekula elengedhetetlen a földi aerob élethez, azonban minden élőlényre veszélyt is jelenthet, hiszen biradikális gyökként, külső elektronhéján 2 párosítatlan elektront tartalmaz. Ebben a formában csak gyenge oxidálószerként viselkedik, azonban redukciójával szuperoxid anionná válhat, mely további redukcióval hidroxil gyökké alakulhat [73]. A ROS vegyületek közül a legveszélyesebb a hidroxil gyök OH^\cdot , mivel szinte minden molekulát képes megtámadni. Annyira reaktív, hogy életideje mikroszekundummal mérhető, mivel azonnal reakcióba lép egy másik molekulával. A reaktív szabad gyökök valamennyi sejtalkotóban képesek károsodást okozni, de a legjelentősebb mértékű gondot a DNS, RNS, tiolok (főleg a fehérjét alkotó aminosavak oldalláncának SH- csoportján) roncsolása, valamint a többszörösen telítetlen zsírsavakat tartalmazó (PUFA) biológiai membránok lipid peroxidációja jelenti [74].

Lipid peroxidáció során a hidroxil gyök a zsírsavláncban lévő C-atomról leszakít egy hidrogént. Ezek a keletkező *lipidperoxidok* a membránban kapcsolódhatnak egymással vagy proteinekkel. Oxigénnel kapcsolódva *peroxil gyök* keletkezik (iniciáció), amely másik zsírsavról hidrogént szakít le, ezt a zsírsavat *lipid-peroxil* gyökké alakítva, míg önmaga lipid gyökké alakul (propagáció). A folyamat végén a hatalmas számban felszaporodott lipid gyökök egymással kapcsolódnak, a membrán tönkremegy, funkcióját veszti (termináció). Egy hidroxil gyök több száz zsírsavat képes károsítani. A végeredmény, hogy a membrán teljesen elveszti a funkcióját, súlyos sejtkárosodást alakítva ki [71, 75] DNS, fehérje és lipid oxidációja első lépésként játszhat szerepet a mutagenesisben [76] és carcinogenesisben [77].

Az élet alapvető feltétele, hogy a ROS károsító hatását ki tudja védeni a sejt. A védekező mechanizmusok bonyolult rendszerének egyik legfontosabb tagjai az antioxidáns vegyületek (karotinoidok, aszkorbinsav, E-vitamin, glutation). Emellett enzimszisztemek (szuperoxid-dizmutáz, kinon-reduktáz, kataláz, glutation-peroxidáz), kialakult DNS hibák javítására

szolgáló javító enzimek, és károsodott molekulák eltávolítását végző proteolitikus enzimek, foszfolipázok is a rendszer tagjai [78]. ROS vegyületek hatása a sejtekre koncentrációtól függően eltérő lehet. Mitotikus sejtekre serkentően hat a kismértékű oxidatív stressz, azonban nagyobb mértékű ROS már apoptózist és nekrozist okoz [78]

Citokinekre, növekedési faktorokra, külső környezeti hatásokra a sejt ROS termelődésével válaszol, így a sejtben a reaktív oxigén gyökök másodlagos hírvivő folyamatot is ellátnak, sejtosztódás, gyulladás és apoptózis jelátvitelében való szerepük bizonyított [79].

A citokinek kis molekulatömegű szabályzó molekulák, melyek a veleszületett és a szerzett immunrendszer befolyásolásán át nagy szerepet kapnak a gyulladásos válasz kialakításában. Elsősorban parakrin és autokrin módon hatnak, immunsejtekben termelődnek [80]. A citokinek családjába tartoznak az interleukinok, interferonok, TNF- α , valamint nem immunológiai citokinek (eritropoetin). Jellemző rájuk a redundancia (más-más citokinek ugyanazon feladatot látják el) valamint a pleitropia [81]. Speciális membrán receptorokhoz kötődnek, ezzel egy intercellulárisan lezajló kaszkádot indítanak el, megváltoztatva a sejt működését. Sejtfelszínen expresszálandó receptorok számbeli mennyiségére hatással lehetnek, ugyanis azok génjeinek up- illetve down-regulációját okozhatják. Gyulladásban betöltött szerepük régóta tisztázott, a gyulladás kiváltásában vesznek részt (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α), melyet proinflammatorikus hatásnak hívunk. Vannak azonban gyulladás-ellenes citokinek is, mint például az IL-4,10,11,13, sőt meglepő módon az IL-1 és a TNF- α bizonyos receptorai is ide sorolhatók [82].

A pleiotrópiának megfelelően a IL-4,10,13 aktiválja a B-limfocitákat, de a sejtekben elnyomják a IL-1 és TNF- α képződését. Ehhez hasonló módon az IFN- γ is betölthet gyulladás keltő és ellenes szerepet. Oxidatív stressz képes beindítani gyulladásos citokinek termelődését, ezzel gyulladást kialakítva [83].

2.7.2 Az oxidatív stressz meghatározás módszerei

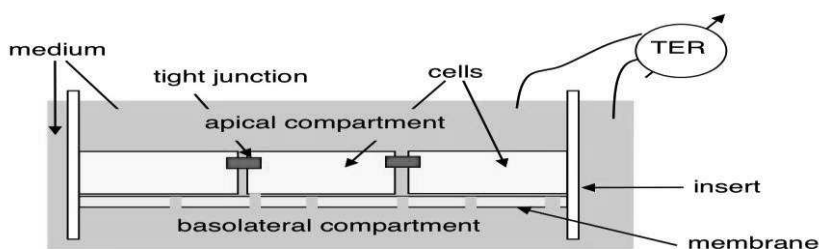
Oxidatív stressz folyamán számos ROS vegyület keletkezik, melyek közül a hidrogén-peroxid a legstabilabb, így az oxidatív stressz kvantitatív mérésére legalkalmasabb vegyület. A már rendkívül kis mennyiségnyi (50nM) hidrogén-peroxid meghatározására Amplex red módszer segítségével van lehetőség. A reakció lényege, hogy a H₂O₂ Amplex red reagenssel (10-acetil-3,7-deihidrofenoazin) torma-peroxidáz (HRP) jelenlétében 1:1 arányban reagál, miközben resorufin keletkezik, mely piros színben fluoreszkál [84]. Használatos még a p-dihidrofenilacetil és a 2,7-diklorodihidroflorescein (H2DCF) alkalmazása [85].

3. Anyag és módszer

3.1 IPEC-J2 sejtvonal tenyésztése és LPS kezelés

IPEC-J2 sejtvonalat használtam fel kísérleteimhez, melyet poliészter membrán inzertre helyeztem, ezzel egy sejtrétegű bélnyálkahártya epitéliumot modelleztem *in vitro*. Az apikális és bazolaterális folyadék kompartmentek kizárólag 0,4 µm-es pórus átmérőjű interten keresztül voltak kapcsolatban. A komplett médium, melyet a sejtek fenntartására használtam, 1:1 arányban tartalmaz: Dulbecco's Modified Eagle's mediumot és Ham's F-12 Nutrient Mixtrure-t (DMEM/F12), majd ezt kellett kiegészítenem, 5% FBS-sel (főtális borjú savó), 5µg/ml transferrinnel, 5 ng/ml szelénnel, 5 µg/ml inzulinnal, 5 ng/ml epidermális növekedési faktorról (EGF) és 1% penicillin-sztreptomycin keverékkel (ez mind Fischer Scientifictól származik).

Az IPEC-J2 sejtek inzertre való helyezését 7 napos tenyésztés előzte meg egy 25 cm³ flaskában 10 ml tápfolyadékban. Fontos, hogy 37 °C és 5 v/v % CO₂ jelenlétében történjen a tenyésztés minden folyamata. A tenyésztés végén a sejtek passzálása következett. A tápoldat leöntése és 5 ml PBS-sel (phosphate buffered saline) való átmosást hajtottam végre. A sejtek a flaska felületére növe helyezkedtek el, azokat onnan el kellett távolítanom, melyet 2 ml tripszin-EDTA (0,05% tripszin és 0,6mM EDTA/etilén diamin-tetraacetát) hozzáadásával végeztem el. Óvatos rázással fizikailag segítetttem a folyamatot, 10 perc múlva a sejtek leváltak a flaska felületéről. A levált sejteket új steril flaskába helyeztem 2 ml mennyiséget pipetázva a tripszin-EDTA-sejt oldatból, melyet a DMEM/F12 tápoldatból 10 ml-re egészítettem ki. Ezek után a sejtek poliészter membrán inzertre, 6 lyukú sejtenyésztő edényre (Costar Transwell; 4,67 cm²/lyuk) kerültek átoltásra. A kívánt sejt denzitás 6x10⁶ db sejt/lyuk. Bazolaterális térbe 2,5 ml, míg az apikális térbe 1,5 ml DMEM/F12 médium került.



3. ábra: A TER mérés sematikus rajza 3D IPEC-J2 sejtkultúrán

A TER mérését (3. ábra) TER mérőkészülékkel hajtottam végre (Evom Epithelial Tissue Volt/Ohmmeter Precision Instruments). Az apikális és bazolaterális kompartmentek közötti elektromos rezisztencia különbség jelzőértéke a kialakult monolayer integritásának. Az általam tervezett további kísérleteket >4000 Ohm*cm² TER értéket mutató monolayeren végeztem el. A mérést steril körülmények között kellett elvégezni szobahőmérsékleten.

Használat előtt sterilizálni kellett az elektródákat, majd mérések között a felhasznált DMEM médiumban öblíteni. A mérőműszer 2 elektródája közül a hosszú elektródát a bazolaterális térnek megfelelő folyadékba, míg a rövidebb elektródát az apikális kompartmentbe kellett helyezni. A mérést háromszor ismételttem (n=3).

A sejteket LPS kezelésnek vetettem alá, 1 és 10 µg/ml LPS koncentrációkat alkalmazva. 1 mg/ml *Salmonella enterica ser Typhimurium* (Sigma) törzsoldatból állítottam elő DMEM felhasználásával a kívánt koncentrációkat, majd 2,4 és 24 óra inkubáció után TER értéket mértem.

