



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

## **Flavonoidok Gyulladáscsökkentő Hatásának Vizsgálata Sertés Vékonybélhám Sejtmodellen**

---

**Készítette**

Balázs Anna

Állatorvos szak, V. évfolyam

**Témavezető**

Dr. Farkas Orsolya

SZIE ÁOTK, tudományos munkatárs

Budapest

2014

# Tartalomjegyzék

<b>1. Bevezetés</b> .....	3
<b>2. Irodalmi áttekintés</b> .....	5
2.1 Flavonoidok .....	5
2.1.1 Szerkezet és csoportosítás .....	5
2.1.2 Jótékony hatások .....	7
2.1.3. Hatásmechanizmus, szerkezet és biológiai aktivitás összefüggései .....	8
2.1.4. Apigenin.....	9
2.2. Metoxiflavonok.....	10
2.2.1. Előfordulás, bioaktivitás .....	10
2.2.2. Gyulladáscsökkentő hatás .....	12
2.2.3. Metoxiflavonok szerkezeten belüli keletkezése.....	12
2.3. A vékonybél.....	13
2.3.1. A bél, mint immunszerv .....	13
2.4. Bélgulladás.....	15
2.4.1. Állatokban előforduló enterális patogének .....	15
2.4.2 Gram negatív baktériumok LPS-komplexe és annak hatásai.....	16
<b>3. Célkitűzések</b> .....	17
<b>4. Anyagok és módszerek</b> .....	18
4.1. IPEC-J2 sejtek tenyésztése .....	18
4.2. Flavonoidok .....	19
4.3. Neutral red citotoxicitási teszt .....	19
4.4. Az IPEC-J2 sejtek kezelése LPS-sel, apigeninnel és trimetoxi-apigeninnel.....	20
4.5. RNS-izolálás .....	21
4.5.1. Homogenizálás .....	21
4.5.2. RNS kivonás .....	21

4.5.3. RNS kicsapás .....	22
4.5.4. RNS mosás .....	22
4.5.5. RNS feloldás .....	22
4.5.6. A mintában maradt DNS emésztése.....	22
4.5.7. RNS futtatás .....	23
4.5.8. OD mérés .....	23
4.6. Az RNS átírása.....	23
4.7. Kvantitatív real-time PCR .....	24
4.8 A célgén relatív expressziójának kiszámítása, statisztikai számítások.....	25
<b>5. Eredmények .....</b>	<b>26</b>
5.1. Neutral red citotoxicitási teszt eredményei.....	26
5.2. Apigenin és trimetoxi-apigenin gyulladáscsökkentő hatása LPS-sel kezelt bélhámsejteken .....	27
5.2.1. Az IL-6 génexpressziójának változása.....	27
5.2.2. Az IL-8 génexpressziójának változása.....	27
5.2.3. A TNF- $\alpha$ génexpressziójának változása.....	28
5.2.4. A COX-2 génexpressziójának változása.....	29
<b>6. Megbeszélés .....</b>	<b>31</b>
<b>7. Összefoglalás .....</b>	<b>33</b>
<b>8. Summary .....</b>	<b>34</b>
<b>9. Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>35</b>
<b>10. Irodalomjegyzék .....</b>	<b>36</b>

# 1. Bevezetés

Különbéféle növényi részeket és az abból készített kivonatokat, főzeteket és teákat évezredek óta hasznosítanak számos kultúra ősi gyógymódjaiban. Az elmúlt évtizedekben az olyan humán egészségügyi problémák, mint például a magas vérnyomás, szívinfarktus, stroke (agyvérzés és agyi érelzáródás) és diabetes egyre magasabb számban fordulnak elő. Ennek hátterében elsősorban a ma már szinte népbetegségnek tekinthető, helytelen táplálkozásra visszavezethető elhízás áll. Ebből adódóan egyre nagyobb figyelmet kap az egészséges életmód, melynek alapja a megfelelő táplálkozás, ami nem csak mennyiségi, hanem minőségi kritériumokat is támaszt az elfogyasztott ételekkel szemben. Optimális táplálkozással támogatjuk szervezetünk immunrendszerét a különböző fertőző ágensekkel szemben, továbbá csökkenthetjük például a szív és érrendszeri problémák, cukorbetegség kialakulásának kockázatát. Az egészséges étrend alapvető részét képezi a zöldségek és gyümölcsök rendszeres, naponta többszöri fogyasztása. A zöldségek és gyümölcsök nem csak magas rost- és vitamintartalmuknak köszönhetően gyakorolnak jótékony hatást a szervezetre, hanem a bennük nagy mennyiségben található polifenolos vegyületek révén is. Ezek közé tartoznak a flavonoidok, melyek antioxidáns aktivitásuk révén csökkentik a szervezetet terhelő oxidatív stressz mértékét. Emellett ismert gyulladáscsökkentő, anti-allergiás, daganatmegelőző, antibakteriális, antivirális és antithromboticus hatásuk is.

A flavonoidok alkalmazása lehetséges a haszonállatok körében, mint alternatív hozamfokozó szerek. Antioxidáns tulajdonságuk révén javulhat az állatok általános immunstátusza; antivirális, antibakteriális és gyulladáscsökkentő hatásuknak köszönhetően pedig a különböző infekciók klinikai megjelenési formája mérséklődhet. Mindezek által a fokozódhat a súlygyarapodás, javulhat a fajlagos takarmány-felhasználás és csökkenhet a különböző megbetegedések miatti elhullások száma, összességében tehát nagyobb hozam érhető el. További előnye a flavonoidoknak, hogy természetes eredetüknél fogva, felhasználásuk nem jelent veszélyt a későbbiekben a fogyasztókra nézve sem, így helyettesíthetik a korábban hozamfokozás céljából felhasznált antibiotikumokat vagy hormonokat (melyek alkalmazása az Európai Unióban 2006. január 1. óta szigorúan tilos).

Másik felhasználási alternatívát jelent – főleg kedvtelésből tartott állatok esetében – a krónikus gyulladások kezelésére történő alkalmazásuk. Ezáltal bizonyos esetekben csökkenthetnék a nem szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerek (NSAID) használatát, így az általuk okozott mellékhatások elkerülhetőek lehetnének. A hosszantartó NSAID terápia

ugyanis ártalmas, mivel a ciklooxygenáz (COX) izoenzimek (COX-1 és COX-2) nem szelektív gátlása következtében megszűnik azok citoprotektív hatása. Ez a gastrointestinalis traktusban (elsősorban a gyomorban és a duodenumban) irritáció kialakulásához, súlyosabb esetben kimaródások, fekélyek létrejöttéhez vezet. Emellett hosszú távú használatuk károsítja a vese vérkeringésének szabályozását, valamint a thrombocyta-aggregáció gátlása miatt megnövekedett vérzékenységhez vezet.

A flavonoidok pontos gyulladáscsökkentő hatásmechanizmusának a megismerése és az állattartásban történő gyakorlati felhasználásuknak a megerősítése érdekében további *in vitro* és *in vivo* végzett vizsgálatokra van szükség.

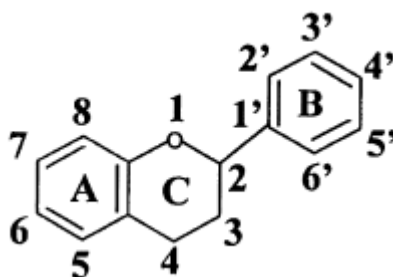
## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1 Flavonoidok

A flavonoidok a polifenolok, azon belül a nem tannin fenolok közé tartozó, alacsony molekulatömegű, rendkívül változatos szerkezeti felépítésű vegyületek. Mára már több mint 4000 flavonoidot azonosítottak, melyek növényekben, elsősorban azok gyökerében, leveleiben, magvaiban, kérgében, virágzatában valamint termésében találhatók meg ( Heim et al., 2002). A növények esetében a flavonoidoknak elsődlegesen biológiai szerepe van az UV – sugárzás, paraziták, különböző pathogének és növényevők elleni védelemben. (Harborne et al., 2000). A humán táplálékok között főleg a zöldségek, gyümölcsök – különösen a citrusfélék –, teák, borok és a kakaó tartalmaz nagyobb koncentrációban különböző flavonoidokat.

#### 2.1.1 Szerkezet és csoportosítás

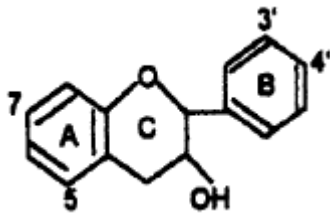
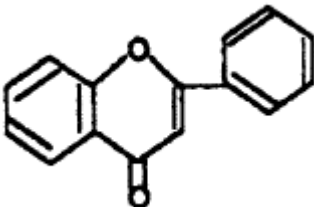
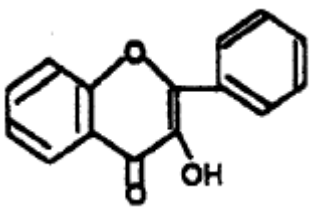
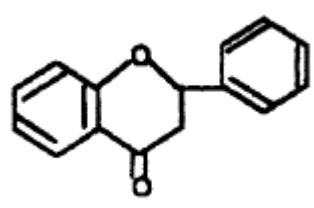
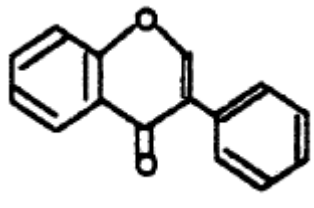
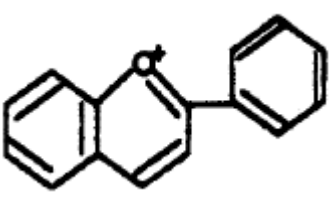
A flavonoidok benzo- $\gamma$ -piron származékok. A változatos kémiai szerkezetű molekulák közös alapja (1. ábra) a három gyűrűből álló flaván váz, ami két fenol és egy pirán gyűrűből áll össze.



1. ábra A flavonoidok molekuláris alapváza és az atomok számozása (Cook et al., 1996)

A vegyületek kémiai felépítése illetve különböző alosztályokba történő relatív orientációja jellemzi a biológiai aktivitásukat és metabolizmusukat. Szubsztituensek sokasága kapcsolódhat a flavonoid gyűrűkhöz, mely különböző alcsoportok kialakulásához vezet. A flavonoidok osztályozása (1. táblázat) a heterociklusos rész oxidáltsági állapota alapján lehetséges. (Rice-Evans et al., 1996)

1. táblázat Flavonoidok csoportosítása, szerkezete (Rice-Evans et al., 1996; Rice Evans et al., 1995 alapján)

Osztály	Általános szerkezet	Flavonoid	Funkciós csoportok	Előfordulás
<i>Flavanol</i>		catechin	3,5,7,3',4'-OH	tea
<i>Flavon</i>		apigenin chrysin	5,7,4'-OH 5,7-OH	petrezselyem gyümölcsbőr
<i>Flavanol</i>		kaempferol quercetin	3,5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH	brokkoli vörösbor
<i>Flavanon</i>		naringin hesperidin	5,4'-OH, 7- rhamnoglükóz 3,5,3'-OH, 4'- OMe, 7- rutinóz	grapefruit narancsfélék
<i>Isoflavon</i>		genistein daidzein	5,4'-OH, 7- glükóz 7,4'-OH	szójabab szójabab
<i>Anthocyanidin</i>		cyanidin	3,5,7,4'-OH, 3,5-OMe	cseresznye

A flavonoidok természetes forrásaikban főleg 3-O-glikozidok és polimerek formájában találhatóak meg (Hammerston et al., 2000). A szervezetbe való bekerülésük után különböző metabolikus folyamatokban hidroxilálódhatnak, metilálódhatnak, szulfatálódhatnak vagy glükuronidálódhatnak. A fentebb látható alapváz polimerizációja során tanninok és egyéb komplex vegyületek jönnek létre, melyek a vörösborsban, szőlőben és a fekete teában fordulnak elő (Cook et al., 1996).

### **2.1.2 Jótékony hatások**

A zöldségek és gyümölcsök rendszeres fogyasztása az egészséges és kiegyensúlyozott táplálkozás alapját képezi, valamint ezáltal csökkenthető a különböző rákos és cardiovascularis megbetegedések kialakulásának esélye is. Ezt a jótékony hatást régebben a  $\beta$ -karotinnak és az aszkorbátoknak tulajdonították, azonban ma már egyértelmű, hogy ebben a különböző fenolos vegyületeknek is nagy szerepe van. (Heim et al., 2002). A flavonoidok kedvező tulajdonságai rendkívül változatosak. Ezek közé tartozik antioxidáns aktivitásuk, továbbá antiangiogén, antibakteriális, antivirális, antithromboticus, antiatheroscleroticus, allergia és tumor ellenes, és nem utolsósorban gyulladáscsökkentő hatásuk. Képesek egyes antioxidáns enzimek aktiválására (Elliot et al., 1992), az  $\alpha$ -tokoferolból képződő különböző szabadgyökök mennyiségének csökkentésére (Hirano et al., 2001) és az oxidázok működésének gátlására (Cos et al., 1998). Több állatkísérlet során hatásosnak bizonyultak krónikus gyulladással járó folyamatok gátlásában is (Camuesco et al., 2004; Fatehi et al., 2002; Hendriks et al., 2004; Kawaguchi et al., 2004). Számos megbetegedés során, elsősorban rákos megbetegedések, továbbá cardiovascularis betegségek és neurodegeneratív elváltozások esetében (Spencer et al., 2004) használhatóak kiegészítő terápiaként. Kardioprotektív hatásuk abból a tulajdonságukból adódik, hogy képesek a low density lipoproteinek (LDL) oxidációját gátolni (Kondo et al., 1996; Mazur et al., 1999). Egy idősebb férfiakon végzett átfogó vizsgálat során került megállapításra az, hogy a magasabb flavonoid-bevitel mellett alacsonyabb a halálozási arány koronária megbetegedések és myocardialis infarctus következtében (Hertog et al., 1993). Menopauzán átesett nők körében végzett felmérés során írták le a koronária megbetegedések valószínűségének 38 %-kal való csökkenését (Yochum et al., 1999).