3.2 Baktérium törzsek sejtmentes felülúszóinak előkészítése

Probiotikumok védőhatásának vizsgálatához az alábbi baktérium fajokat alkalmaztam: *Lactobacillus plantarum* 2142 (Institute of Dairy Microbiology, Agricultural Faculty of Perugia University, Perugia, Italy), *Bacillus licheniformis* CECT 4536, *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 (Norel Animal Nutrition, Madrid, Spain). A különböző baktériumfajoknak tenyésztéséhez eltérő tápoldatokat használtam. A *L. plantarum* 2142 tápoldata DeMan, Rogosa, Sharpe (MRS), a *B. licheniformis*nek Luria Bertani (LB), míg a *B. amyloliquefaciens*nek tápoldata Tryptone Soya Broth (TSB).

A baktérium törzseket -20 °C 20% glicerinnel tartalmú tápoldatban tároltuk. A tervezett kísérlet előtt 2 nappal oltottam be a baktériumok törzseket a nekik megfelelő 10 ml tápoldatba 1% arányban. Az inkubálás 24 óráig 37 °C-on történt, ezután újabb leoltás következett, további 24 óra inkubáció után a baktérium tenyészetekből sejtmentes felülúszót (SCS) készítettem centrifugálással (3000 g-vel 10 percig 5 °C). A kapott SCS-t steril kémcsőbe pipettáztam, és steril körülmények között 0,22 µm pórusátmérővel rendelkező mikroszűrőn átszűrtem.

Korábbi kutatások mutatják, hogy a gyulladáscsökkentő citokinek (IL-8, TNF-α) relatív génexpressziójának szintjét az SCS 13,3% koncentrációban mérsékelte szignifikáns mértékben [86].

3.3 Citotoxicitás vizsgálata Neutral red (NR) módszerrel

NR felvétel tesztel kvantitatívan meghatározható az életben maradt sejtek száma, gyakran használt *in vitro* citotoxicitási teszt. Azon az elven alapszik, hogy csak az életben maradt sejtek képesek a NR festéket felvenni, és lizoszómáikban tárolni. Az élő sejtek által felvett NR mennyisége spektrofotometriás méréssel (540 nm hullámhosszon) meghatározható.

A citotoxicitás eredmények alapján választottam ki azokat az LPS és probiotikum felülúszó koncentrációkat, melyek mellett az IPEC-J2 sejtek még életképesek maradtak. Ehhez az alábbi módon állítottam össze az oldatokat (**1. táblázat**):

1.táblázat: Citotoxicitási teszt protokolljának megfelelő oldatok előállításának módja (n=3)

<i>LPS:</i>
1 µg/ml LPS oldat: 1 µl 1 mg/ml LPS +999 µl phenol red mentes DMEM 10 µg /ml LPS oldat: 10 µl 1 mg/ml LPS +990 µl phenol red mentes DMEM
<i>Tápooldatok:</i>
2.5% TSB/LB: 50 µl LB/TSB+1950 µl phenol red mentes DMEM 5% TSB/LB: 100µl LB/TSB+1900 µl phenol red mentes DMEM 13.3% TSB/LB: 260 µl LB/TSB+1740 µl phenol red mentes DMEM 13.3% MRS: 260 µl MRS+1740 µl phenol red mentes DMEM
<i>Probiotikumok:</i>
2.5% SCS : 125 µl+4875 µl phenol red mentes DMEM 5% SCS : 250 µl+4750 µl phenol red mentes DMEM 13.3% SCS : 665 µl+4335 µl phenol red mentes DMEM

A sejteket az NR vizsgálatokhoz 96-os mikroplate-n tenyésztettem. A tenyésztés befejezése után a sejtek felszínéről a médiumot eltávolítottam, majd phenol red mentes DMEM-mel a sejtek felszínét kétszer átmostam. Ezután minden IPEC-J2 sejtet tartalmazó lyukhoz NR-t adtam 100 µl/ lyuk mennyiségben (pH=7,4, ha ettől eltér NaOH-dal semlegesíttem). Az 50 µg/ml koncentrációjú NR médium 24 ml plain phenol red mentes DMEM-et és 360 µl NR törzsoldatot tartalmazott. Ezután a sejteket 37 °C-on inkubáltam 2-4 órán keresztül. Inkubációs idő után leöntöttem a sejtek felületéről a festéket, majd alaposan átmostam felszínüket phenol red mentes DMEM-mel. Azután destain oldatot adtam a sejtekhez max 50 µl/lyuk mennyiségben, mely a sejteket elpusztítva, szétroncsolva kiszabadította az NR-t. Ezzel a folyadékkal 10 percig inkubáltam a plate-t rázatás mellett, majd az előhívott NR festék mennyiségét ELISA readerrel határoztam meg (EZ Read 400 microplate reader biochrom).

3.4 Probiotikumok LPS elleni védőhatásának vizsgálata

Paracelluláris permeabilitás mértékét az epiteliális enterociták közötti TJ-k szabályozzák. Fiziológias körülmények között az apikális és bazolaterális közeget a TJ-ok elválasztják, ami késlelteti az ionok és nem-ionos hidrofil anyagok koncentráció függő átjutását. A TER mérése az ion permeabilitás, míg a fluoreszcein-isotiocianát 4kDa-dextran (FD4) átjutás mérése a nem-ionos hidrofil anyagok paracelluláris átjutásának mérésére alkalmas. FD4-et apikálisan

adtam a monolayerhez, és megfelelő inkubációs idő után a bazolaterális kompartmentben lévő mennyiségét fluoriméter (Victor X2 2030) segítségével határoztam meg.

3.4.1 FD4 átjutás kalibrációs görbe

A kalibrációs görbe elkészítéséhez hígítási sort készítettem, melynek elkészítéséhez 1 mg/ml tömény FD4 (Sigma) törzsoldatot és DMEM tápoldatot használtam fel. Az alkalmazott FD4 oldatok koncentrációja (mg/ml): 0,02; 0,015; 0,01; 0,005; 0,002; 0,001; 0,0005; 0,0002; 0,0001. Inkubációs idő letelte után a bazolaterális térbe átjutott FD4 fluorimetriás mérésére került sor (485nm extinkciós és 544nm emissziós hullámhossz). A mérést Costar 96-os plate-n végeztem, úgy hogy a bazolaterális kompartmentből a plate lyukaiba 100 µl médiumot pipettáztam, 3 párhuzamos sorozatot alkalmazva.

3.4.2 Védőhatás vizsgálata

A kísérlet előtt IPEC-J2 sejtek integritásának, differenciáltságának ellenőrzésére TER mérést végeztem. A sejtekhez 37 °C-ra melegített plain DMEM/F12 (a pDMEM/F12 FBS-t és antibiotikumot nem tartalmaz) oldatból bazolaterálisan 2,5 ml és apikálisan 1,5 ml mennyiséget pipettáztam. A LPS *Salmonella enterica ser. Typhymurium*-ból (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) származott. Kísérlet előtt frissen készítettem 1 mg/ml-es LPS törzsoldatából a további kísérlethez szükséges 1 µg/ml és 10 µg/ml LPS oldatokat. A védőhatást 1, 2 és 13,3% SCS-sel valamint 2mM nátrium-*n*-butiráttal (SB) vizsgáltam. Kontrollként LPS és SCS nélküli 1,5 ml phenol red mentes DMEM tápoldatot használtam. Az inzerteket apikálisan kezeltem (**2. ábra**).

2. ábra: Védőhatás prokoll alapján elvégzett kezelések n=3

Kontroll	1 µg/ml LPS	10 µg/ml LPS
10 µg/ml LPS + 2mM SB	10 µg/ml LPS + 1% B.licheni	10 µg/ml LPS+ 2% B. licheni
10 µg/ml + 13,3% Lp 2142		

SCS-ben lévő acetát, propionát butirát, tejsav fermentumok savanyíthatják a tápoldatot, így pH mérés ezek alkalmazása előtt rendkívül fontos. Szükség esetén az SCS-t NaOH-val semlegesítettem.

A probiotikum védőhatás meglétének ellenőrzésére TER és FD4 paracelluláris átjutás méréseket végeztem. Az IPEC-J2 monolayer 1 és 10µg/ml LPS-sel kezeltem és 4 és a 24 órában TER értéket mértem. LPS és SCS adásával párhuzamosan 1 mg/ml FD4-t adtam apicalisan a sejtekhez, melynek átjutását 4 és 24 óra inkubálás után bazolaterális kompartmentből vett minta fluorimetriás mérésével határoztam meg.

3.5 ROS mennyiségi mérése Amplex red reagenssel

Az LPS által indukált hidrogén-peroxid meghatározáshoz Amplex red kit-et használtam, amely 5 fiola Amplex red reagenst (10-acetil-3,7-dihydrofenoxazin), 700 µl DMSO-t (dimetilszulfoxid), 5Xreakció puffert (RB), 10 egység torma-peroxidot (HRP), 200 µl 3%-os hidrogén-peroxidot tartalmaz. Amplex red reagens levegőre, lúgos közegre és fényre szenzitív, továbbá használat előtt szükség volt szobahőmérsékletre való felmelegítése.

A kísérlet előtt el kellett készítenem a törzsoldatokat (**3. táblázat**).

3.táblázat: Amplex red reakció elegyeinek elkészítési módja a kit használati utasítását követve.

10mM Amplex red: 60 µl DMSO-ban 1 fiola Amplex red feloldása
1xReaction puffer: 4ml 5xRB-hez 16 ml desztillált víz
10 U/ml torma-peroxidáz: 1ml 1xRB-ben 1 fiola HRP
20mM H₂O₂: 3% H ₂ O ₂ adása 1xRB-hez

A kalibrációs görbe elkészítéséhez a 96-os plate lyukaiba 50 µl hidrogén-peroxid oldatot pipettáztam, az alkalmazott koncentrációk az alábbiak (µM): 0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,5; 1; 2,5; 5 voltak. Fél fél óra inkubáció után a 560 nm extinkciós és 590 nm emissziós hullámhosszon fluoreszcencia intenzitást mértem (Victor X2 2030 multilabel reader).

Az LPS által indukált hidrogén-peroxid mérési reakciókban a sejteket 1 és 10 µg/ml LPS-sel kezeltem. A sejtekhez 10 µl-nyi mennyiségben 10mM Amplex red-et, 100 µl-t az 1 U/ml torma peroxidázból, valamint 4,85 ml 1xRB-t pipettáztam 1 és 10 µg/ml LPS-sel együtt. Az IPEC-J2 sejtek a 96-os plate lyukainak alján helyezkedtek el 50 µl phenol red mentes DMEM médiumban, 30 és 60 perces inkubálást követően a festék fluoreszcenciájának intenzitását mértem.

3.6 IPEC-J2 sejt vonal IL-8 termelésének meghatározása szendvics-ELISA módszer segítségével

Az IL-8 mérésére sertés-specifikus IL-8 ELISA kitet használtam (Invitrogen). Első kísérletben a poliészter membrán inzerten tenyésztett IPEC-J2 sejteket egy órán át inkubáltam apikális kompartmentbe adott 1 és 10 µg/ml koncentrációjú LPS-sel. Ezt követő kísérletben probiotikumok gyulladáscsökkentő hatását vizsgáltam, mely során nátrium-*n*-butirátot 2 mM koncentrációban alkalmaztam, valamint *L. plantarum* 2142 sejtmentes felülúszóját 13,3 %-ban adtam apikálisan 1 és 10 µg/ml LPS-sel egyidőben. Egy óra inkubáció után, további 24 órás inkubáció következett mindkét kísérletben.

Az LPS hatására a sejtek által termelt IL-8 mennyiségét a bazolaterális és apikális kompartmentben is meghatároztam ELISA módszerrel, míg a probiotikum védőhatás

kísérletében az IL-8 mennyiségének mérését csak a bazolaterális térben végeztem, mivel a korábbi kísérletek szerint a bazolaterális térben az IL-8 mennyisége meghatározóbb volt. Az inkubációs idő letelte után a médiumot a sejtek mindkét kompartmentjéből összegyűjtöttem, és a kit gyártójának használati utasítását követve végeztem el az ELISA tesztet (alábbiakban az LPS hatás vizsgálatának pontos menetét fejtem ki, azonban a probiotikum gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata is azonos módon történt, a kísérletnek megfelelő minták felhasználásával):

Standardet hígítópufferben (Standard Diluent Buffer) oldottam fel liofilizált Sw IL-8 antigént, ezzel elkészítettem a 10000 pm/ml standard törzsoldatot. Ezután 2000 pg/ml koncentrációjú oldatot úgy hoztam létre, hogy 480 µl hígítópuffert tartalmazó csöbe pipettáztam az előzetesen elkészített standard oldatból 20 µl-t. Kalibrációs görbe felállítása szükséges a meghatározni kívánt minta IL-8 mennyiségének megállapításához, így hígítási sort készítettem (2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, és 31,2 pg/ml-es oldatok felhasználásával). A kitben található lemez lyukainak belső felületére IL-8 elleni antitestek vannak impregnálva. Ezekbe a lyukakba 50 µl inkubációs puffert mértem be. A kalibrációs görbe mérését megelőzően vakként (chromogen blank) meghagytam üresen az első lyukat, abba nem helyeztem vizsgálandó puffert. A második lyukba 50 µl hígítópuffert pipettáztam, a többi 7 lyukba pedig a hígítási sornak megfelelő koncentrációban adtam a standard oldatból 50-50 µl-t. A lemez fennmaradó lyukaiba apikális és bazolaterális médiumból származó mintákat pipettáztam az inkubáció idő letelte után, szintén 50 µl mennyiségben. A kit lemezt 2 órás inkubáció idejére letakartam és szobahőmérsékleten tartottam, mely alatt a mintákban lévő antigének (IL-8) kötődött a kit lyukak alján lévő IL-8 antitestekhez. Az inkubációs idő leteltével a lyukak folyadéktartalmát eltávolítottam, víz és mosópuffer (Wash Buffer Concentrate 25X) 1:24 arányú keverékével négyszer átmostam, eltávolítottam minden nem kötött IL-8-t. A lyukakba ezután 100 µl biotinnal konjugált IL-8 ellenanyag-oldatot pipettáztam (Sw-IL-8 Biotin Conjugate). Ezen módon hozzáadott új IL-8 ellenanyagok 1 órás szobahőmérsékleten letakart módon végrehajtott inkubáció alatt hozzákötődtek a lyukak alján lévő antitestekhez kötődött IL-8 molekulákhoz, ezzel létrehozva 3 rétegben elhelyezkedő ellenanyag-antigén-ellenanyag „szendvicset”. Újabb mosás után 100 µl streptavidin-peroxidáz komplex (Streptavidin-HRP) 100-szorosra hígított oldatát adtam a lyukakba, 30 perc inkubációs idő alatt a biotin kötőhelyekhez kapcsolódtak az avidin-enzim komplexek (egy biotin molekulához 4 avidin képes kötődni, megnövelve a reakció szenzitivitását). Ezután az oldatok eltávolítását, a lemez átmosását végeztem el, majd hozzáadtam a kromogén szubsztrátot (Stabilized Chromogen), melynek hatására kékülni kezdett az oldat. A 100 µl kromogént az eddig üresen álló vak lyukába is mértem, majd 30 percig sötét helyen történő inkubáció után 100 µl leállító oldatot adtam a mintákhoz (a chromogen blank-hez is).

A kezdeti kék szín sárgára átváltott, melynek fényintenzitását mikrotiter lemez leolvasóval (MRX TC revelation Mikroplate Reader; DYNEX Technologies) detektáltam a vak ellenében. (abszorbancia 450 nm). A leolvasó szoftvere megrajzolta a kalibrációs görbét, mely alapján kiszámíthatóvá váltak a minták IL-8 koncentrációinak (pg/ml) meghatározása.

3.7 Statisztikai módszerek

Kísérleteim során kapott adatok statisztikai kiértékelésére szükség volt. Microsoft Excel 2007 programot használtam fel. Átlag, szórás képleteket alkalmaztam, melyet a program a kijelölt adatok alapján kiszámolt. A kapott átlag eredményeket oszlop diagram rajzolásával szemléltettem a szórás nagyságát feltűntetve rajta. Az eredmények további kiértékeléséhez R 2.11.1 (2010) szoftvert alkalmaztam. Az átlagok közötti különbségek egyutas ANOVA-val kerültek kiértékelésre post-hoc Tukey teszttel, ha az adatok normal eloszlásúak és a varianciák homogének voltak vagy Kruskal-Wallis nemparaméteres tesztet használtam. A $p < 0.05$ szignifikáns különbséget jelzett.

4. EREDMÉNYEK

4.1 A citotoxicitás vizsgálata

Neutral red módszerrel azt vizsgáltam, hogy a különböző koncentrációkban adott LPS és probiotikumok milyen mértékben befolyásolják a sejtek életképességét. Minél több sejt maradt életben, annál több sejt vett fel NR-t, így végül a destain oldat hatására nagyobb mennyiségű NR-t is adtak le a sejtek.

3. táblázat: Kontroll százalékában kifejezve az abszorbancia értékek (3 párhuzamos mérés átlag és szórás eredményei) Az LPS hatást önmagában, a baktériumok tápfolyadékának hatását (*L. plantarum* 2142 DeMan, Rogosa, Sharpe /MRS/, *B. licheniformis* Luria Bertani /LB/, *B. amyloliquefaciens*nek Tryptone Soya Broth /TSB/), valamint az LPS + a baktériumok tenyésztése sejtmentes felülúszójának (SCS) együttes hatását ismerteti a sejtek életképességére:

	LPS 1 µg/ml	LPS 10 µg/ml	MRS 13,3%	LB 2,5%	LB 5%	LB 13,3%	TSB 2,5%	TSB 5%
átlag	1,022843	1,088832	1,11928	1,385787	1,26395	0,8680	1,86802	1,4390
szórás	0,278344	0,392631	0,25787	0,169577	0,18274	0,2270	0,52007	0,4737

	TSB 13.3%	B.licheni 2.5%	B.licheni 5%	1 µg/ml LPS+ B.licheni 2.5%	1 µg/ml LPS+ B. licheni 5%
átlag	1,337563	1,335025	2,124365	1,073604	0,616751
szórás	0,939494	0,136491	0,493281	0,177429	0,054907

	B.licheni 13,3%	10 µg/ml LPS+ B. amylo 2.5%	10 µg/ml LPS+ B. amylo 5%	10 µg/ml LPS+ B. amylo 13.3%	1 µg/ml LPS+ B.amylo 5%
átlag	0,93401	1,040609	1,048223	0,63198	0,893401
szórás	0,076269	0,035169	0,072368	0,020145	0,175678

	1 µg/ml LPS+ B. amylo 13.3%	1 µg/ml LPS+ B. licheni 13.3%	10 µg/ml LPS+ B. licheni 2.5%	10 µg/ml LPS+ LB 5%	10 µg/ml LPS+ LB 13.3%	10 µg/ml LPS+ 13.3%TSB
átlag	0,901015	0,601523	0,57868	1,263959	0,870558	1,246193
szórás	0,057149	0,073429	0,217905	0,139778	0,398008	0,380812

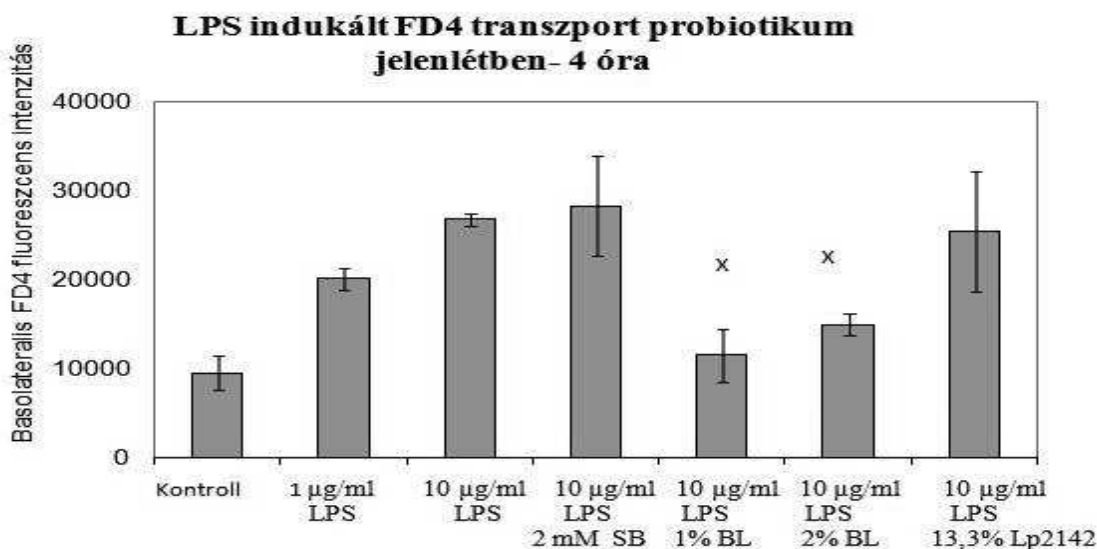
Ahhoz, hogy védőhatást mutassunk ki 1,1-nél nagyobb számot kell kapni (vagyis az LPS kezelésnél kapott nagyobb számot), ha ennél kisebb számot kapunk, akkor az LPS kezelés

hatására kialakuló sejthalál megelőzésében a probiotikumoknak nem volt szerepe, nincs szignifikáns védőhatása. A magasabb szám azt mutatja, hogy több sejt maradt életben, az adott kezelés jótékonyan befolyásolta a sejtek életképességét. Az 1 és 10 µg/ml LPS-sel kezelt sejtekből kapott adatok a kontrollal csaknem megegyező számot mutatnak (1 µg/ml LPS: 1,022; 10 µg/ml LPS: 1,088), így levonható következtetésként, hogy nem okoznak az alkalmazott LPS koncentrációk sejthalált. *B. licheniformis* magas dózisban 1 és 10 µg/ml LPS-sel adva toxikus a sejtekre (eredmények: 0,5-0,6), azonban alacsony dózisban védőhatása van LPS indukálta sejtkárosítással szemben (3. táblázat).