Az osteoarthritis és a rheumathoid arthritis kialakulásában és kórfejlődésében különböző gyulladással járó mediátoroknak és citokineknek – például a TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 – központi szerepe van (van de Loo et al., 1995; Pelletier et al., 1995). A flavonoidok képesek a



gyulladásban résztvevő mediátorok mennyiségének csökkentésére. Ezekből adódóan a flavonoidok potenciális alternatív lehetőségként kínálkoznak a jövőben különböző krónikus gyulladásos betegségek kezelésére (Hougee et al., 2004).

### **2.1.3. Hatásmechanizmus, szerkezet és biológiai aktivitás összefüggései**

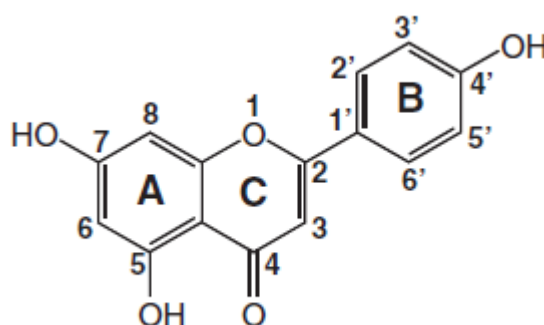
A flavonoidok pontos és részletes hatásmechanizmusa máig sem ismert teljesen. A korai tanulmányok a szervezetre gyakorolt jótékony hatásukat csaknem teljesen az antioxidáns aktivitásukra vezették vissza. Az antioxidáns hatást elsősorban a hidroxil-csoportok száma és pozíciója határozza meg. Úgy tűnik például, hogy a B gyűrűn a hidroxil-csoportok konfigurációja determinálja az antioxidáns aktivitást, csak úgy, mint a citokróm (CYP) 450 1A-ra kifejtett gátló hatást (Sekher et al., 2001; Kim et al., 2005). A működési elvükre irányuló vizsgálatok során a későbbiekben azonban kiderült, hogy számos flavonoid (köztük az apigenin, kaempferol, quercetin, chrisin, luteolin és a genistein) képes az intracelluláris jelátviteli rendszer modulálásán keresztül kifejteni hatását. Az előbb felsorolt flavonoidok gátolják a számos gyulladásos mediátor transzkripciójában részt vevő Nuclear Factor- $\kappa$  B-nek (NF- $\kappa$ B) és a mitogén-aktivált protein kinázoknak (MAPK) a működését. Továbbá képesek a fehérjék vagy az mRNA szintjén gátolni a különböző gyulladásos mediátorok megjelenését, mint például az interleukin (IL)-8, IL-6, ciklooxygenáz (COX)-2. (Rahman et al., 2006; Romier et al., 2009). Az, hogy az NF- $\kappa$ B és MAPK gátlása, valamint az IL-8, IL-6 és COX-2 koncentrációk csökkentése időben egyszerre vagy egymástól függetlenül zajló folyamat-e még nem teljesen tisztázott. A NF- $\kappa$ B-nek központi szerepe van a génexpresszióban a gyulladások során kialakuló immunválasz folyamán. Így a működésének gátlása révén a gyulladásos folyamat is csökkenthető. A MAPK-ok - ide tartozik a p38 MAPK, az extracelluláris szignál-regulált kináz (ERK) és a c-jun N-terminál kináz (JNK) – fontos kaszkád mechanizmusokban vesznek részt (Seeger & Krebs, 1995), melyek végeredménye különböző gyulladásos utak aktiválódása és mediátorok, citokinek termelődése.

Hatásmechanizmusukat kémiai szerkezetük, az alapvázhoz kapcsolódó szubsztituensek minősége és mennyisége is nagyban befolyásolja. Egy tanulmány során az apigenin, luteolin és chrysin szelektíven eliminálta a monocitákat valamint makrofágokat primer csontvelőből származó sejtenyészetből. Ez egybeesett a különböző gyulladásos mediátorok csökkent mennyiségével és alacsonyabb szintű metabolikus aktivitásával. A fenti hatásért valószínűleg a C2-C3 kettős kötés, és a hármasszénatomon a hidroxil csoport helyett szereplő hidrogén a

felelős. Azok a flavonoidok, amelyek nem rendelkeztek ezekkel a jellemzőkkel – például a kaempferol és a quercetin – nem mutattak hasonló tulajdonságokat (Hougee et al., 2005). Ezen túlmenően a hidroxil-csoportok jelenléte az 5, 7 és a 4' szénatomon (apigenin), a monocitákra/makrofágokra irányuló szelektív citotoxikus hatásban nyilvánult meg. Ha a 4' atomon a hidroxil-csoportot hidrogénre cserélték (chrysin), az előbb említett aktivitás sokkal csekélyebb mértékűnek bizonyult. Ha a hidrogén atomot hidroxil-csoportra cserélték a 6-os szénatomon, a gyulladáscsökkentő hatás megszűnt. Mivel a gyulladáscsökkentő folyamatokban a monociták és a makrofágok az elsődleges forrásai a gyulladáscsökkentő citokineknek, a számuk csökkenésével az IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  és az IL-6 szintje is csökkenni fog (Hougee et al., 2005).

#### 2.1.4. Apigenin

Az apigenin (4',5,7-trihidroxiflavon), a flavonok közé tartozó, az egyik leggyakrabban előforduló, alacsony citotoxicitású flavonoid. Széles körben fellelhető különböző zöldségekben és gyümölcsökben, mint például a petrezselyem, fokhagyma és a zeller (Miean & Mohamed, 2001). Az elmúlt évek során több, az apigenin bioaktivitására irányuló vizsgálat foglalkozott a vegyület trombocita – aggregációt gátló, antioxidáns és rák-megelőző hatásával (Das et al., 2010; Han et al., 2009; Wright et al., 2010; Yuan et al., 2007; Zhang et al., 2008). Továbbá számos tanulmány igazolta az apigenin gyulladáscsökkentő tulajdonságát *in vitro* és *in vivo* kísérletekben egyaránt (Ha et al., 2008; Lee et al., 2007; Nicholas et al., 2007; Smolinski és Pestka, 2003).



2. ábra Az apigenin molekulászerkezete (Funakoshi-Tago et al., 2011)

Az apigenin antioxidáns tulajdonságát kémiai szerkezete teszi lehetővé (2. ábra). A B-gyűrű rendelkezik egy hidroxil-csoporttal, ami hidrogén- vagy elektron-donorként egyaránt

viselkedhet. Hidrogén leadása után az apigenin  $\text{ArO}^\cdot$ , míg elektron leadás után  $\text{ArOH}^\cdot+$  formája keletkezik, melyek azután képesek különböző káros szabadgyökök semlegesítésére, az alacsony kötési energia és ionizációs potenciál következtében. Ennek eredményeként az apigenin csökkenti a reaktív oxigén specieszek (ROS) mennyiségét a szervezetben belül (Han et al., 2009; Leopoldini et al., 2004; Zhang et al., 2008). Egy kísérletben, ahol két különböző, egérből származó makrofág sejtvonalat (RAW 264.7 és J774 A.1) LPS-sel aktiváltak, az apigenin sikeresen gátolta a NO és a PGE2 képződést, az őket termelő két enzim – indukálható nitrogén-oxid szintáz (iNOS) és ciklooxygenáz (COX) – működésének gátlása révén (Liang et al., 1999; Raso et al., 2001).

Egy másik, egereken végzett vizsgálatban az apigenin sikeresen csökkentette a szérumban IL-6 és TNF- $\alpha$  szintjét. Ugyanez a kutatócsoport megállapította, hogy *in vitro* (RAW 264.7 sejteken) csak az IL-6 mennyiségére volt hatással az apigenin (Smolinski et al., 2003). Ez az eredmény azt erősíti meg, hogy nem elég csupán az *in vitro* kísérletekre támaszkodni a flavonoidok vizsgálata során.

## 2.2. Metoxiflavonok

### 2.2.1. Előfordulás, bioaktivitás

A metoxiflavonok a flavonok azon csoportját képviselik, melyben funkciócsoportként metoxi csoport kapcsolódik a benzo- $\gamma$ -piron alapvázhoz. A polimetoxiflavonok (PMF) esetében a vegyületek kettő vagy több metoxi és a C4 atomon lévő karbonil csoporttal rendelkeznek alapvázhoz kapcsolódva. Ezek a vegyületek csaknem kizárólag citrusfélékben fordulnak elő (Li et al., 2009). Az apigenin metoxi-származéka, az 5,7,4'-trimetoxiflavon azonban egyaránt előfordul citrusfélékben (Cavalcante et al., 1985) és más olyan növényi részekben, amit a népi gyógyászat hasznosít (Jaipetch et al., 1983; Yenaji et al., 2004). A különböző illóolajok és terpenoid vegyületek mellett a metoxi- és polimetoxiflavonok – például a tangeretin, sinensetin és nobiletin – a citrushéj fő alkotóelemei közé tartoznak. A benne található kedvező hatású vegyületek miatt a citrushéj héját évezredek óta használják különböző betegségek kezelésére az alternatív gyógyászatban. A narancshéj például tradicionális gyógyszer volt a gyomorfájdalom, köhögés, dermatitis, izomfájdalom, ótvaros fertőzések gyógyítására, csak úgy, mint a magas vérnyomás csökkentésére (Li et al., 2009). A polimetoxiflavonok szintén rendelkeznek a flavonoidokra jellemző rák-megelőző (Murakami et al., 2000a, 2005; Lai et al., 2007; Tang et al., 2007), gyulladáscsökkentő (Murakami et al.,

2000b, 2005; Lai et al., 2005) és anti-allergén (Kurowska et Manthey, 2004; Saito et al., 2007) tulajdonságokkal. A chrysin dimetoxilált változata, az 5,7-dimetoxiflavon tanulmányozása során beszámoltak kemopreventív, antivirális, vasodilatator, pigment-stimuláló és antikolinészteráz hatásairól (Wen et al., 2005; Khan et al., 2011; Sookkongwaree et al., 2006; Sawasdee et al., 2009; Tep-Areenan et al., 2010; Kang et al., 2011).

Korábbi tanulmányok azt a nézőpontot képviselték, hogy a szabad hidroxil csoporttal rendelkező flavonoidok sokkal nagyobb aktivitást mutatnak a szabad gyökök megkötésében, mint a metilált párjaik. Ezzel szemben a teljesen metoxilált formák is képesek a reaktív oxigén specieszek szintjének csökkentésére. Ennek oka, hogy hatásosan gátolják az olyan enzimeket, mint például az iNOS és a NADPH oxidáz, melyek a szabad gyökök keletkezésében (NO szuperoxid anion) játszanak fontos szerepet (Murakami et al., 2000b; Choi et al., 2007). Összességében tehát mindkét flavonoid típus hatékonyan csökkenti a szervezetben a reaktív oxigéngyökök mennyiségét.

A kisebb méretű metoxiflavonok, melyek maximum három metoxi csoporttal rendelkeznek, hidroxil csoportok nélkül, sokkal kevésbé tanulmányozott vegyületek. Ennek két valószínűsíthető oka van. Egyrészt a flavonoidok a jótékony hatását elsősorban az antioxidáns tulajdonságukkal hozzák összefüggésbe, ezzel szemben a kisméretű metoxiflavonok nem rendelkeznek azzal a szubsztituenssel, mely az előbbi tulajdonságért felelős. Másrészt pedig ezek a metoxiflavonok olyan növényekben fordulnak elő, melyek kisebb arányban találhatóak meg a kereskedelemben értékesített növényi élelmiszerek között.

A flavonoidok metoxilált származékai akkor kerültek a figyelem középpontjába, amikor több *in vivo* kemopreventív vizsgálat során hatékonyabbnak bizonyultak, mint a metoxi csoporttal nem rendelkező társaik. Ez a flavonoidok csekély orális értékesülésével magyarázható, mivel képtelenek intakt úton átjutni szisztémás keringésbe a bél/máj által képviselt kettős barrieren. Ezt a gyenge biológiai értékesülést a chrysin (Walle et al., 2001), quercetin (Walle et al., 2001; Manach et al., 2004), a resveratrol (Goldberg et al., 2003; Walle et al., 2004) és a curcumin (Garcea et al., 2004) esetében is igazolták. Ennek oka abban keresendő, hogy a vékonybélben különösen magas az UDP-glükuronoziltranszferázok (UGT), a szulfotranszferázok (SULT) expressziója, mely enzimek hatására az orálisan felvett flavonoidok az abszorpció folyamat során nagymértékben metabolizálódnak. Ezt követően a májba kerülnek, ahol az előbb említett enzimeken kívül még a citokróm 450 (CYP450) családba tartozó enzimek is hozzájárulnak a további metabolizációjukhoz. Mindezek eredményezik a csekély orális hozzáférhetőséget, amit tovább ront az, hogy a legtöbb

flavonoid és diétás polifenol glikozidok formájában fordul elő a különböző táplálékokban, amely alakban a szervezet számára nehezen, vagy egyáltalán nem hozzáférhető (Walle, 2007).

A metoxi- és polimetoxiflavonok azonban nagyfokú stabilitást mutatnak a szervezeten belül. Egy kísérlet során chrysin és metoxi-származékát, az 5,7-dimetoxiflavont vizsgálták mikroszómális és citoplazma enzimekkel, valamint a glükuronidációhoz (UDPGA), szulfatáláshoz (PAPS) és oxidációhoz (NADPH) szükséges kofaktorokkal egyaránt rendelkeződ humán májsejteken. A vizsgálat során a chrysin gyorsan metabolizálódott, 20 perc inkubációs idő után visszamaradó anyamolekula nélkül. Ezzel szemben az 5,7-dimetoxiflavon metabolikusan stabilnak bizonyult a teljes 60 perces vizsgálati idő alatt (Wen et al., 2006; Walle et al., 2006). A quercetin és resveratrol metabolizációja, csak úgy, mint sok más metoxilátlan flavonoid a chrysinhez hasonlóan zajlott.

### **2.2.2. Gyulladáscsökkentő hatás**

Nem csak metabolikus stabilitásukban, hanem gyulladáscsökkentő aktivitásukban is jobbnak bizonyulnak a metoxi- és polimetoxiflavonok összehasonlítva metoxilátlan párjaikkal. Egy kísérlet során a chrysinhez képest a 5,7-dimetoxiflavon szignifikánsan nagyobb mértékben redukálta, az IL-8 kivételével, az összes gyulladásos mediátor mennyiségét, valamint a NF- $\kappa$ B expresszióját (During és Larondelle, 2013). A polimetoxiflavonok közé tartozó nobiletin képes megakadályozni az LPS indukálta PGE2 képződést, illetve különböző gyulladásos citokinek (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) génexpresszióját. (Murakami et al., 2005; Lin et al., 2003). Egy másik tanulmányban a nobiletin csökkentette az aktivátor protein 1, az NF- $\kappa$ B és a cAMP „response element” kötő fehérje mRNS expresszióját, csak úgy, mint a COX-2-ét. (Murakami et al., 2005). A nobiletin ezen funkciója hasonlít a gyulladáscsökkentő szteroidokéhoz, de használata lényegesen kevesebb mellékhatással jár. Ezek az eredmények a nobiletin, mint lehetséges gyulladáscsökkentő és/vagy immunmoduláló használatát sugallják. Azonban a fenti eredmények többnyire *in vitro* vizsgálatokon alapulnak, a jövőben *in vivo* körülmények közt is vizsgálni kell a vegyület gyulladáscsökkentő hatását (Shimming Li et al., 2009).

### **2.2.3. Metoxiflavonok szervezeten belüli keletkezése**

Ahogy azt már az előbb leírtakban (2.2.1. fejezet) is olvasható volt, a vékonybél enterocytáiban jelen vannak különböző metabolizációs folyamatokban részt vevő enzimek. A flavonokból a szabad hidroxil-csoportjuk metilációja révén keletkeznek az O-metilált, vagy

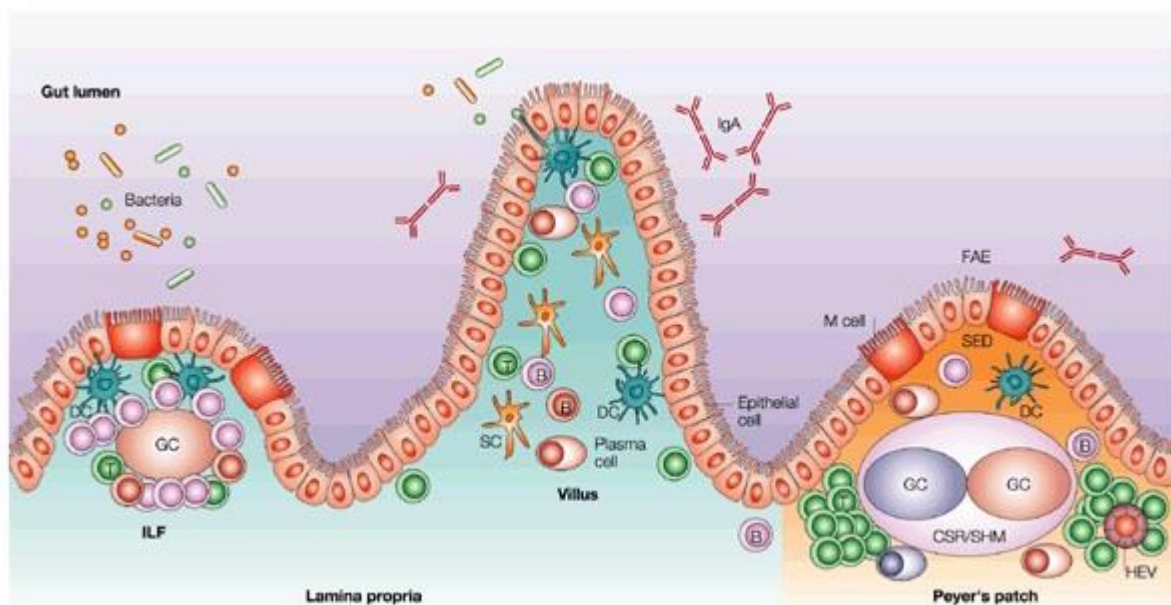
metoxilált analógjaik, azaz a metoxiflavonok. Ezt a reakciót növényekben különböző O-metiltranszferázok (Lam KC et al., 2007), állatokban pedig catechol-O-metiltranszferázok (COMT) katalizálják (Lu et al., 2003). A catechol-O-metiltranszferázok aktivitása az állati szervezeten belül mindenütt, így az emésztőcsatornában jelenlévő bélhámsejtekben is kimutatható (Nissinen et al., 1988). Ebből következően az enterocytákban jelenlévő metoxilált flavonok egyaránt származhatnak a szájon át felvett takarmányból, illetve a bélhámsejtekben zajló biotranszformációs folyamatokból.

## **2.3. A vékonybél**

### **2.3.1. A bél, mint immunszerv**

A vékonybélnek nem csak az emésztési-felszívási funkciók ellátásában van szerepe. A bél nyálkahártyája valódi nyirokszervként is funkcionál. A propriában elhelyezkedő immunsejtek összessége alkotja az emésztőcsőhöz asszociált lymphoid szövetet, azaz a GALT = Gut Associated Lymphoid Tissue egységét, mely több különböző méretű képződmény és önálló nyiroktüsző összessége. Ide tartoznak többek között a száj-garatüregben található tonsillák, a gastrointestinalis traktusban elhelyezkedő Peyer plakkok, illetve a bélcső mucosa rétegében jelenlévő elszórt nyiroktüszők is (Tuboly, 1998). A GALT fontos szerepet tölt be a bélben, mint bemeneti kapuban, a takarmánnyal felvett külső patogén ágensek elleni védelemben. A különböző lymphoid elemek egyaránt szerepet játszanak a lokális sejtes és humorális immunválasz kialakulásában.

A bél lumen felől érkező kórokozó hatásokkal szemben a szervezet négy védelmi vonallal védekezik. Az első a mikrobiális barrier, melyet eubiotikus állapotban 90%-ban a főflórát alkotó mikrobák (Gram pozitív *bifidobacteriumok* és *lactobacillusok*, Gram negatív *eubacteriumok* – *Fusobacterium* és *Bacteroides* nemzetség) tesznek ki. Az előbb említett baktériumok eubiotikus állapotban kommenzalista szervezetekként vannak jelen a bél lumenében, sőt tulajdonképpen hasznosnak is tekinthetők. Ezek a flóraalkotó baktériumok szorosan kapcsolódnak egymáshoz, illetve a bélnyálkahártyához, ezzel alkotva a második, anatómiai barriert. A harmadik a humorális barrier, melynek fő alkotói a plasmocyták által termelt immunglobulinok. A plasmocyták a fajspecifikus IgG, IgM és IgE mellett legnagyobb részben IgA-t szintetizálnak, amely részt vesz a különböző vírusok és folyékony antigének eliminálásában. A lamina propria rétegében elhelyezkedő makrofágok, mint immunkompetens sejtek adják a negyedik védelmi vonalat, a cellularis barriert (Fekete et al., 2009).



3. ábra GALT sematikus ábrája (ILF = izolált lymphoid folliculus; FAE = folliculus asszociált epithelium; SED = subepitheliális „dome”; DC = dentritikus sejt; GC = germinatív centrum; SC = stroma sejt) (Fagarasan & Honjo, 2003)

Az előzőekben ismertetetteken túl a bélcsatorna egyéb mechanizmusok révén is védekezik a fertőző ágensekkel szemben. Ilyen például a perisztaltikus mozgás, mely jelentősen megnehezíti a patogének nyálkahártyán való megtapadását. Szintén a baktériumok megtapadásának esélyét csökkenti a kehelysejtek által termelt mucinréteg, ami egyfajta védőmázként vonja be a nyálkahártya felszínét. Ezek mellett az enterocyták folyamatos cserélődése is hozzájárul ahhoz, hogy az exogén kórokozó ne tudjon megtelepedni a nyálkahártya felszínén. A gyomor, illetve a vékonybél elülső szakasza pedig számos baktericid és bakteriosztatikus anyag szekretálásával (gyomor-sósav, epesav, zsírsavak) védekezik a takarmánnyal felvett különböző patogén csírák ellen (Fekete et al., 2009.)

Folyamatos, enyhe antigénterhelés mellett a szervezet válasza gyanánt, a primer mediátorok – elsősorban a leukociták aktivitásának és funkciójának szabályozásában is fontos szerepet játszó TNF- $\alpha$  – alacsony koncentrációban történő szekréciója zajlik. Ez a folyamat pedig egy általános immunstimulációs állapotot, valamint fokozott cellularis védelmet eredményez. Azonban túlzott antigénterhelés következtében, ami a káros baktériumflóra feldúsulása, vagy pedig nagyobb mértékű virális, parazitás, gombás behatás következtében alakul ki, a szervezet védekezőmechanizmusai károsodnak. Az enterocyták szekréciós tevékenysége csökken, a bélbolyhok laposabbá, a perisztaltika kisebb intenzitásúvá válik, a bélfal megvastagszik és gyulladás, azaz enteritis alakul ki.

## 2.4. Bélgyulladás

A bélgyulladás (enteritis) változatos kórokok hatására kialakuló, az emésztőcső egészére, vagy csak bizonyos szakaszaira (pl.: vékonybélgyulladás) kiterjedő megbetegedés. Az emésztőcső gyulladása lehet elsődleges vagy másodlagos, lefolyása szerint heveny vagy idült, megjelenési formája alapján, kórtani szempontból pedig megkülönböztetünk hurutos, vérzéses, álhártyás, fekélyes és elhalásos bélgyulladást. Enteritist előidéző kórokok között elkülöníthetünk fertőző és nem fertőző okokat. Utóbbi kategóriába tartoznak a tartási-takarmányozási hibákra, mérgezésekre, gyógyszerekre visszavezethető bélgyulladások. Előfordul az is, hogy más szervi megbetegedés vezet az enteritis kialakulásához, illetve, hogy valamilyen idiopathicus folyamat az előidézője.

### 2.4.1. Állatokban előforduló enterális patogének

Fertőző ágensek közül vírusok, baktériumok és paraziták egyaránt képesek gyulladás indukálására a gastrointestinalis traktusban. Az állatfajonként leggyakrabban előforduló bakteriális kórokozókat a 2. táblázat foglalja össze.