4.2. LPS és a probiotikumok hatásának vizsgálata TER és FD4 átjutás mérésével

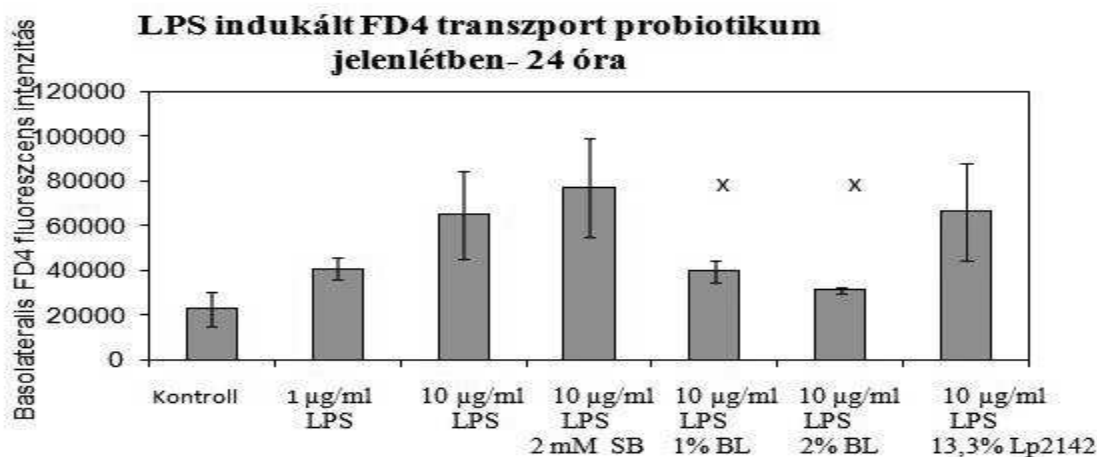
A kalibrációs görbe elkészítéséhez az apikális térben alkalmazott különböző FD4 koncentrációk az alábbiak voltak: 0,02; 0,015; 0,01; 0,005; 0,002; 0,001; 0,0005; 0,0002; 0,0001 mg/ml. A bazolaterális térbe átjutott FD4 koncentrációkat fluorimetriás mérés után megrajzolt kalibrációs görbe segítségével lehet meghatározni, melynek egyenletei: $y = 2E+07x + 32,23$ és $R^2 = 0,999$

Védőhatást vizsgálatam 1 µg/ml koncentrációban apikálisan adott FD4 átjutás és TER mérésel. A 2. táblázat alapján elvégzett sejt kezeléseket során 4 és 24 óra inkubációs időt követően FD4 átjutást, továbbá 2,4 és 24 óra inkubációt követően TER értéket mértem.



3. ábra: 4 órás inkubáció után a bazolaterális térből vett minta fluorimetriás mérésének eredményei. SB= nátrium-n-butirát; BL= *B. licheniformis*; Lp2142= *L. plantarum* 2142; * szignifikáns eltérés a pozitív kontrollhoz képest ($p < 0.05$)

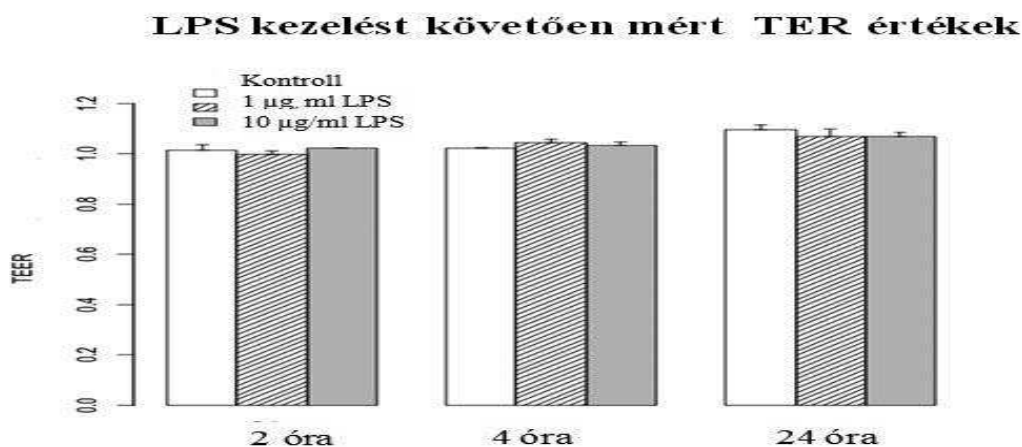
1 és 10 µg/ml LPS kezelés nem szignifikáns mértékben növelte FD4 jelzőmolekula paracelluláris átjutását. Az alkalmazott probiotikumok közül szignifikáns védőhatás ($p < 0,05$) az 1 és 2% *B. licheniformis* SCS esetében tapasztalható magas LPS koncentrációval szemben is (3. ábra).



4. ábra: 24 órás inkubáció után a bazolaterális térből vett minta fluorimetriás mérésének eredményei. SB= nátrium-*n*-butirátnak; BL= *B. licheniformis*; Lp2142= *L. plantarum* 2142; * szignifikáns eltérés a pozitív kontrollhoz képest ($p < 0,05$)

Az eredmények azt igazolták, hogy a nátrium-*n*-butirátnak 10 µg/ml LPS kezelés esetén védőhatása 4 órán és 24 órán sem mutatható ki szignifikánsan, azonban a *Bacillus licheniformis* már 1%-os koncentrációban is védőhatással rendelkezik. A *Lactobacillus plantarum* 2142 védőhatása nem szignifikáns (3. és 4. ábra).

A sejtek 1 és 10 µg/ml LPS-sel való apikális inkubációja során TER értékeket mértem a kezelés előtt, majd a kezelést követő 2, 4 és 24 órában.



5. ábra: IPEC-J2 sejtek 1 és 10 µg/ml LPS kezelését követően mért TER értékek 2,4,24 órában. Szignifikáns különbség nincs a LPS kezelést nem kapott kontroll monolayeren mért értékekhez képest ($p > 0,05$)

A TER értékekben szignifikáns változás nem következett, az LPS koncentrációtól függetlenül sem bontja meg az IPEC-J2 sejtek integritását (**5. ábra**). LPS fentebb leírt paracelluláris permeabilitást növelő hatását, így nem a TJ károsításával, a monolayer integritásának megbontásával éri el vizsgálataim szerint.

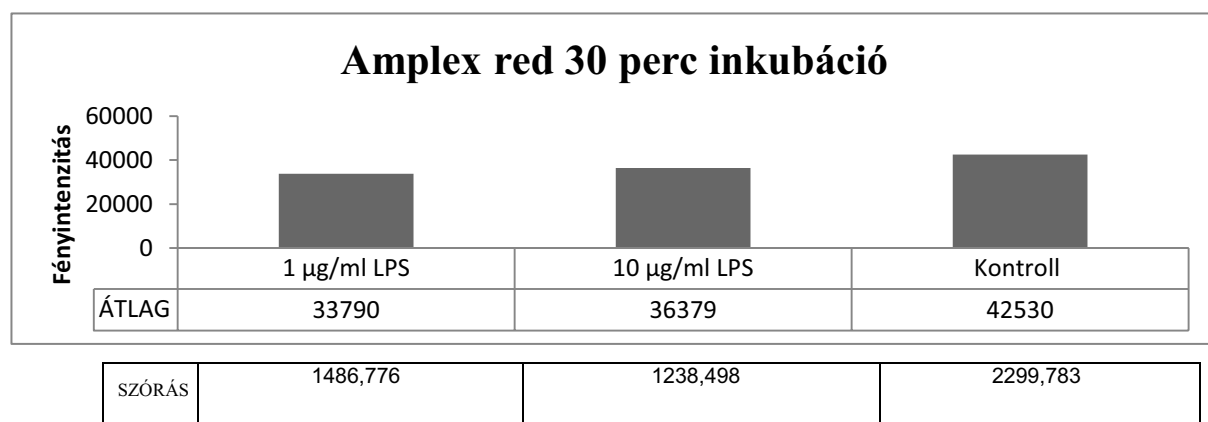
4.3 LPS által produkált H₂O₂ meghatározás

Vizsgáltam, hogy az IPEC-J2 sejtvonalhoz adott 1 és 10 µg/ml LPS oxidatív stresszt képes-e indukálni az epiteliális sejtekben. A legstabilabb ROS a hidrogén-peroxid, melynek kvantitatív mérésére Amplex red reakciót alkalmaztam, amely a biológiai mintákban található, már rendkívül kis koncentrációban is előforduló hidrogén-peroxid mennyiségi mérésére ad lehetőséget peroxidáz jelenlétében. A hidrogén-peroxidot nem tudjuk közvetlen mérni, a reakció folyamán azonban az Amplex red-ből egy fluoreszcens anyag (resorufin) keletkezik, melynek fluoreszcens fénykibocsátásának intenzitása meghatározható.

Kalibrációs görbét készítettem az alábbi hidrogén-peroxid koncentrációkkal (µg/ml): 0; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5. A megrajzolt H₂O₂ kalibrációs görbe egyenletei: $y = 44773x + 3321$; $R^2 = 0,998$. Ezek alapján a biológiai minták vizsgálata során kapott fluoreszcens fényintenzitásokhoz a kalibrációs görbe alapján hidrogén-peroxid koncentrációt tudunk rendelni, így az esetlegesen előidézett oxidatív stressz kvantitatívan is vizsgálható.