2. táblázat Leggyakrabban előforduló enterális baktériumok (Karsai & Vörös, 2013; Karsai & Vörös 1992)

	Ló	Szarvasmarha	Sertés	Kutya, Macska
<b>B A K T É R I U M O K</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Escherichia coli</i></li> <li>• <i>Salmonella</i> spp.</li> <li>• <i>Clostridium perfringens</i></li> <li>• <i>Actinobacillus equuli</i>,</li> <li>• <i>Rhodococcus equi</i></li> <li>• <i>Bacillus anthracis</i></li> <li>• <i>Mycobacterium</i> spp.</li> <li>• <i>Streptococcus equi</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Escherichia coli</i></li> <li>• <i>Salmonella typhimurium</i></li> <li>• <i>S. enteritidis</i></li> <li>• <i>S. dublin</i></li> <li>• <i>Clostridium perfringens C</i></li> <li>• <i>Mycobacterium paratuberculosis</i></li> <li>• <i>Chlamydia psittaci</i></li> <li>• <i>Campylobacter jejuni</i></li> <li>• <i>C. coli</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bacillus anthracis</i></li> <li>• <i>Clostridium septicum</i></li> <li>• <i>Cl. perfringens C</i></li> <li>• <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i></li> <li>• <i>E. coli</i></li> <li>• <i>Salmonella choleraesuis</i></li> <li>• <i>Brachyspira hyodysenteriae</i></li> <li>• <i>Lawsonia intracellularis</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Campylobacter jejuni</i></li> <li>• <i>Salmonella</i> spp.</li> <li>• <i>Clostridium perfringens</i></li> <li>• <i>Clostridium difficile</i></li> <li>• <i>Yersinia enterocolitica</i></li> <li>• <i>Yersinia paratuberculosis</i></li> <li>• <i>Bacillus piliformis</i></li> <li>• <i>Escherichia coli</i></li> <li>• <i>Mycobacterium</i> spp.</li> </ul>



## 2.4.2 Gram negatív baktériumok LPS-komplexe és annak hatásai

A Gram negatív baktériumok (pl.: *E. coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia* spp.) sejtfa kettős felépítésű. A citoplazmát körülvevő és sejtfa alkotó peptidoglikán vázat kívülről lipoproteid-lipopoliszacharid- (LPS) komplexek borítják, melyek citotoxikus aktivitásuk mellett egyúttal antigén hatással is rendelkeznek. Ez alapján látszik, hogy a baktériumok LPS-komplexe egyben az endotoxinjuk és O-antigénjük is. Előbbi funkcióért az LPS foszfolipidje, a lipid-A, míg az utóbbiért a poliszacharid komplex a felelős (Tuboly, 1998).

A *per os* felvett, majd a bél lumenében széteső Gram negatív baktériumokból ez az LPS felszabadul, majd az enterocyták abszorpciós tevékenysége révén a keringésbe kerül. Az LPS a szervezetben belül a monocyták és a makrofágok potenciális aktivátora (Comalada et al., 2006). A felületi toll-like receptor 4 (TLR4)-hez kötődve az LPS számos gyulladásosban résztvevő mediátor és citokin szintjének növekedését eredményezi. Az LPS hatására bekövetkező gyulladásos molekulák expressziója több jelátviteli út és transzkripciós faktor által regulált folyamat. Ilyen transzkripciós faktor például a „nuclear factor  $\kappa$ B” (NF- $\kappa$ B) heterodimer fehérje, amely főleg p65 és p50 alegységekből áll össze. Normál körülmények között a NF- $\kappa$ B inaktivált állapotban a citoplazmában található, az I $\kappa$ B fehérjéhez kötötten. Gyulladásos szignál hatására egy intracelluláris jelátviteli kaskád mechanizmus aktiválódik melynek eredménye az I $\kappa$ B foszforilációja, majd az azt követő degradációja (Tanaka et al., 2001). Ennek eredményeként a NF- $\kappa$ B már aktív állapotban felszabadul, majd a sejtmagban transzlokálódva különböző citokinek, kemokinek, anti-apoptotikus faktorok és sejt növekedési faktorok expresszióját indukálja (Li & Verma, 2002). Mindezek mellett az LPS nem csak a NF- $\kappa$ B-t, mint döntő transzkripciós faktort aktiválja, hanem a mitogén-aktivált protein kinázok (MAPKs) foszforilációját is indukálja. Ez a lépés végső soron a makrofágokban szintén a NF- $\kappa$ B felszabadulásához vezet (Jung et al., 2008; Ha et al., 2010). A mitogén aktivált protein kinázok olyan szignál-molekulák, amelyek kulcsszerepet töltenek be a sejtnövekedés, sejt differenciálódás, sejt túlélés/apoptózis, sejtek citokinekre, stresszre és gyulladásra adott válaszában szabályozásában (Búfalo et al., 2013).

Az előzőekben leírtakból is látszik, hogy a Gram negatív baktériumokból felszabaduló LPS hatásra a szervezet egy komplex, szisztémás immunválasszal reagál. Túlzott mértékű endotoxin felszabadulása azonban endotoxinsokk és következményes elhullás veszélyével fenyeget.

### 3. Célkitűzések

Kísérleteink két flavonoid típusú vegyület bélhámsejteken kifejtett gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálatára irányultak. Vizsgálatunkhoz sertés jejunumból izolált IPEC-J2 sejt kultúrát választottunk. Előnye, hogy ellentétben a széles körben elterjedt sejt kultúrákkal szemben, melyek tumoros eredetű vagy transzformáción átesett sejtekből származnak, az IPEC-J2 sejtek egészséges bélhámból kerültek izolálásra, így megfelelően modellezzik a bélhámot.

A bélhámsejtekben bakteriális eredetű LPS-sel indukáltunk gyulladást, melynek mértékét négy gyulladási marker – az interleukin 6 (IL-6), az interleukin-8 (IL-8), a tumor nekrozis faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) és a ciklooxygenáz-2 (COX-2) – relatív génexpressziós szintjének változásával követtünk nyomon.

Vizsgáltuk a két kiválasztott flavonoid, az apigenin és metoxilált származékának, a trimetoxi-apigeninnek a bélhámsejtekre gyakorolt gyulladáscsökkentő hatását. A gyulladási markerek szintjét összehasonlítottuk az LPS-sel kezelt sejtekben, és azokban a sejtekben, amik egyidőben részesültek LPS és flavonoid kezelésben. Továbbá megvizsgáltuk, hogy a két vizsgált flavonoid gyulladáscsökkentő hatása között tapasztalható-e különbség.

## 4. Anyagok és módszerek

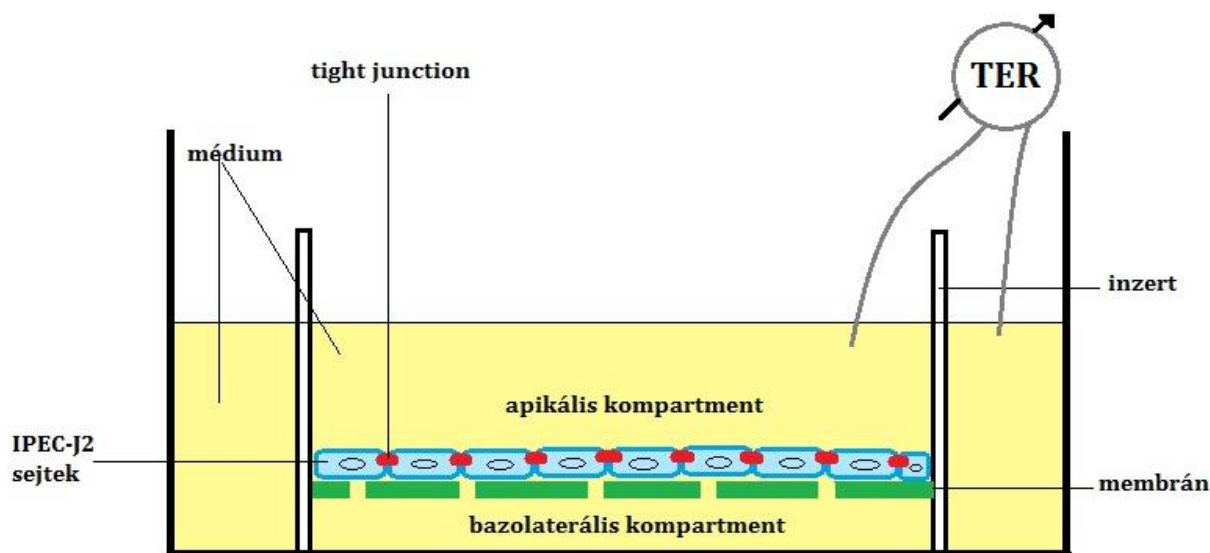
### 4.1. IPEC-J2 sejtek tenyésztése

Az általunk használt IPEC-J2 sejt vonal Dr. Jody Gookin (Department of Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA) ajándéka volt. A sejteket fenntartására Dulbecco's modified Eagle medium és Ham's F-12 Nutrient tápfolyadékok 1:1 arányú keverékét (DMEM/F12, Sigma-Aldrich) használtuk, melyet kiegészítettünk 5% főtájis borjúsavó (FBS), 5 µg/ml transferrin, 5 µg/ml inzulin, 5 ng/ml szelén, 5 ng/ml epidermális növekedési faktor (EGF) és 1% penicillin-streptomycin keverékével. Első lépésben a folyékony nitrogénben tartott IPEC-J2 sejteket egy hétig szaporítottuk, 37°C-on 5% CO<sub>2</sub> tartalmú légtérben, egy 25 cm<sup>3</sup>-es, 10 ml DMEM/F12 tápfolyadék tartalmú flaskában, majd ebből a sejteket inzertekre ültettük ki. Passzálás során a flaskában tenyésztett sejteket a tápfolyadék leszívása után 5 ml PBS-sel átmostuk. Ezt követően 3 ml tripszin-EDTA (0,05% tripszin, 0,6 mmol EDTA) oldatot mértünk a sejtekhez, mellyel a sejtek a flaska felületéről leválaszthatók. Körülbelül 10 perc várakozás után addig rázogattuk a flaskát, amíg minden sejt levált annak felületéről. Ezután új, steril flaskákba átpipettáztuk az 1-1 ml tripszin-EDTA-ban felvett sejteket, amelyet minden flaska esetében DMEM/F12-vel 10 ml térfogatra egészítettünk ki, majd a következő passzálásig inkubáltunk. A kísérletekhez az IPEC-J2 sejtek tenyésztését kollagénnel bevont poliészter membrán inzerten, Costar Transwell 6-lyukú sejtenyészítő edényben (4,67 cm<sup>2</sup>/lyuk) valósítottuk meg. A kiindulási flaskában 2 ml sejtszuspenzióhoz 18 ml DMEM/F12-t adtunk, majd ebből mértünk át lyukanként 1,5 ml-t a 6-lyukú sejtenyészítő edénybe. A tenyészet indításakor, a bazolaterális részbe 2,6 ml tápfolyadékot pipettáztunk, illetve az inzertek apikális részére  $1-2 \cdot 10^5$  db sejtet raktunk le, 1,5 ml térfogatban. A sejtenyészítés teljes ideje alatt a sejteket 37°C hőmérsékleten, 95% levegő és 5% CO<sub>2</sub> tartalmú atmoszférában tartottuk. A tápfolyadékot minden második nap cseréltük.

Az általunk használt inzert célja a bazális membrán modellezése, ezért kialakításában az apikális és bazolaterális médium úgy van elválasztva, hogy a két kompartment kizárólag a membránban lévő 0,4 µm nagyságú pórusokon keresztül van kapcsolatban egymással.

A membrán kollagénnel történő bevonása elősegíti a sejtek megkötődését, melyek így a membrán felületén szaporodnak el. Ez a tenyésztési eljárás jól modellezi a bélhámsejtek számára az *in vivo* környezetet, lehetővé teszi, hogy polarizált sejtekké fejlődjenek és

kialakuljanak a sejtkapcsoló struktúrák (5. ábra). A vizsgálatunk során használt sejtek a rendelkezésükre álló felületet a néhány nap alatt, egy rétegben benőtték. A TER értékét 2-3 naponta ellenőriztük, amelyhez az EVOM Epithelial Tissue Volt/Ohmmeter (World Precision Instruments, Berlin, Németország) készüléket használtuk. A TER a tenyésztés ideje alatt folyamatosan növekedett; a maximális szintjét körülbelül 15-18 nap alatt érte el. A kísérleteket 7000 Ohm cm<sup>2</sup> TER értéket elérő sejtenyészeten végeztük.



4. ábra: A sejtenyésző edény sematikus rajza és a TER mérés

## 4.2. Flavonoidok

A kísérletünk során felhasznált két flavonoid az apigenin és analógja, a trimetoxi-apigenin voltak. Az apigenint a Sigma-Aldrich (Steinheim, Németország), míg a trimetoxi-apigenint az Indofine Chemical Company (Hillsborough, NJ, USA) cégtől vásároltuk meg. A flavonoidok feloldása DMSO-ban, majd hígításuk DMEM/F12 tápfolyadékban történt. A kísérletekben használt kezelőoldatok legfeljebb 1% DMSO-t tartalmaztak.

## 4.3. Neutral red citotoxicitási teszt

A Neutral red teszt *in vitro* kísérletek során használatos kvantitatív mérési módszer, mellyel meghatározhatjuk az élő sejtek számát adott sejtkultúrában. Ez az egyik legtöbbször használt citotoxicitást vizsgáló módszer, mivel nagyfokú érzékenysége mellett jelentősen olcsóbb a forgalomban lévő többi teszthez képest. A Neutral red működési alapja a sejtekben lejátszó lizoszómális reakció. Ennek során a reakcióban használt enyhén kationos festéket a sejtek bekebelezik, azután a lizoszómáik mátrixában anionos részekhez kötődten

koncentrálják. A festék abszorbanciája etanolos kivonás után spektrofotométeres úton mérhető. Mivel a lizoszómális integritás és az ezzel járó festék-kötő képesség egy nagyon érzékeny mutatója a sejt életképességének, az 540 nm-en mért abszorbancia értéke és az élő sejtek száma közt lineáris összefüggés van.

A Neutral red teszt során az apigenin és a trimetoxi-apigenin 25, 50 és 100  $\mu\text{M}$  koncentrációjú oldatainak citotoxicitását vizsgáltuk.

Első lépésben az IPEC-J2 sejteket 96 lyukú sejtenyésző edényre helyeztük, majd 24 órán keresztül inkubáltuk őket. Ezt követően minden lyukba 150  $\mu\text{l}$  kezelőoldatot mértünk. A használt koncentrációk 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  apigenin és trimetoxi-apigenin. Kontrollként DMEM tápfolyadékot pipettáztunk a sejtekre. Mivel a flavonoidok feloldása során DMSO-t használtunk, a sejtek kezelése 1% DMSO-t tartalmazó DMEM oldattal is megtörtént. Ezután a sejteket 1 órán keresztül 37 °C hőmérsékleten inkubáltuk, majd leszívtuk róluk a folyadékot és PBS – sel (Phosphate Buffered Saline) történő mosás következett, végül DMEM tápfolyadékot mértünk a lyukakba. Egy újabb 24 órás inkubációt követően minden lyukba 100  $\mu\text{l}$  Neutral Red festéket pipettáztunk, majd a mintát 2 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk. A következő lépésben leszívtuk a folyadékot a sejtekről, majd egy ismételt PBS-es mosást követően 50  $\mu\text{l}$  „destaining” oldatot (50% etanol (96%-os), 49 % ioncserélt víz, 1% jégecet (cc. ecetsav)) mértünk a lyukakba. Ezután a sejtenyésző edényt 10 percig rázattuk, majd 540 nm-en spektrofotometriás eljárással mértük az abszorbancia mértékét.

#### **4.4. Az IPEC-J2 sejtek kezelése LPS-sel, apigeninnel és trimetoxi-apigeninnel**

Kísérletünk során plain medium tápfolyadékot használtunk (pDMEM/F12), amely nem tartalmaz szérumot és egyéb kiegészítő anyagokat.

A kontroll sejtekre 10 ml pDMEM-t mértünk. Az IPEC-J2 sejteken LPS kezeléssel indukáltunk gyulladást. A kezelt sejtekre pDMEM-ben feloldott LPS-t (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), pDMEM-ben feloldott apigenint és trimetoxi-apigenint, végül pedig pDMEM-ben együttesen oldott apigenint és LPS-t, valamint trimetoxi-apigenint és LPS-s mértünk. Mindkét flavonoid esetében, az előzetes Neutral red citotoxicitási vizsgálat alapján, a 25  $\mu\text{M}$  koncentrációt választottuk. A flavonoid törzsoldatok koncentrációja 100  $\mu\text{M}$ , az LPS-e 1 mg/ml volt.

Az alkalmazott LPS koncentráció minden esetben 100  $\mu\text{l}$ , a végtérfigat pedig 10 ml volt. A bélhámsejtek bazolaterális részéhez előzetesen 2,6 ml DMEM/F12 tápfolyadékot

adtunk. A sejtek 1 órán át, 37 °C hőmérsékleten történt inkubációja után pDMEM-mel átmostuk őket.

3. táblázat A kísérletben használt kezelőoldatok összetétele

	pDMEM/F12	LPS (1 mg/ml)	Apigenin (100 µM)	Trimetoxi- apigenin (100 µM)
<b>Kontroll</b>	10 ml	-	-	-
<b>LPS (10 )</b>	10 ml	100 µl	-	-
<b>LPS + apigenin</b>	7,5 ml	100 µl	2,5 ml	-
<b>LPS + trimetoxi- apigenin</b>	7,5 ml	100 µl	-	2,5 ml
<b>Apigenin</b>	7,5 ml	-	2,5 ml	-
<b>Trimetoxi- apigenin</b>	7,5 ml	-	-	2,5 ml

## 4.5. RNS-izolálás

### 4.5.1. Homogenizálás

A kezelés után a sejtekhez lyukanként 1 ml TRIzol, INvitrogen típusú total RNS izoláló folyadékot adtunk. Ezt követően pipetta fel-le mozgásával szuszpendáltuk a sejteket, majd az így kapott homogén lizátumot – mely -80 °C-on akár egy évig is tárolható - steril mikro-centrifugacsövekbe mértük.

### 4.5.2. RNS kivonás

A sejtizátumot 4°C hőmérsékleten 5 percig inkubáltuk, majd a mintákhoz adtunk 0,2 ml -20°C hőmérsékletű kloroformot (Reanal, Budapest, Magyarország), ezután a csöveket 15 másodpercig vortexeltük. Ezt egy 5 perces jégen (4°C) történő inkubáció követte, ami után a mintákat 12000 g sebességgel 15 percig azonos hőmérsékleten (4°C) centrifugáltuk. Ennek a folyamatnak a végén három elkülönülő fázist kaptunk:

1. felső, vizes fázis
2. középső, intermedier fázis
3. alsó, fenol-kloroformos fázis

Mivel az RNS a felső vizes fázisban található, így azt óvatosan leszívtuk, és steril mikrocentrifugacsövekbe pipettáztuk. A leszívott felülúszó mennyiségével megegyező arányban a csövekhez kloroformot mértünk. Ezt követően megismételtük az RNS kivonási lépést.

#### *4.5.3. RNS kicsapás*

A vizes fázist új, steril mikrocentrifugacsövekbe mértük át, melyekhez 1:1 arányban hűtött izopropil-alkoholt (Merck, Darmstadt, Németország) adtunk, majd ismételt vortexelés következett. A mintákat 4°C hőmérsékleten, 10 percig inkubáltuk, ezt követően a csöveket 12000 g sebességgel, szintén 4°C-on 10 percig centrifugáltuk. Így az RNS a mikrocentrifugacsövek alján fehér pellet formájában kicsapódott, a keletkezett felülúszót óvatosan leszívtuk, egy vékony réteget hagyva a kicsapódott RNS-en. A felülúszóban van a micro RNS, melyet -20°C hőmérsékleten, későbbi vizsgálatok céljára tárolhatunk.

#### *4.5.4. RNS mosás*

Az RNS mintánkhöz 1 ml, 75%-os, -20°C hőmérsékletű etanolt mértünk, abból adódóan, hogy a kiindulási reagensünk mennyisége szintén 1 ml volt. Ezután a csöveket vortexeltük, majd 4°C-on 7500 g-vel 5 percen keresztül centrifugáltuk. A felülúszó leöntése után a lépést megismételtük. Végül a csöveket lepörgettük és a maradék etanolt lepipettáztuk és a pelletet 10-15 percig szárítottuk.

#### *4.5.5. RNS feloldás*

Az RNS-t 50 µl RNáz-mentes vízben (Molecular Biology Grade Water, Eppendorf, Hamburg, Németország) oldottuk fel.

#### *4.4.6. A mintában maradt DNS emésztése*

A mintában maradt DNS-t az Amplification Grade DNase I (Sigma-Aldrich, Steinheim, Németország) segítségével távolítottuk el, követve a gyártó által előírt utasításokat. A feloldott RNS-ből 8 µl-t mértünk be RNáz-mentes PCR-csőbe, melyhez 1 µl 10x reakció puffert és 1 µl DNáz enzimet (1 egység/µl) adtunk. Az így nyert elegyet

összekevertük, majd 37°C-on 15 percig inkubáltuk. Az enzimet 1 µl leállító oldat hozzáadásával inaktiváltuk, majd az elegyet 10 percig 70°C hőmérsékleten hőkezeltük, az enzim és az RNS denaturációjának céljából.

#### 4.5.7. RNS futtatás

Az RNS sértetlenségének ellenőrzését agaróz gélelektroforézises vizsgálat segítségével végeztük. Agaróz gél (1%-os) készítettünk 1 g agaróz (Sigma-Aldrich), 10 ml 10x TBE puffer (107,8 g/l Tris, 57 g/l bórsav, 7,4 g/l EDTA; pH=8,3), 90 ml DEPC (diethyl-pirokarbonát) víz felhasználásával. A gél 50°C-ra történő lehűlését követően 10 µl etídium-bromidot (10 µg/ml, Fluka, Buchs, Svájc) kevertünk hozzá. így téve láthatóvá az RNS-t. Ezután az agarózgél zsebeibe töltöttünk 1 µl töltőpuffert (6x Orange Loading Dye Solution, Fermentas, St. Leon-Roth, Németország) 2 µl RNS mintával összekeverve. Az elektroforézist 1x TBE futtató pufferben, 80 V feszültségen, 25 percig végeztük, majd UV fényben az RNS detektálására került sor, az In Genius LHR Gel Documentation and Analysis System (Syngene, Cambridge, Anglia) használatával. Abban az esetben, ha az RNS mintánk ép volt, a gélfotón két csík megjelenését tapasztaltuk – a 18S és 28S rRNS. Amennyiben a gélben kettőnél több csík megjelenése volt látható, a mintát további vizsgálatokhoz nem használtuk.

#### 4.5.8. OD mérés

Annak érdekében, hogy a kivont RNS tisztaságát meghatározzuk Nano Drop ND-1000 spektrofotométeres (Thermo Scientific, Wilmington, USA) vizsgálatot végeztünk (230, 260 és 280 nm-en) és kiszámítottuk az A260/A280 és az A260/A230 arányokat. Az A260/A280 hányados megmutatja a minta fehérje szennyezettségét, az A260/A230 arány pedig a minta szénhidrát és/vagy egyéb szerves oldószerekkel való szennyezettségéről ad felvilágosítást. Az A260/A280 értéknek 1,8 és 2,1 közé kell hogy essen, míg az A260/A230 értéknek nagyobbnak kell lennie 1,5-nél ahhoz, hogy az RNS mintát tisztának fogadjuk el. A nukleinsavak elnyelési maximuma 260 nm-en van. A Nano Drop programja az RNS mennyiségét úgy számolja ki, hogy a 260 nm-en mért abszorbancia értéket megszorozza 40 µg/ml-rel és így adja meg az RNS koncentrációját µg/ml-ben.

## 4.5. Az RNS átírása

A reverz transzkripciót Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas) használatával végeztük. A bemért RNS mennyisége minden esetben 1000 ng



volt. A PCR-csővekbe bemért RNS-t 11 µl térfogatra egészítettük ki RNáz-mentes vízzel. Miután hozzáadtunk a csövekhez 1 µl random hexamer primert, felkevertük, majd lepörgettük az elegyet. A következő lépésben 70°C hőmérsékleten 5 percen keresztül inkubáltuk a mintát. Mindezek után 4 µl reakciópuffert, 1 µl RiboLock-ot (RNáz inhibitor) és 2 µl dNTP mixet adtunk a csövekhez. Keverés és lepörgetést követően a csöveket 25°C-on, 5 percig inkubáltuk, majd 1µl reverz transzkriptázt adtunk a mintákhoz. Az átírást az alábbi hőprofil szerint végeztük: 25°C-on, 10 percig, majd 42°C-on 60 percig inkubáltuk az elegyet. A reakció leállításának céljából 70°C-on 10 percig inkubáltuk a mintákat.

## 4.6. Kvantitatív real-time PCR

A kvantitatív real-time PCR vizsgálatot iQ SYBR Green Supermixkit-tel (BioRad, Hercules, CA, USA), Mini Opticon PCR-készülék (BioRad) segítségével végeztük el. A PCR templátjaként szolgáló cDNS mintákat, RNáz-mentes vízzel ötszörösére hígítottuk a reakciót megelőzően. A vizsgált célgénjeink az interleukin-6 (IL-6), az interleukin-8 (IL-8), a ciklooxygenáz-2 (COX-2) és a tumor nekrozis faktor-alfa (TNF- $\alpha$ ), ), referencia génjeink a hipoxantin-foszforibozil-transzferáz (HPRT) és a ciklofilin-A (CycA) voltak. A PCR-reakciókban a 4. táblázatban szereplő sertés-specifikus primer-párokat alkalmaztuk.

4. táblázat A kvantitatív PCR-reakciókban használt primer szekvenciák (F: forward, R: reverse)

Gén	NCBI azonosító szám	Primer szekvencia	PCR termék mérete (bp)
IL-6	NM_214399	F 5'-TTCACCTCTCCGGACAAAAC-3' R 5'-TCTGCCAGTACCTCCTTGCT-3'	122
IL-8	NM_213867	F 5'-AGAGGTCTGCCTGGACCCCA-3' R 5'-GGGAGCCACGGAGAATGGGT-3'	126
COX-2	NM_214321	F 5'-AGAAGCGAGGACCAGCTTTC-3' R 5'-AAAGCGGAGGTGTTTCAGGAG-3'	215
TNF- $\alpha$	NM_214022	F 5'-TTCCAGCTGGCCCCCTTGAGC-3' R 5'-GAGGGCATTGGCATACCAC-3'	146
HPRT	NM_001032376	F 5'-GGACTTGAATCATGTTTGTG-3' R 5'-CAGATGTTTCCAAACTCAAC-3'	91
CycA	NM_214353	F 5'-GCGTCTCCTTCGAGCTGTT-3' R 5'-CCATTATGGCGTGTGAAGTC-3'	160

Az egyes PCR reakciókhoz 2,5 µl cDNS mintát használtunk fel, ehhez 12,5 µl 2xiQ SYBR GreenSupermixet, 0,5 µl forward primert (10 µM), 0,5 µl reverse primert (10 µM) és 9 µl RNáz-mentes vizet adtunk. A reakciók hőprofilja a következő volt: 95°C-on 3 perc, ezt követően 40 ciklus; 95°C-on 20 másodperc, 60°C-on 30 másodperc és 30 másodperc 72°C-on. A PCR készülék minden egyes ciklus végén detektálta a fluoreszcenciát, amely folyamat valamennyi ciklus esetében plusz 10 másodpercet jelentett. A reakció specificitásáról való meggyőződés céljából a PCR reakciók minden esetben olvadáspont analízissel végződtek. A reakciók hatékonyságának meghatározásához felvettük a vizsgált célgének és referencia gének standard görbéit, egy kiválasztott minta cDNS-ből hígítási sort készítve.