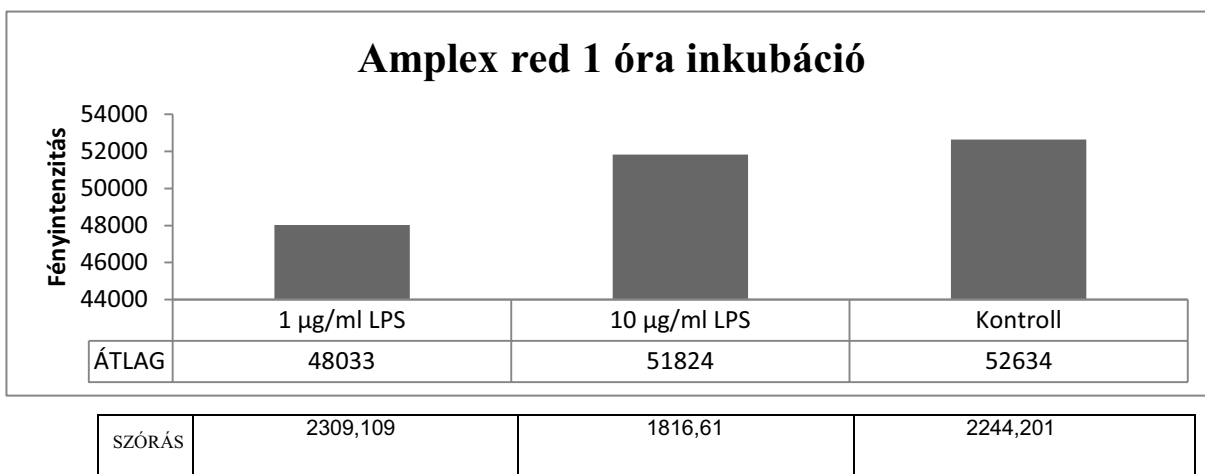
3. táblázat: A 30 és 60 perces LPS inkubációt megelőzően mért fluoreszcens fényintenzitás átlagok és szórás értékek

Kiindulási fluoreszcens intenzitás értékek			
	1 µg/ml LPS	10 µg/ml LPS	Kontroll
átlag	21116	22472	22497
szórás	1064,5	445,42	577,7



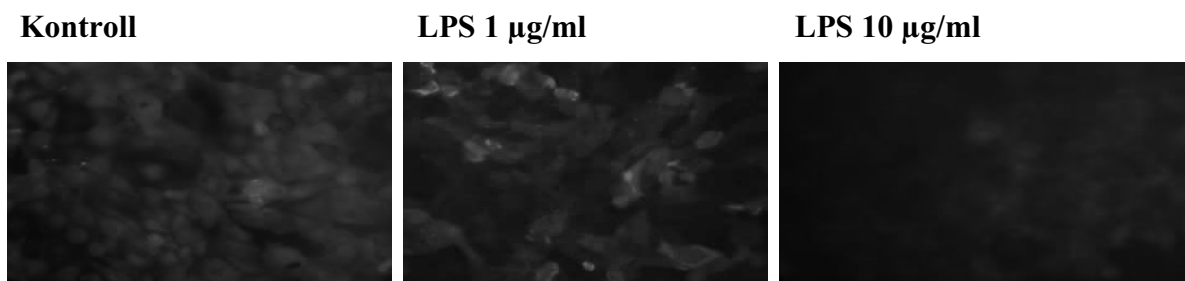
6. ábra: Amplex red reakció során 1 és 10 µg/ml LPS-sel kezelt IPEC-J2 sejtek bazolaterális terében mérhető minták fluoreszcens fényintenzitás értékei 30 perc inkubációs idő után. A fluoreszcens érték a kalibrációs görbe alapján megfeleltethető egy H₂O₂ értéknek.

30 perces inkubáció után a bazolaterális kompartmentből vett minták fluoreszcens fényintenzitás mérét végeztem el. A kapott eredmények nem mutatnak szignifikáns különbséget a kontroll és az LPS-sel kezelt sejtek között, így 30 perc után szignifikáns nagyságú H₂O₂ produkció nem detektálható a bélhámsejtekben (6.ábra).



7. ábra: Amplex red reakció során 1 és 10 µg/ml LPS-sel kezelt IPEC-J2 sejtek bazolaterális terében mérhető minták fluoreszcens fényintenzitás értékei 60 perc inkubációs idő után. A fluoreszcens érték a kalibrációs görbe alapján megfeleltethető egy H₂O₂ értéknek.

Az eredmények alapján kijelenthető, hogy a lipopoliszacharid ROS termelődését nem váltotta ki 1 óra inkubáció után sem (7.ábra). Amplex red kísérletünk arra világított rá, hogy még 10 µg/ml LPS koncentráció sem okozott ROS termelődést IPEC-J2 sejtvonalon.



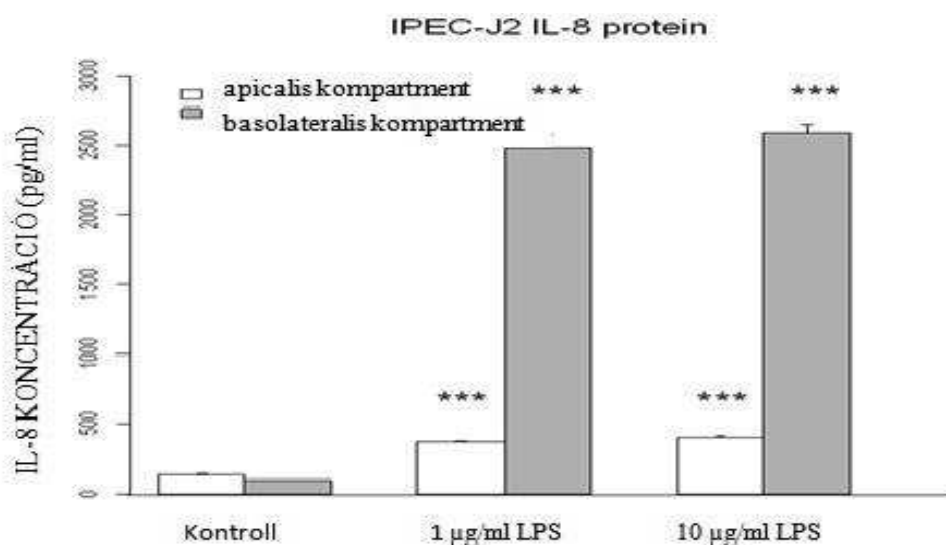
8. ábra: Fluoreszcens mikroszkóppal (Olympus CKx41, U-RFLT50) készült képek alapján az Amplex red módszer festékmolekula intracelluláris elhelyeződést mutatott, így a sejten belüli H₂O₂ képződés is tanulmányozható vált. Az LPS és a kontroll képminták között nem detektálható eltérés..

4.4 IPEC-J2 sejtvonal IL-8 termelésének meghatározása szendvics-ELISA módszer segítségével

LPS kezelés hatására pro-inflammatorikus citokinek (IL-8, TNF-α) génexpressziójának up-regulációja következik be, mely ezen citokinek megnövekedett termeléséhez vezet az epiteliális sejtrétegben [10]. A pro-inflammatorikus citokinek szintjének alakulása meghatározó fontosságú a nagymértékű szöveti károsodás megelőzése céljából végzett vizsgálataink során, mivel az immunrendszer sejtjeinek (granulociták, makrofágok, limfociták) migrációját és aktivitását befolyásolják. A probiotikumok gyulladáscsökkentő

hatásának vizsgálatához a *L. plantarum* 2142 sejtmentes felülúzó és a baktériumok által termelt nátrium-*n*-butirát (SB) hatását vizsgáltam. Pontos gyulladáscsökkentő hatásmechanizmusuk nem ismert, így azt vizsgáltam, hogy az LPS hatás miatt emelkedett mennyiségben mérhető IL-8 termelését képesek-e szignifikáns mértékben mérsékelni.

IPEC-J2 sejtek egy órán át voltak apikálisan kezelve a vizsgálni kívánt anyagokkal 6-lukú poliészter membrán inzerten. Első kísérletben az IL-8 termelésének LPS koncentrációtól való függését vizsgáltam 1 és 10 µg/ml LPS koncentrációt alkalmazva, arra voltam kíváncsi, hogy a magasabb LPS koncentráció magasabb IL-8 termelődést vált-e ki. A monolayer apikális és bazolaterális kompartmentjének vizsgálata során azt akartam kideríteni, hogy a bélhámsejtek hova választják ki a termelt gyulladáscsökkentő citokint.



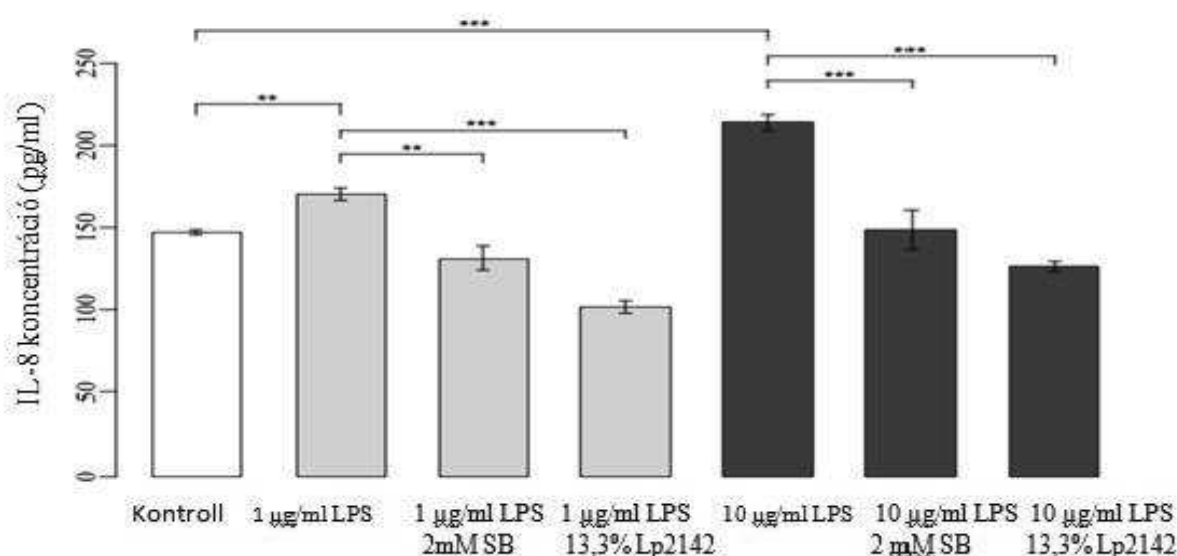
9. ábra: 1 és 10 µg/ml LPS 1 órás inkubáció után az apikális és basolateralis kompartmentben mérhető IL-8 koncentrációja szendvics ELISA módszerrel. xxx jelzés a kapott eredmény szignifikánsan ($p < 0,001$) növekedett értékeit mutatja.