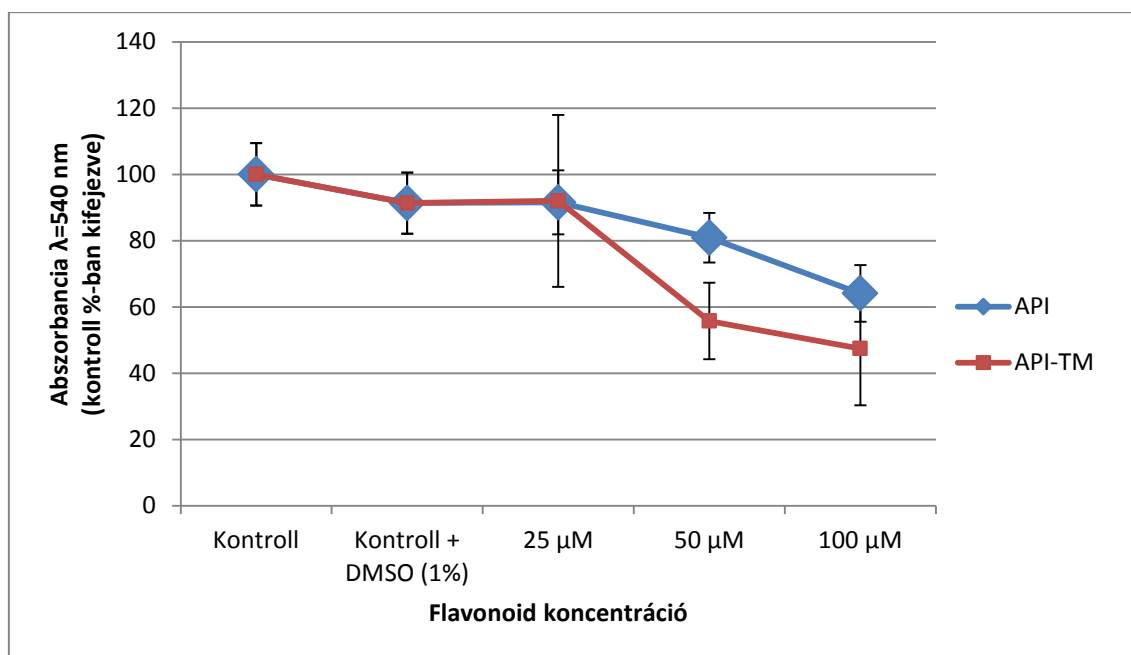
## **4.7 A célgén relatív expressziójának kiszámítása, statisztikai számítások**

A PCR-készülék a reakciók végén megadta a mintákhoz tartozó Ct-értékeket (küszöb ciklus), amely azt a ciklusszámot jelenti, ahol a küszöbvonal elmetshi a felvett fluoreszcencia görbéket. A PCR hatékonysága az exponenciális tartományban – ahol a templát mennyiség minden ciklusban megkétszereződik - a legnagyobb, tehát a küszöbvonalat a készülék abban a tartományban helyezi el, ahol a fluoreszcens jel exponenciális növekedést mutat. A célgének relatív expresszióját a REST 2009 szoftver (Relative Expression Software Tool) segítségével végeztük el. A relatív expresszió értékeket használtuk a statisztikai kiértékeléshez, melyet a STATISTICA program segítségével végeztünk el. A statisztikai modellezéshez egytényezős varianciaanalízist (ANOVA) használtunk, a csoportok közötti különbséget 5%-os szignifikancia szint ( $p=0,05$ ) mellett határoztuk meg. A kontroll csoporttal való összehasonlításhoz Dunnet-próbát használtunk, valamint Fisher-próbával mutattuk ki, hogy az apigenin és analógjának hatása közt van-e szignifikáns különbség..

## 5. Eredmények

### 5.1. Neutral red citotoxicitási teszt eredményei

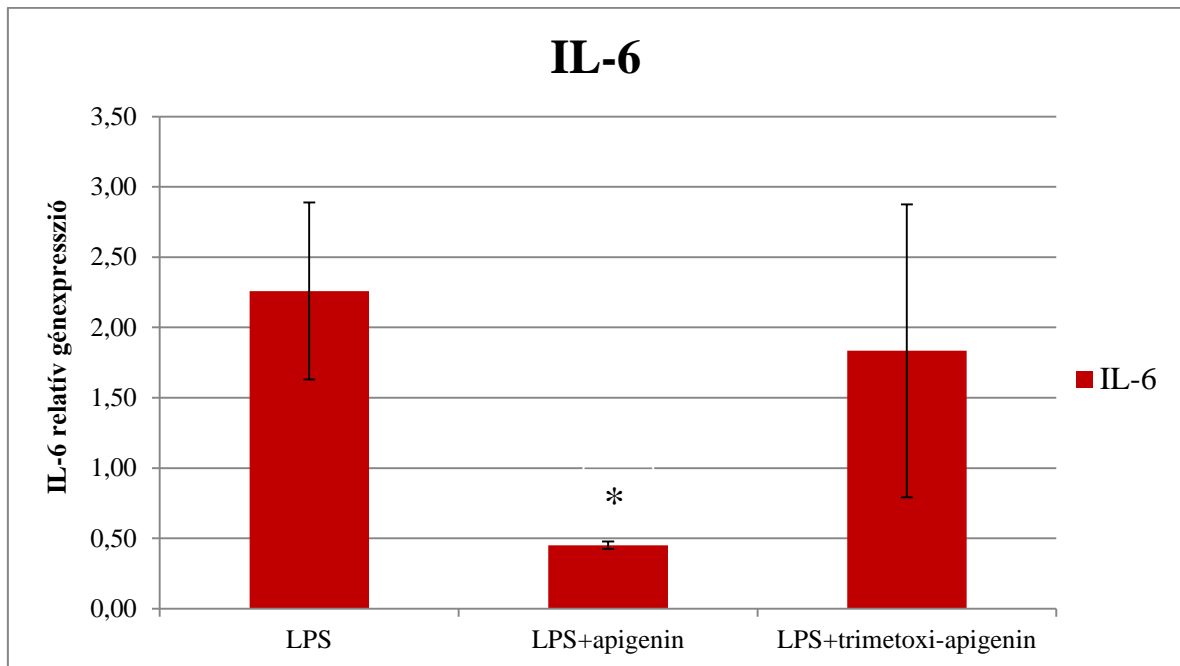
A Neutral red teszt során meghatároztuk az élő sejtek számát különböző koncentrációjú apigenin és trimetoxi-apigenin kezelést követően. Mindkét flavonoid esetében az alkalmazott koncentrációk 25, 50 és 100  $\mu\text{M}$  voltak. Ahogy az az 5. ábrán is jól látható, a kontroll, illetve a kontroll + 1% DMSO-t tartalmazó abszorbancia értékek átlagához képest 25  $\mu\text{M}$  apigenin és trimetoxi-apigenin hatására nem következett be számottevő abszorbancia értékbeli csökkenés. Ezzel szemben az 50 és 100  $\mu\text{M}$ -os kezelés hatására az abszorbancia értékek átlaga jelentősen csökkent. Mivel az 540 nm-en mért abszorbancia értéke és az élő sejtek száma között lineáris összefüggés van, jól látható, hogy míg 25  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban alkalmazva a flavonoidoknak nincs citotoxikus hatása, addig az ennél magasabb koncentráció használata a bélhámsejtek elhalását okozza. Ezek alapján választottuk kezelőoldatainknak a 25  $\mu\text{M}$ -os apigenin és trimetoxi-apigenin koncentrációt.



5. ábra Neutral red citotoxicitási teszt IPEC-J2 sejteken

## 5.2. Apigenin és trimetoxi-apigenin gyulladáscsökkentő hatása LPS-sel kezelt bélhámsejteken

### 5.2.1. Az IL-6 génexpressziójának változása

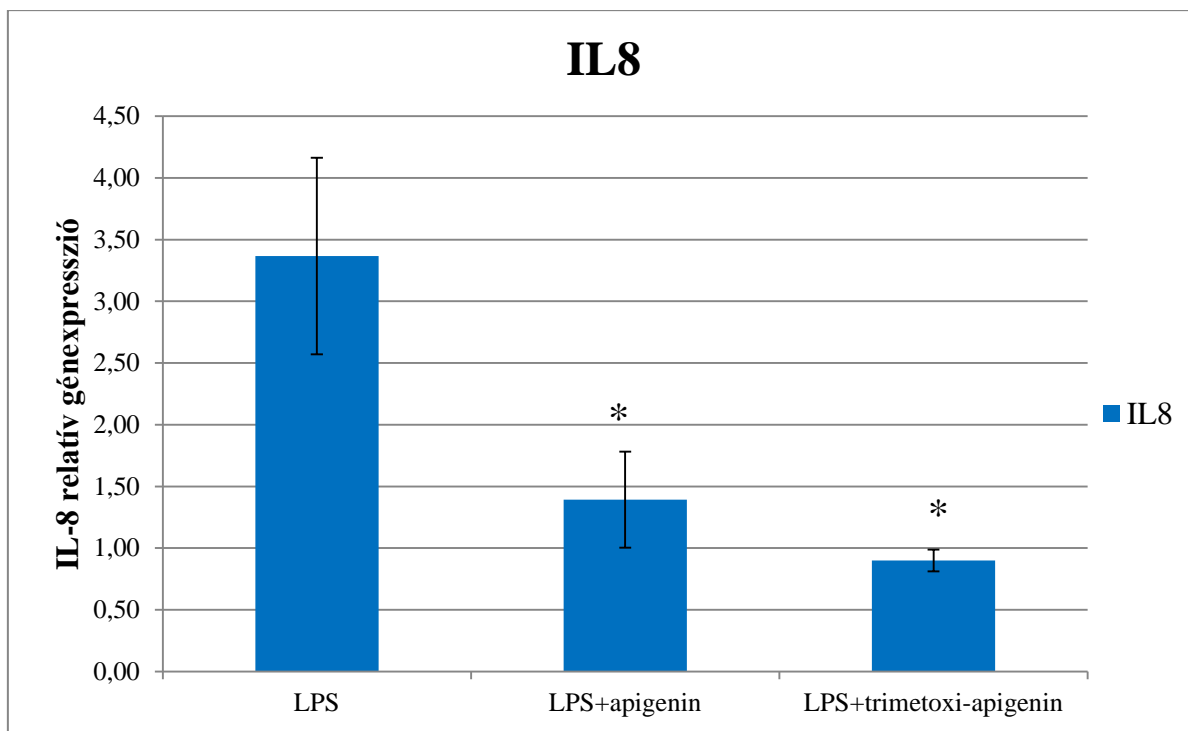


6. ábra Az IL-6 relatív génexpressziójának változása a bélhámsejtekben különböző kezelések hatására

A 10 µg/ml-es 1 órán át tartó LPS kezelés hatására az IL-6 relatív génexpressziós szintje szignifikánsan emelkedett ( $p=0,044$ ), csaknem két és félszeresére a kontroll sejtenyészetben mérhető IL-6 expressziójának. Kísérletünk során az apigenin (25 µM) szignifikánsan csökkenteni tudta az IL-6 génexpresszióját ( $p=0,0348$ ). Ezzel szemben a trimetoxi-apigenin (25 µM) kezelés hatására nem következett be jelentős csökkenés az IL-6 expresszióban (6. ábra).

### 5.2.2. Az IL-8 génexpressziójának változása

Az IL-8 relatív génexpressziójának szintje – ahogy az az IL-6 esetében is megfigyelhető volt – 1 órán át tartó 10 µg/ml-es LPS kezelés hatására szignifikánsan emelkedett ( $p=0,001$ ). Az expresszió növekedése körülbelül három és félszerese volt a kontroll sejtenyészetben megfigyelhető értéknek (7. ábra).