A kontroll által termelt alacsony koncentrációjú IL-8 közel azonos mennyiségben mérhető mindkét kompartmentben, mely azt mutatja, hogy fiziológiai körülmények között a bélhámsejtek alacsony szintű alap citokin termelése apikálisan és bazolaterálisan egyensúlyban van. Az LPS kezelés hatására kapott IL-8 koncentrációk szignifikáns növekedést mutattak mindkét kompartmentben ($p < 0,001$) 1 és 10 µg/ml koncentrációkban, azonban a bazolaterális régióból vett mintában nagyságrendekkel több citokin koncentráció volt mérhető, mely jelzi, hogy a bélhámsejtek főleg ebbe a térségbe szekretálják az IL-8-at (*in vivo* az apikális térség a bél lumenének felel meg). Az 1 és 10 µg/ml LPS hatására arányosan, de ugyanakkora mértékben nőtt meg az IL-8 mennyisége (**9.ábra**).

Az fent kapott eredmények után a probiotikumok gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata során az IL-8 mennyiségének mérését csupán a bazolaterális térben végeztem,

hiszen a bélsejtek általam bizonyított módon ebbe a kompartmentbe szekretálják nagyságrendekkel magasabb mennyiségben a gyulladáscsökkentő citokint.

IL-8 koncentráció LPS és probiotikum kezelés



10. ábra: 1 és 10 µg/ml LPS kezelés szignifikáns IL-8 termelést váltott ki IPEC-J2 sejtvonalban. Gyulladáscsökkentő hatása szignifikáns mindkét alkalmazott LPS koncentrációval szemben a *L. plantarum* 2142-nek és a nátrium-*n*-butirátnak. SB= nátrium-*n*-butirát, Lp 2142= *L. plantarum* 2142. . xx = p<0,05, xxx = p<0,001

A probiotikumok gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálatában a kapott eredmények azt mutatják, hogy 1 és 10 µg/ml LPS hatására az IPEC-J2 sejtek szignifikáns mértékben (xx = p<0,05, xxx = p<0,001) emelkedett IL-8 termelést mutattak a kontrollhoz képest. Az alkalmazott nátrium-*n*-butirát és *L. plantarum* 2142 szignifikáns védőhatást mutatott 1 és 10 µg/ml LPS kezeléssel szemben. 1 µg/ml LPS hatására emelkedett IL-8 termelődést a *L. plantarum* 2142 sejtmentes felülúszó nagyobb mértékben volt képes csökkenteni, mint a nátrium-*n*-butirát, és ez a tendencia a 10 µg/ml LPS kezelés esetében is megegyezik, azonban a két védőhatás eltérés közötti különbség az LPS koncentráció emelkedésével csökkenést mutatott (**10. ábra**).

5. Megbeszélés

Bakteriális megbetegedések elleni védekezés elsődleges szerei az antibiotikumok. Humán- és állatgyógyászatban fokozódó tudatos antibiotikum használat érdekében azonban az élelmiszer-termelő állatoknak az Európai Unióban hozamfokozás céljából antibiotikumot adni tilos. Az élelmiszer-termelő állatoknak szubterápiás dózisban adott antibiotikumok bár fokozták napi súlygyarapodást és a takarmány hasznosítást, azonban a rezisztencia kialakítása révén az antibiotikumok terápiás értékét csökkentették. Tiltás után a termelési mutatók visszaestek, a fellépő gazdasági és állategészségügyi károk miatt az antibiotikumok alternatívái (probiotikumok, szerves savak stb.) iránti igény fokozottan jelentkezett.

Kísérleteim során a bélbeli folyamatok modellezésére sertés bélhámsejt vonalat (IPEC-J2) használtam. Az állatokat érő bakteriális fertőzés sejtszintű modellezése céljából Gram negatív baktérium (*Salmonella enterica ser. Typhimurium*) endotoxinját (LPS) alkalmaztam. Az LPS kiváltotta cellularis válaszok súlyosságának mértékét probiotikumokkal (*Lactobacillus plantarum* 2142 /Institute of Dairy Microbiology, Agricultural Faculty of Perugia University, Perugia, Italy/, *Bacillus licheniformis* CECT 4536, *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 /Norel Animal Nutrition, Madrid, Spain/) és szerves savval (nátrium-*n*-butiráttal), mint lehetséges antibiotikum alternatívákkal igyekeztem módosítani.

Kutatásaim során az LPS hatásmechanizmusát vizsgáltam IPEC-J2 sejteken. Mértem a paracellularis permeabilitást, a ROS (hidrogén-peroxid) képződést és az interleukin (IL-8) termelést. A paracelluláris permeabilitás mértékét az enterociták közötti TJ-k szabályozzák. Fiziológias körülmények között az apikális és bazolaterális teret a TJ fehérjék választják el, melyek kontrollálják az ionok és nem-ionos hidrofil anyagok átjutását a bélhámon. A TER mérése az ion permeabilitás, míg a fluoreszcein-isotiocianát 4kDa-dextran (FD4) átjutás a nem-ionos hidrofil anyagok paracelluláris transzportjának mérésére szolgál. Eredményeim szerint LPS az alkalmazott koncentrációban a sejtek integritását nem befolyásolta, a TER értéke LPS kezelés során nem módosult, azonban a paracelluláris permeabilitást jelentősen fokozódott, amit az FD4 transzport növekedése mutatott. Így az LPS a bélnyálkahártya barrier funkcióját rontva lehetővé teszi a nem-ionos hidrofil anyagok paracelluláris átjutását a bélhámsejtek által kialakított gáton, melynek nagy szerepe lehet hasmenést okozó fertőzésekben.

A jelenlegi tudásunk szerint TJ fehérjék által szabályozott paracelluláris gát két fiziológiai összetevőből áll: a 4 Å sugarú, töltés szelektív, kis pórusokon átvezető útból és egy második úgynevezett „nonpore” útból, amely töltéssel nem rendelkező nagyobb molekulákat átjárhatóságát biztosítja. Az első utat a claudin expressziós mintázata befolyásolja, a másodikat valószínűleg különböző fehérjék és jelátvittelek vezérlik [87]. A töltéssel

rendelkező és töltéssel nem rendelkező molekulák paracellularis átjutása nem függ össze egymással. Ugyanabban a szövetben igen magas oldott anyag átjutás mellett (nagy FD4 permeabilitás) az ionok átjutása igen alacsony lehet (magas TER) [88]. A proinflammatorikus citokinek az oldott anyagok átjutását a folyamatos TJ kapcsolatok károsodása nélkül fokozhatják, ami a „nonpore” út jelentőségére utal [89]. Ez a folyamat a gyulladásos bélbetegségek korai patogenezisében lényeges szerepet játszhat.

Az oxidatív stressz számos betegségben szerepel hajlamosító és oktani tényezőként. Gyógyszertani és Méregtani Tanszék korábbi kutatásai részleteiben térképezte fel a hidrogén-peroxid által kiváltott oxidatív stressz folyamatát *in vitro* bélhámsejteket. Kutatásom során azt az eredményt kaptam, hogy az LPS nem okoz a bélhámsejtekben emelkedett ROS termelést, nem alakul ki oxidatív stressz, de gyulladásos citokinek emelkedett produkciója azt mutatja, hogy Gram negatív baktérium sejtfal alkotó gyulladást provokál a bélepitélum sejtjeiben. Mindezek fényében a probiotikumok gyakran merülnek fel megfelelő alternatívájaként a hozamfokozó antibiotikumoknak. Az emésztőrendszer gyulladásainak csökkentésének a probiotikum az egyik terápiás eszköze lehet, emésztési folyamatok javítása és bélflóra stabilizáló hatása révén. Bár terápiás alkalmazásban gyulladáscsökkentő hatásuk igazolt a humán és állatgyógyászati terápiában, pontos hatásmechanizmus még nem ismert. Munkám során bebizonyítottam, hogy az LPS által kiváltott emelt szinten termelődő akut gyulladásos citokin, az IL-8 mennyiségének down-regulációja révén gyulladáscsökkentő és védőhatással rendelkeznek a probiotikum sejtmentes felülúszók bélgyulladásokban. Kutatásom során a *L. plantarum* 2142 sejtmentes felülúszójának gyulladást csökkentő hatását igazoltam az LPS-által kiváltott gyulladásos folyamatokban.

Az a tény, hogy baktérium sejttől mentes felülúszónak védő és gyulladáskeltő hatása van, feltételezi, hogy a baktériumok olyan aktív komponenseket termelnek, melyek a probiotikumok jótékony hatását biztosítják. Az aktív komponens izolálása lehetőséget nyitna bélgyulladásokban ennek az összetevőnek gyógykészítményként történő alkalmazására. Általam kiválasztott és vizsgált aktív komponens a nátrium-*n*-butirát volt, melyet a probiotikumok a gazda által nem emészthető szénhidrátok fermentációja során keletkezik. Az LPS okozta fokozódó paracelluláris permeabilitás vizsgálatban az eredmények nem mutattak szignifikáns védőhatást, azonban a kialakuló gyulladásos folyamatokat szignifikáns mértékben volt képes mérsékelni a nátrium-*n*-butirát.

6. Összefoglalás

A probiotikumok hozamfokozóként történő felhasználásának előnyeit már számos esetben igazolták. Kísérleti munkám célja egy olyan *in vitro* teszrendszer kifejlesztése volt, mely alkalmas a Gram negatív baktérium sejtfal alkotó LPS kezelés által előidézett gyulladós folyamatok sejt szintű hatásának folyamatos követésére, és a probiotikum baktériumok anyagcsere termékeinek potenciális gyulladáscsökkentő hatásának tanulmányozására. A vékonybélben lejátszódó komplex interakciók modellezésére poliészter membrán inzerten tenyésztett IPEC-J2 sejt vonalat alkalmaztam, amely újszülött, kolosztrumot nem kapott sertés jejunumából származik.