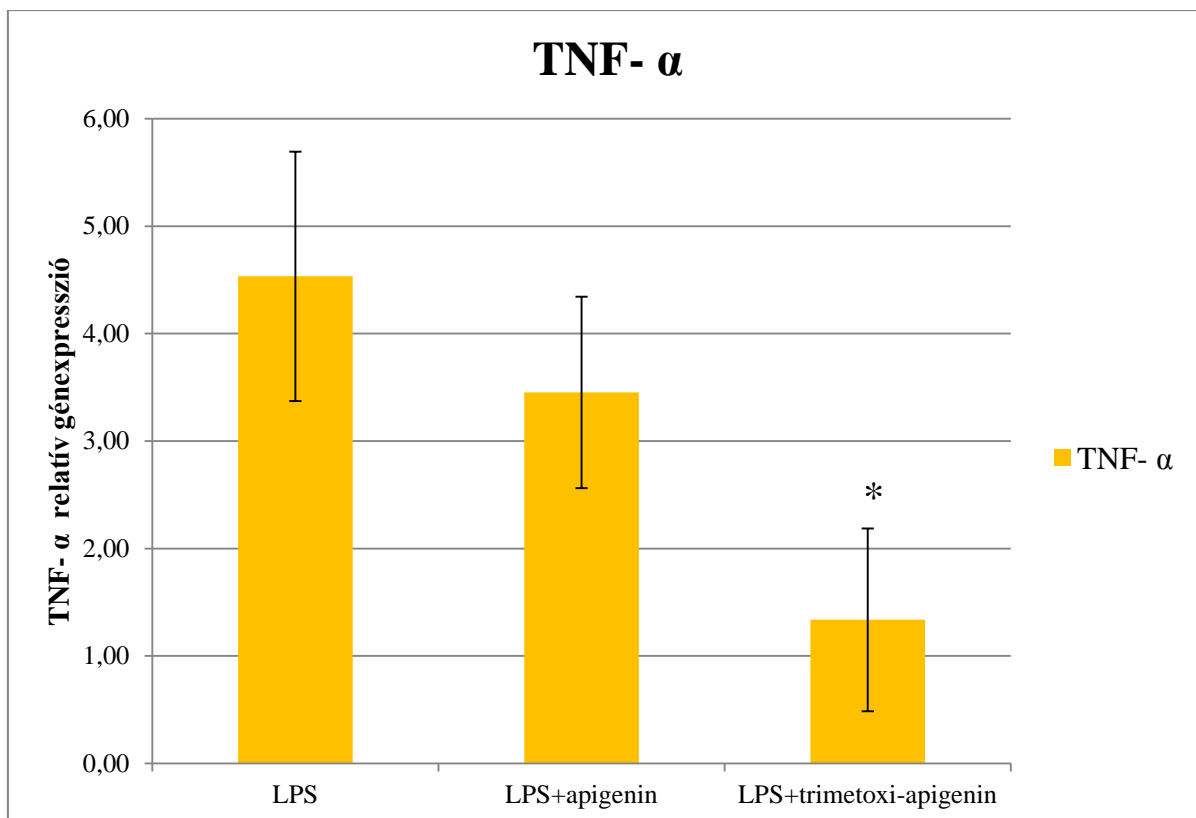


7. ábra Az IL-8 relatív génexpressziójának változása a bélhámsejtekben különböző kezelések hatására

Az IL-8 relatív génexpressziója LPS és apigenin (25  $\mu$ M), illetve LPS és trimetoxi-apigenin (25  $\mu$ M) együttes alkalmazásakor egyaránt szignifikánsan csökkent ( $p=0,009$  valamint  $p=0,0014$ ). Utóbbi flavonoid esetében a downreguláció mértéke valamelyest számottevőbb volt, de a két vegyület gyulladáscsökkentő hatása nem különbözött egymástól szignifikáns mértékben.

### 5.2.3. A TNF- $\alpha$ génexpressziójának változása

LPS-sel (10  $\mu$ g/ml) 1 órán keresztül történő inkubációt követően a vizsgált bélhámsejtekben a TNF- $\alpha$  relatív génexpressziója szignifikánsan emelkedett ( $p=0,018$ ). Ennek mértéke a kontroll sejtenyészethez képest csaknem ötszörös volt (8. ábra).

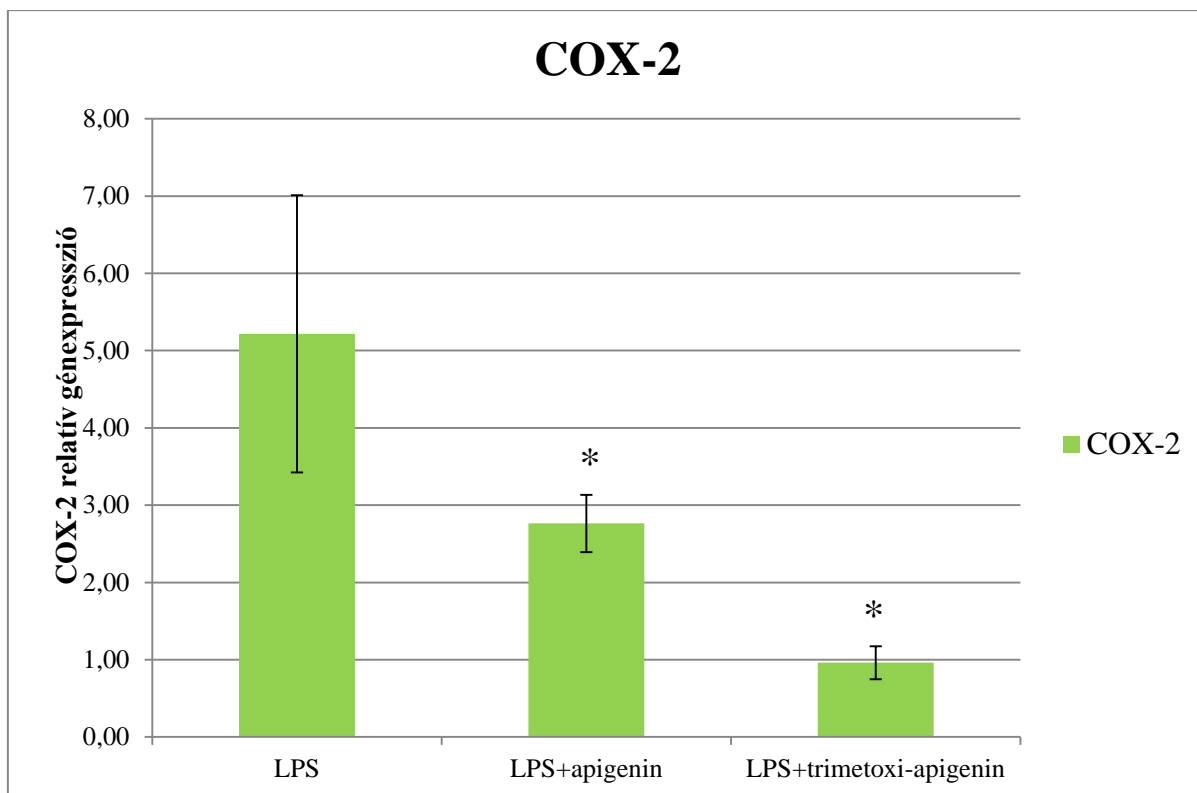


8. ábra A TNF- $\alpha$  relatív génexpressziójának változása a bélhámsejtekben különböző kezelések hatására

A TNF- $\alpha$  relatív génexpressziójának szintjét az LPS-sel együttesen alkalmazott trimetoxi-apigenin (25  $\mu$ M) szignifikánsan csökkentette ( $p=0,0081$ ). Ezzel szemben az apigeninnel (25  $\mu$ M) történt együttes kezelés hatására, a vizsgált gyulladási mediátor relatív expressziójának szignifikáns csökkenése nem volt tapasztalható.

#### 5.2.4. A COX-2 génexpressziójának változása

Ahogy az már az előbbieken szereplő gyulladási citokinek esetében is látható volt, LPS-sel 10  $\mu$ g/ml koncentrációban történő 1 órás kezelés hatására a COX-2 relatív génexpressziójának szintje is szignifikáns emelkedést mutatott ( $p=0,012$ ). Ez, a kontroll bélhámsejtekben tapasztalható értéknek több mint az ötszörösét jelentette (9. ábra).



9. ábra A COX-2 relatív génexpressziójának változása a bélhámsejtekben különböző kezelések hatására

A COX-2 esetében – csak úgy mint ahogy az az IL-8 vizsgálata során is megfigyelhető volt – mind az apigeninnel, mind a trimetoxi-apigeninnel történt együttes inkubáció hatására a relatív génexpresszió szintje csökkent ( $p=0,0287$  illetve  $p=0,0006$ ). A különbség az IL-8 esetében látottakhoz képest azonban az, hogy ebben az esetben a trimetoxi-apigenin gyulladáscsökkentő képessége szignifikánsan jobbnak bizonyult metoxilátlan analógjához képest ( $p=0,0264$ ).

## 6. Megbeszélés

Az apigenin *in vitro* gyulladáscsökkentő hatását már számos tanulmányban vizsgálták, noha ezekben a kutatásokban daganatos eredetű sejtvonalakat illetve immunsejteket használtak. LPS által stimulált humán perifériás mononukleáris sejteket apigenin jelenlétében inkubáltak, majd a TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  és IL-6 mennyiségét mérték a sejt kultúra felülúszójában (Hougee et al., 2005). Az apigenin dóziszfüggően gátolta a gyulladáshoz szükséges citokinek termelődését. Smolinski és munkatársai (Smolinski et al., 2003) egérből származó makrofág sejteket és egereket kezeltek LPS-sel és növényi alkotóelemekkel. Az IL-6 és TNF- $\alpha$  koncentráció változását ELISA segítségével mérték a szérumból, valamint a sejtek felülúszójából. Mindhárom növényi származék – beleértve az apigenint is – gátolta az LPS indukálta IL-6 és TNF- $\alpha$  mennyiségét az egérből származó makrofág sejt kultúrán. Az egereken végzett kísérletben viszont a két citokin termelésének a gátlása nem mutatott az *in vitro* sejt kultúrán tapasztalt eredményekhez hasonlókat. Az apigenin kezelés (3.7 mM illetve 37 mM) csökkentette az LPS-indukálta IL-6 szintet, de ezzel ellentétben a TNF- $\alpha$  termelését nem. Ezzel szemben a Mastuda és munkatársai (Mastuda et al., 2002) által végzett kutatás eredményei azt mutatták, hogy az apigenin (IC<sub>50</sub>=5.3 mM) gátolta az antigén-IgE-mediált TNF- $\alpha$  szekréciót RBL-2H3 mastocytá sejtken. Az apigenin nem csak a TNF- $\alpha$  termelését gátolta, hanem az iNOS expresszióját és következményesen a NO termelését is, LPS-aktivált makrofág sejtekben. Ez a tulajdonsága a flavonoidnak az NF- $\kappa$ B jelátviteli út gátlásával hozható összefüggésbe (Comalada et al., 2006). Az apigenin TNF- $\alpha$  szekrécióra kifejtett gátló hatása Comalada és munkatársainak vizsgálata során dóziszfüggő volt. A TNF- $\alpha$  felszabadulására, 25  $\mu$ M koncentráció alatt, csupán enyhe gátló hatást gyakorolt, míg 50  $\mu$ M-os koncentrációban 41,6%-kal csökkentette a TNF- $\alpha$  mennyiségét. Az általunk végzett vizsgálat során az IPEC-J2 sejtek apigeninnel való kezelése szignifikánsan csökkentette mind az IL-6, mind az IL-8 relatív génexpressziójának mértékét, összehasonlítva a csak LPS-sel kezelt sejtekkel. A TNF- $\alpha$  génexpressziójára azonban az apigenin nem volt hatással. Az eredményekben mutatkozó különbségek lehetséges oka az eltérő sejt kultúra és gyulladást indukáló anyag alkalmazásában keresendő.

Wang kutatása során (Wang et al., 2013) az apigenin gyulladáscsökkentő hatását vizsgálta *Helicobacter pylori* által fertőzött humán eredetű adenocarcinoma sejteken (MKN45), mely során az I $\kappa$ B, COX-2 és gyulladáshoz szükséges citokinek szintjeit mérte. Az apigenin (9.3-74  $\mu$ M) kezelés szignifikánsan csökkentette az I $\kappa$ B expresszióját és ezáltal az



NF- $\kappa$ B aktivációját is. Wang az IL-6, IL-8 és COX-2 expressziójának szintjében is jelentős csökkenést írt le.

A metoxiflavonok gyulladáscsökkentő hatásával máig csupán néhány tanulmány foglalkozott. A leginkább vizsgált metoxiflavonok a citrushéj alkotóelemei közé tartoznak. A nobiletin, naringin és hesperidin tartalmazó *Citrus aurantium* L kivonat, LPS által stimulált makrofágokon vizsgálva gátolta a különböző gyulladással mediátorok – citokinek, COX-2 és iNOS – felszabadulását, az NF- $\kappa$ B és a MAPK jelátviteli utak blokkolása révén (Kang et al., 2011). During és munkatársa (During & Larondelle, 2013) azt tanulmányozták, hogy vajon a metoxilált flavonok vagy a metilálatlan analógjaik képesek-e az intestinalis gyulladással válasz modulálására. Caco-2 sejteken IL-1 $\beta$  alkalmazásával indukáltak gyulladást, majd az apigenin, chrysin, luteolin és quercetin gyulladáscsökkentő hatását vizsgálták. Eredményeik azt mutatják, hogy a chrysin metoxilálása szignifikánsan javítja a gyulladáscsökkentő hatását, valószínűleg az NF- $\kappa$ B jelátviteli út befolyásolása által. Ez a jelenség azonban más flavonoid esetében nem volt tapasztalható. Továbbá sem az apigenin, sem a metilált analógja nem csökkentette szignifikánsan az IL-8 szintjét, míg az IL-6 koncentrációját mindkét flavonoid csökkentette. Az általunk végzett vizsgálatok során a trimetoxi-apigeninnel (25  $\mu$ M) történt kezelés hatására az IL-8, TNF- $\alpha$  és a COX-2 relatív génexpressziója egyaránt csökkent, míg az IL-6 expressziójára az apigenin metoxilált analógja nem volt hatással. Továbbá a COX-2 génexpressziójának csökkentése tekintetében a trimetoxi-apigenin szignifikánsan jobbnak bizonyult az apigeninnél.