Citotoxicitás tesztet végeztem, vizsgálva a felhasznált probiotikumok sejtmentes felülűszóinak és az alkalmazott LPS koncentrációktól függő toxikus hatását. A sejtek életképességének vizsgálata során úgy találtam, hogy az 1 és 10 µg/ml LPS nem citotoxikus a sejtekre. A *B. licheniformis* magas koncentrációban (5 és 13,3%) erősen toxikus a sejtekre, azonban védőhatással rendelkezik 2,5%-os koncentrációban 1 µg/ml LPS kezeléssel szemben.

Az LPS kezelés hatását a sejtréteg integritására TER és FD4 átjutás méréssel vizsgáltam. *Lactobacillus plantarum* 2142, *Bacillus licheniformis* CECT4536, *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 probiotikumok sejtmentes felülűszójának valamint nátrium-n-butirátnak védőhatását vizsgáltam. Azt tanulmányoztam, hogy az 1 és 10 µg/ml koncentrációjú LPS kezelés hatására kialakuló paracelluláris permeabilitás fokozódást mely probiotikum baktérium sejtmentes felülűszók képesek mérsékelni szignifikáns mértékben. Kutatásom során azt találtam, hogy a *B. licheniformis* rendelkezik akár már 1%-os koncentrációban is védőhatással. A TER értékek mérésekor arra a következtetésre jutottam, hogy az 1 és 10 µg/ml LPS kezelés nem okoz rezisztencia érték változást.

A ROS termelődésének mértékét az LPS által kiváltott gyulladós folyamatban Amplex-red alapú fluorimetriás méréssel követtem nyomon. A kapott eredmények alapján kijelenthető, hogy még 10 µg/ml LPS sem okoz emelkedett H₂O₂ termelődést IPEC-J2 sejt vonalon, oxidatív stressz nem alakul ki LPS hatására bélhámsejtekben.

Gyulladós citokin vizsgálatok közül az IL-8 szintet mértem apikális és bazolaterális kompartmentben szendvics ELISA teszt segítségével. Kísérleteim bebizonyították, hogy már 1 µg/ml LPS kezelés is szignifikáns IL-8 termelést vált ki mindkét vizsgált kompartmentben. Probiotikumok gyulladáskeltő hatásának vizsgálatakor azt találtam, hogy a nátrium-butirát és a *L. plantarum* 2142 1 és 10 µg/ml LPS kezelés által kiváltott megnövekedett IL-8 termelést is szignifikánsan képes volt csökkenteni az enterocitákban.

7. Summary

Advantages of probiotics' application as growth-promoters have been proven in several cases. Underlying mechanisms behind beneficial effects of probiotics in the prevention and treatment of enteric infections have not been fully revealed. The aim of the study was the development of *in vitro* test system which is suitable for tracing inflammatory processes triggered by the Gram negative cell wall component, lipopolysaccharide (LPS) treatment and investigation of potential anti-inflammatory effect of probiotics and their metabolites at cellular level. To model complex interactions occurring in small intestine IPEC-J2 cell monolayer derived from newborn unsuckled piglet's jejunum was cultured on polyester membrane insert.

In cytotoxicity assay my aim was to determine the toxic effect of the spent culture supernatant and lipopolysaccharide. I revealed that LPS did not cause cell death in neither 1 nor 10 µg/ml concentration, however *B. licheniformis* showed high cytotoxic effect in 5 and 13,3% but cell preventive effect in low dose.

The effect of LPS treatment on the cell monolayer's integrity was followed by measurement of transepithelial electrical resistance and assessment of apico-basolateral transport of fluorescein isothiocyanate labelled dextran (FD4). To investigate the protective impact of probiotics against LPS-triggered cellular damage I used *L. plantarum* 2142, *B. licheniformis* CECT 4536, *B. amyloliquefaciens* CECT 4940 SCS and sodium-butyrate. According to my results low dose *Bacillus licheniformis* CECT 4536 SCS could decrease FD4 transport by the strengthening of intestinal monolayer integrity .

The formation of reactive oxygen species in LPS triggered inflammatory processes was detected by Amplex-red based fluorimetric measurements. My results revealed neither 1 nor 10 µg/ml LPS treatment provoked increased level of H₂O₂ production in IPEC-J2 cells, LPS did not induced oxidative stress in intestinal cells.

My further aim was to investigate LPS induced inflammation using ELISA method by determining elevated IL-8 production in apico-basolateral compartment. My results showed increased IL-8 concentration in both compartment after 1 and 10 µg/ml LPS treatment. SCS of Lp 2142 and sodium-butyrate showed anti-inflammatory effect by significantly decreasing the level of IL-8 production after LPS treatment.

8. Hivatkozások

- [1] Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect European Commission - IP/05/1687, 22/12/2005, URL: http://europa.eu/rapid/press-release_IP-05-1687_en.htm, Brussels, 22 December 2005
- [2] DIBNER J. et al.: Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action, *Poultry Science*, 2005 Apr. , Vol. 84, P: 634-643
- [3] CORR S. C. et al.: Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, Vol. 104, P: 7617-7621
- [4] SÖGAARD H. et al.: Microbials for feed: beyond lactic acid bacteria, *Feed International* , 1990, Vol. 11, P: 32-34, 36-38
- [5] GALDEANO, C. M. et al.: Lactic Acid Bacteria as Immunomodulators of the Gut-Associated Immune System. In: Mozzi, F. et al.: *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Iowa, Wiley-Blackwell, 2010, P: 125-137
- [6] KARCZEWSKI, J. et al.: Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier, *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*, 2010, Vol. 298, P: 851-859
- [7] PELICANO et al.: Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth promoters, *Revista Brasileira de Ciencia Avicola*, 2005 Dec, Vol. 7(4)
- [8] GUNAL M. et al.: The effect of antibiotic growth promoter, probiotic or organic acid supplementation on performance. Intestinal microflora and tissue of broilers, *International Journal of Poultry Science*, 2006, Vol. 5, P: 149-155
- [9] WILLIAM H. CLOSE et al.: Producing Pigs without Antibiotic Growth Promoters, *Advances in Pork Production* , 2000, Vol. 11, P: 47
- [10] PANG G. et al.: GM-CSF, IL-1 α , IL- β , IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 gene expression and cytokine production in human duodenal fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide, IL-1 α and TNF- α , *Clinical & Experimental Immunology*, 1994, Vol. 96, P: 437-443
- [11] MADARA JL. et al.: Structure and function of the intestinal epithelial barrier in health and disease. *Monographs in Pathology*, 1990, Vol. 31, P: 306-324
- [12] HALLIWELL, B. et al. : Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine*, 1991, Vol. 91, P: 14-22
- [13] Állatorvosi Járványtan 1. : szerk Tuboly Sándor
- [14] HEUMANN D. et al.: Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clinica Chimica Acta*, 2002 Sep, Vol. 323(1-2), P: 59-72
- [15] CHRISTMAS P. et al.: Toll-Like Receptors: Sensors that Detect Infection, *Nature Education*, 2010, Vol. 3(9), P: 85
- [16] WANG YH et al.: TNF α induced IL-8 production through p38 MAPK- NF- κ B pathway in human hepatocellular carcinoma cells *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2011 Dec, Vol. 19(12), P: 912-916
- [17] BERSCHNEIDER, H. M. et al.: Abstract of the Annual Meeting of the American Gastroenterological Association. Digestive Disease Week and the 90th annual meeting of the *American Gastroenterological Association*, Washington D.C., 1989. Washington: Elsevier, 1989, P:774
- [18] SCHIERACK, P. et al.: Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochemistry and Cell Biology*, 2006, Vol. 125, P: 293-305

- [19] SKJOLAAS, K. A. et al.: Effects of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, or serovar Choleraesuis, *Lactobacillus reuteri* and *Bacillus licheniformis* on chemokine and cytokine expression in the swine jejunal epithelial cell line, IPEC-J2. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2007, Vol. 115, P: 299-308
- [20]. ARCE, C. et al.: Innate immune activation of swine intestinal epithelial cell lines (IPEC-J2 and IPI-21) in response to LPS from *Salmonella typhimurium*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2010, Vol. 33(2), P: 161-174
- [21]. JOHNSON, A. M. et al.: Disruption of transepithelial resistance by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Veterinary microbiology*, 2010, Vol. 141, P: 115-119
- [22] BALDA M.S. et al.: Functional Dissociation of Paracellular Permeability and Transepithelial Electrical Resistance and Disruption of the Apical-Basolateral Intramembrane Diffusion Barrier by Expression of a Mutant Tight Junction Membrane Protein *The Journal of Cell Biology*, August 1996, Vol. 134, P: 1031-1049
- [23] OHLAND C.L. et al.: Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function, *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, June 2010, Vol. 298, P: 807-819
- [24] GONZÁLEZ et al.: Tight junction proteins, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2003, Vol. 81(1), P:1-44
- [25] REYES et al.: The renal segmental distribution of claudins changes with development, *Kidney Int.*, 2002, Vol. 62(2), P: 476-487
- [26] INAI T. et al.: Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells, *European Journal of Cell Biology*, 1999, Vol. 78(12), P: 849-855
- [27] SETH A. et al.: Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism, *Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2008, Vol. 294, P: 1060-1069
- [28] BUCHERT M. et al.: Methods to examine tight junction physiology in cancer stem cells: TEER, paracellular permeability, and dilution potential measurements. *Stem Cell Rev.*, 2012 Sep, Vol. 8(3), P: 1030-1034
- [29] CENCIC A. et al.: Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology — A review *International Journal of Food Microbiology*, 2010, Vol. 141, P: 4-14
- [30] SCHWARZ S. et al.: Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2001 Jun, Vol. 17(6), P:431-437
- [31] CASTANON J. I. R. et al.: History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds *Poultry Science*. 2007 Nov, Vol. 86(11), P:2466-2471
- [32] CASEWELL M. et al.: The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003 Aug, Vol. 52(2), P: 159-161
- [33] PHILLIPS I. et al.: Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2004, Vol. 53, P: 28–52
- [34] GUARRER F. et al.: The intestinal flora in inflammatory bowel disease: normal or abnormal?, *Annual review of immunology*, 2005, Vol. 21(4), P: 414-418
- [35] KASER A. et al.: Inflammatory bowel disease, *Annual review of immunology*, 2010, Vol. 28, P:573-621

- [36] PENG L. et al.: Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *Journal of Nutrition*, 2009 Sep, Vol. 139(9), P:1619-1625
- [37] HOLZAPFER W. H. et al.: Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 1998 May 26, Vol. 41(2), P: 85-101
- [38] FEATHETSTONE V. et al.: M cells: portals to the mucosal immune system, *Lancet*, 1997, Vol 350(9086), P:1230
- [39] HAMZAOUI N. et al.: Interaction of microorganisms, epithelium, and lymphoid cells of the mucosa-associated lymphoid tissue, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1988, Vol. 859, P: 65-74
- [40] DELCENSERIE V. et al.: Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Current Issues of Molecule Biology*, 2008, Vol. 10(1-2), P: 37-54
- [41] BERER K. et al.: Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination, *Nature*, 2011, Vol. 479(7374), P: 538-541
- [42] HALLER D et al.: Novel mechanisms of microbe-host interaction under conditions of intestinal inflammation, *International Scientific Conference Probiotics and Prebiotics Proceedings*, Kosice Slovakia 2012.
- [43] SCHREZENMEIR J. et al.: Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2001 Feb, Vol. 73(2 Suppl), P : 361-364
- [44] BEZKOROVAINY A et al.: Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2001 Feb, Vol. 73(2 Suppl), P: 399-405
- [45] OUWEHAND et al.: Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2002 Aug, Vol. 82(1-4), P:279-289
- [46] PATTERSON JA et al.: Application of prebiotics and probiotics in poultry production, *Poultry Science*, 2003 Apr, Vol. 82(4), P: 627-631
- [47] YUAN-KUN LEE et al.: The coming of age of probiotics, *Trends in Food Science & Technology*, July 1995, Vol. 6, P: 241-245
- [48] OUWEHAND et al.: Probiotics: How should they be defined? *Trends in Food Science & Technology*, Vol. 10, P:107-110
- [49] SCHREZENMEIR J. et al.: Probiotics prebiotics, and synbiotics--approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2001 Feb, Vol. 73(2 Suppl), P: 361S
- [50] ROBERFROID M.B. et al.: Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *American Journal of Clinical Nutrition*, 2000 Jun, Vol. 71(6 Suppl), P:1682-1687
- [51] MALAGO JJ et al.: Microbial products from probiotic bacteria inhibit Salmonella enteritidis 857-induced IL-8 synthesis in Caco-2 cells. *Folia Microbiology* 2010 Jul, Vol. 55(4), P:401-408
- [52] DAVID R. et al.: Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *American Journal of Physiology*. 1999 Apr, Vol. 276(4 Pt 1), P: 941-950
- [53] RESTA-LENERTS et al.: Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive Escherichia coli, *Gut*. 2003 Jul, Vol 52(7), P: 988-997
- [54] DELCENSERIE V. et al.: Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Current Issues of Molecule Biology* 2008, Vol. 10(1-2), P:37-54
- [55] GROMPONE G. et al.: Anti-inflammatory Lactobacillus rhamnosus CNCM I-3690 strain protects against oxidative stress and increases lifespan in Caenorhabditis elegans. *PLoS One*. 2012, Vol. 7(12), P: 52493

- [56] AIT-BELGNAOUI A. et al.: Prevention of gut leakiness by a probiotic treatment leads to attenuated HPA response to an acute psychological stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2012 Nov, Vol. 37(11), P: 1885-1895
- [57] HASSLÖF P. et al.: Growth inhibition of oral mutans streptococci and candida by commercial probiotic lactobacilli--an in vitro study. *BMC Oral Health*. 2010 Jul , Vol. 2, P: 10-18
- [58] KLINGSPOR S. et al.: Characterization of the effects of *Enterococcus faecium* on intestinal epithelial transport properties in piglets, *Journal of Animal Science*, 2013 Apr, Vol. 91(4), P: 1707-1718
- [59] SALMINEN S. et al.: Demonstration of safety of probiotics - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 1998 Oct 20, Vol. 22(1-2), P:93-106
- [60] ANADÓN A. et al.: Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2006 Jun; Vol. 45(1), P: 91-95
- [61] MATTILA-SANDHOLM et al.: Technological challenges for future probiotic foods, *International Dairy Journal*, 2002, Vol. 12 (3-4), P:173–182
- [62] FINKEL T. et al.: Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing insight. *Nature*, 2000 Nov, Vol. 408, P: 239-247
- [63] VALKO, M. et al.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2007, Vol. 39(1), P: 44-84
- [64] UNO K. et al.: Biomarkers of inflammation and oxidative stress in atherosclerosis. *Biomarkers in Medicine*, 2010 Jun, Vol. 4(3), P: 361-373
- [65] KAMINISKI KA et al.: Oxidative stress and neutrophil activation--the two keystones of ischemia/reperfusion injury, *International Journal of Cardiology*, 2002 Nov, Vol. 86(1), P: 41-59
- [66] YASANARI K. et al.: Oxidative stress in leukocytes is a possible link between blood pressure, blood glucose, and C-reacting protein, *Hypertension* . 2002 Marc, Vol. 39(3), P:777-780
- [67] REZAIE A. et al.: Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause?, *Digestive Diseases and Science*, 2007, Vol. 52, P:2015-2021
- [68] TANDON R. et al.: Oxidative stress and antioxidants status in peptic ulcer and gastric carcinoma, *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2004, Vol. 48, P: 115-118
- [69] LIN M. T. et al.: Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases, *Nature*, 2006, Vol. 443(7113), P: 787-95
- [70] TAKK P. et al.: Rheumatoid arthritis and p53: how oxidative stress might alter the course of inflammatory diseases, *Immunology Today*, 2000, Vol. 21(2), P: 78-82
- [71] HALLOWELL B. et al.: Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease, *American Journal of Medicine*, 1991, Vol. 91(3C), P: 14-22
- [72] FEBS et al. : Mitochondria and cells produce reactive oxygen species in virtual anaerobiosis: relevance to ceramide-induced apoptosis, *FEBS Letters*, 1998, Vol. 430(3), P: 338-342
- [73] DAVIES et al.: Oxidative stress: the paradox of aerobic life, *Biochemical Society Symposia*, 1995, Vol. 61, P: 1-31
- [74] VALKO et al.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2007, Vol. 39, P: 44-84
- [75] MYLONAS C. et al.: Lipid peroxidation and tissue damage, *In Vivo*, 1999, Vol. 13(3), P:295-309
- [76] AKIKO S. et al.: Impact of reactive oxygen species on spontaneous mutagenesis in *Escherichia coli*, *Genes to Cells*, 2006, Vol. 11(7), P: 767–778

- [77] KLAUNIG J.E. et al.: Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis., *Toxicologic Pathology*, 2010 Jan, Vol 38(1), P:96-109.
- [78] DAVIES, K. J. et al.: The Broad Spectrum of Responses to Oxidants in Proliferating Cells: A New Paradigm for Oxidative Stress, *IUBMB Life*, 1999, Vol 48, P: 41-47
- [79] HENSLEY, K. et al.: Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury, *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, Vol 28(10), P:1456-1462
- [80] VILCEK J. et al.: Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics, *Trends in Pharmacological Sciences*, 2004, Vol. 25(4), P: 201-209
- [81] OZAKI K: et al.: Cytokine and Cytokine Receptor Pleiotropy and Redundancy, *The Journal of Biological Chemistry*, August, 2002, Vo.l 277, P: 29355-29358.
- [82] DINARELLO et al.: Proinflammatory cytokines, *Chest*, 2000, Vol. 118, P: 503-508
- [83] DAVID F. et al.: Cytokine and chemokine gene expression of IL-1beta stimulated equine articular chondrocytes, *Veterinary Surgery*, April 2007, Vol. 36(3), P: 221–227
- [84] Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit Catalog no. A22188
- [85].ZHOU M. et al.: A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases, *Analytical Biochemistry*, November 1997, Vol. 253, P: 162–168
- [86] Erzsebet Paszti-Gere et al.: Acute Oxidative Stress Affects IL-8 and TNF- α Expression in IPEC-J2 Porcine Epithelial Cells, *Inflammation*, 2012 Jun, Vo. 35(3), P: 994-1004
- [87] Anderson J. M. et al.: Physiology and Function of the Tight Junction *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2009 August, Vol. 1(2)
- [88] Knipp. et al. 1997: The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2, *Journal of Cell Science*, 1197, Vol. 121, P: 298-305 Biologists 2008
- [89] Watson et al.: Interferon-gamma selectively increases epithelial permeability to large molecules by activating different populations of paracellular pores. *Journal of Cell Science*, 2005, Vol. 118, P: 5221–5230

9. Köszönetnyilvánítás

Szeretném hálásan megköszönni mindazoknak, akik bármilyen szinten segítették a TDK dolgozatomnak az elkészítését. Elsősorban a Gyógyszertani és Méregtani Intézet dolgozóinak akik segítségemre voltak bármikor, erőt, időt, tanácsot és anyagi költségeket nem kímélve, hogy ez a téma minden célkitűzése megválaszolásra kerüljön.

Szeretném megköszönni Palócz Orsolyának és dr. Farkas Orsolyának a szendvics ELISA kísérletben nyújtott önzetlen segítségüket, építő kritikájukat.

Egyik legnagyobb köszönetemet Prof. Dr. Gálfi Péter témavezetőmnek ajánlom a kutatási folyamat vezetésért, és a kísérlethez szükséges feltételek megteremtésért, hiszen ezek nélkül a kutatómunka megfelelő színvonala nem valósulhatott volna meg. Továbbá építő jellegű kritikai és megfigyelései a dolgozattal kapcsolatban hatalmas segítséget nyújtottak.

Családomnak, legközelebbi barátaimnak a sok türelemért, biztatásért, bátorító szavakért a hálám végtelen.

Legutolsó sorban témavezetőmnek Dr. Pásztiné dr. Gere Erzsébetnek jár legnagyobb hálám. Egy egész életre szóló kutatói szemléletre, alázatra és magatartásra tanított, melyet jövőbeli kutató munkám és magánéletem során is kamatoztatni fogok. Kutatási munkám minden aspektusában való segítése és biztatása nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

IPEC-J2 sejtvonala Dr. Jody Goodkin ajándéka volt az intézet számára (Department of Clinical Sciences, Collage of veterinary MEDcine, North Carolina State University).

A kutatás részben a TÁMOP 4.2.2/B-10/1-2010-0011 "A tehetséggondozás és kutatóképzés komplex rendszerének fejlesztése a Szent István Egyetemen" c. pályázat támogatásával valósult meg.