Úgy tűnik tehát, hogy a hidroxiflavonok és a metoxilált analógjaik esetében is ugyanaz a jelátviteli út állhat a hatásmechanizmusuk hátterében. Ennek pontos felderítése azonban mind a hidroxiflavonok, mind a metoxiflavonok esetében további vizsgálatokat igényel.

## 7. Összefoglalás

A flavonoidok az elmúlt években kerültek a figyelem középpontjába, antioxidáns hatásuknak köszönhetően. Emellett számos egyéb jótékony tulajdonsággal is rendelkeznek (pl. daganatellenes, allergia ellenes és gyulladáscsökkentő hatás), és ezáltal mind a humán mind az állatorvosi gyógyászatban számos területen felhasználhatóvá válhatnak. Gyulladáscsökkentő hatásukból eredően alkalmasak lehetnek a nem szteroid gyulladásgátlók helyettesítésére, ezzel csökkentve a mellékhatásokat. Antioxidáns és gyulladáscsökkentő tulajdonságuknak köszönhetően felhasználhatóak a haszonállatok körében, mint hozamfokozó szerek. Kísérletünk során két flavonoid, az apigenin és metoxilált származéka a trimetoxi-apigenin, bélhámsejteken kifejtett gyulladáscsökkentő hatását vizsgáltuk.

A vizsgálathoz az IPEC-J2, sertésből származó vékonybél (jejunum) eredetű epithel sejtvonalat használtuk, melyet kollagénnel bevont poliészter membrán inzerten tenyésztettünk. A sejtek növekedési szakaszában a sejtréteg integritását transzepitheliális elektromos ellenállásméréssel kísértük figyelemmel. A gyulladás indukálására bakteriális lipopoliszacharidot (LPS) használtunk. A gyulladásos válasz mértékének meghatározására az IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  and COX-2 mRNS expressziójának szintjét mértük real-time PCR segítségével. A teszteléshez az apigenin és a trimetoxi-apigenin esetében is a 25  $\mu$ M koncentrációt választottuk.

Az LPS (10  $\mu$ g/ml) kezelés hatására az összes vizsgált gyulladásos citokin relatív génexpressziója szignifikánsan emelkedett. Az apigenin szignifikánsan csökkentette az IL-6 génexpresszióját, ezzel szemben a trimetoxi-apigenin esetében ez nem volt tapasztalható. Az IL-8 relatív expresszióját az apigenin és a trimetoxi-apigenin egyaránt szignifikánsan csökkentette. A sejtek trimetoxi-apigeninnel és LPS-sel történt együttes kezelése a TNF- $\alpha$  relatív génexpressziójának csökkenését eredményezte, míg az apigeninnel történt együttes kezelés során ez nem volt megfigyelhető. A COX-2 relatív expresszióját mindkét flavonoid csökkentette, azonban a trimetoxi-apigenin gyulladás-csökkentő hatása szignifikánsan jobbnak bizonyult az apigeninnél.

Az apigenin és a trimetoxi-apigenin egyaránt képesek az LPS indukálta gyulladás csökkentésére. Pontos hatásmechanizmusuk megismerése és a gyulladás-csökkentő aktivitásukban mutatott különbségek megértése további kutatások tárgyát képezik, csak úgy, mint az *in vivo* végzett gyulladás-csökkentő vizsgálatok.

## 8. Summary

In the past few years there have been a greater interest in flavonoids, due to their antioxidant activity. Furthermore, several properties have been ascribed to flavonoids such as anti-cancer, antiallergic and anti-inflammatory effect. For these reasons is feasible to use them both in human and veterinary medicine, for example as a promising new class of anti-inflammatory agents with less side-effects than the non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Moreover, the antioxidant activity and the fact that flavonoids are able to moderate the inflammatory response enable to use them as growth promoter in livestock production. Our aim is to investigate the anti-inflammatory effect of apigenin and its trimethylated analogue, trimethoxyapigenin on intestinal epithelial cells.

In the experiments IPEC-J2 non-transformed swine intestinal epithelial cells were used. The cells were seeded onto collagen-coated polyester membrane inserts. In the growth period the cell monolayer integrity was controlled by transepithelial electrical resistance measurement. Inflammation was evoked by bacterial lipopolysaccharide (LPS). The levels of IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  and COX-2 gene-expression were measured by real-time PCR. Both the apigenin and the trimethoxyapigenin concentration was 25  $\mu$ M.

After 10  $\mu$ g/ml LPS treatment the relative gene expression of all the assayed proinflammatory cytokines were significantly increased. The gene expression of IL-6 was significantly decreased by apigenin. Trimethoxy-apigenin did not influence the IL-6 mRNA level. Both apigenin and trimethoxyapigenin reduced the level of IL-8 expression significantly. Treatment with trimethoxyapigenin lowered the gene expression of TNF- $\alpha$ , while apigenin did not show that activity. Apigenin as well as trimethoxyapigenin caused significant reduction in the level of COX-2 gene expression, but the methylated analogue proved to be more effective than the unmethylated one.

In conclusion, our results suggest that both apigenin and trimethoxyapigenin can modulate the LPS activated intestinal inflammatory response. Further research should deal with understanding the exact mechanism that lie behind their anti-inflammatory properties and unravelling the differences in the bioactivity of the methylated and unmethylated analogues. Nevertheless, there is specified need of *in vivo* studies.

## 9. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék nyilvánítani elsősorban témavezetőmnek, Dr. Farkas Orsolyának a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék tudományos munkatársának, hogy szívesen fogadott és munkámat mindvégig segítette.

Köszönöm Palócz Orsolya biológusnak, a kísérletek során nyújtott segítségét.

Köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Dr. Gálfi Péternek, a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék vezetőjének, hogy biztosította a feltételeket kísérleteinkhez, a tudományos diákköri munkámhoz.

Továbbá köszönöm mindenkinek, aki bármilyen módon, akár fizikailag vagy szellemileg aktívan, akár csak egy biztató, támogató szóval hozzájárult munkám megszületéséhez.

## 10. Irodalomjegyzék

- BÚFALO, M. C. et al.: Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF- $\kappa$ B and MAPK activation in macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013. 149. vol. 84-92. p.
- CAMUESCO, D. et al.: The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *British Journal of Pharmacology*, 2004. 143. vol. 908-918. p.
- CAVALCANTE, SH. et al.: Lignoids from the fruit of three *Viola* species. *Phytochemistry*, 1985. 24. vol. 1865-1866. p.
- CHOI, S. Y. et al.: Correlation between flavonoid content and the NO production inhibitory activity of peel extracts from various citrus fruits. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2007. 30. vol. 772-778. p.
- COMALADA, M. et al.: Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: Analysis of the structure-activity relationship. *Biochemical Pharmacology*, 2006. 72. vol. 1010-1021. p.
- COOK, N. C.; SAMMAN, S.: Flavonoids: Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 1996. 7. vol. 66-76. p.
- COS, P. et al.: Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, 1998. 61. vol. 71-76. p.
- DAS, A. et al.: Flavonoids activated caspases for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells but in human normal astrocytes. *Cancer*, 2010. 116. vol. 164-176. p.
- DURING, A.; LARONDELLE, Y.: The O-methylation of chrysin markedly improves its intestinal anti-inflammatory properties: Structure-activity relationships of flavones. *Biochemical Pharmacology*, 2013. 86. vol. 1739-1746 p.
- ELLIOT, A. J. et al.: Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. *Biochemical Pharmacology*, 1992. 44. vol. 1603-1608. p.
- FAGARASAN, S. HONJO, T.: Intestinal IgA-synthesis: regulation of front-line body defences. *Nature Reviews Immunology*, 2003. 3. vol. 63-72. p.
- FATEHI, M. et al.: The beneficial effects of protein tyrosine kinase inhibition on the circulatory failure induced by endotoxin in the rat. *Shock*, 2002. 18. vol. 450-455. p.
- FEKETE S. et al.: Állatorvosi takarmányozás és dietetika. Budapest: Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Budapest, 2009. 616. p.
- FUNAKOSHI-TAGO, M. et al.: Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, Apigenin, Luteolin and Fisetin. *International Immunopharmacology*, 2011. 11. vol. 1150-1159. p.
- GARCEA, G et al.: Detection of curcumin and its metabolites in hepatic tissue and portal blood of patients following oral administration. *British Journal of Cancer*, 2004. 90. vol. 1011-1015. p.
- GOLDBERG, DM. et al.: Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices in healthy subjects. *Clinical Biochemistry*, 2003. 36. vol. 79-87. p.
- HA, S.K. et al.: Apigenin inhibits the production of NO and PGE2 in microglia and inhibits neuronal cell death in a middle cerebral artery occlusion-induced focal ischemia mice model. *Neurochemistry International*, 2008. 52. vol. 878-886. p.
- HAMMERSTONE, J. F. et al.: Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *Journal of Nutrition*, 2000. 130. vol. 2086S-2092S p.
- HAN, R.M. et al.: Comparison of flavonoids and isoflavonoids as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009. 57. vol. 3780-3785. p.

- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A.: Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 2000. 55. vol. 481-504. p.
- HEIM, K. E. et al.: Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2002. 13. vol. 572-584. p.
- HENDRIKS, JJ. et al.: Flavonoids influence monocytic GTPase activity and are protective in experimental allergic encephalitis. *Journal of Experimental Medicine*, 2004. 200. vol. 1667-1672. p.
- HERTOG, M. G. L. et al.: Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet*, 1993. 342. vol. 1007-1011. p.
- HIRANO, R. et al.: Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 2001. 47. vol. 357-362. p.
- HOUGEE, S. et al.: Decreased pro-inflammatory cytokine production by LPS-stimulated PBMC upon in vitro incubation with the flavonoids apigenin, luteolin or chrysin, due to selective elimination of monocytes/macrophages. *Biochemical Pharmacology*, 2005. 69. vol. 241-248. p.
- JAIPETCH, T. et al.: Flavonoids in the black rhizomes of *Boesenbergia pandurata*. *Phytochemistry*, 1983. 22. vol. 625-626. p.
- JUNG, W.K. et al.: Caffeic acid phenethyl ester protects mice from lethal endotoxin shock and inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase 2 and inducible nitric oxide synthase expression in Raw 264.7 macrophages via the p38/ERK and NF- $\kappa$ B pathways. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2008. 40. vol. 2572-2582. p.
- KANG, S.R. et al.: Anti-inflammatory effect of flavonoids isolated from Korea Citrus aurantium L. on lipopolysaccharide-induced mouse macrophage RAW 264.7 cells by blocking of nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathways. *Food Chemistry*, 2011. 129. vol. 4. no. 1721-1728. p.
- KANG, YG. et al.: 5,7-dimethoxyflavone induces melanogenesis in B16F10 melanoma cells through cAMP-dependent signalling. *Experimental Dermatology*, 2011. 20. vol. 445-447. p.
- KARSAI F.; VÖRÖS K.: Állatorvosi belgyógyászat I. kötet 2. kiad. Budapest: PrimaVet, 1992. 584.p.
- KARSAI F.; VÖRÖS K.: Állatorvosi belgyógyászat II. kötet 3. kiad. Budapest: Magyar Állatorvosi Kamara, 2013. 655. p.
- KAWAGUCHI, K. et al.: A citrus flavonoid hesperidin suppresses infection-induced endotoxin shock in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2004. 27. vol. 679-683. p.
- KHAN, MS. et al.: Methylated chrysin induces co-ordinated attenuation of the canonical Wnt and NF- $\kappa$ B signaling pathway and upregulates apoptotic gene expression in the early hepatocarcinogenesis rat model. *Chemico-Biological Interactions*, 2011. 193. vol. 12-21. p.
- KIM, HJ. et al.: Effects of hydroxyl group numbers on the B-ring of 5,7-dihydroxyflavones on the differential inhibition of human CYP 1A and CYP1B1 enzymes. *Archives of Pharmacal Research*, 2005. 28. vol. 1114-1124. p.
- KONDO, K. et al.: Inhibition of LDL oxidation by cocoa. *Lancet*, 1996. 348. vol. 1514-1518. p.
- KUROWSKA, E.M.; MANTHEY, J. A.: Hypolipidemic effects and absorption of citrus polymethoxylated flavones in hamsters with diet-induced hypercholesterolaemia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004. 52. vol. 2879-2886. p.
- LAI, C. S. et al.: Inhibitory effect of citrus 5-hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone on 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced skin inflammation and tumor promotion in mice. *Carcinogenesis*, 2007. 28. vol. 2581-2588. p.
- LAM, KC. et al.: Structure, function and evolution of plant O-methyltransferases. *Genome*, 2007. 50. vol. 1001-1013. p.

- LEE, J.H. et al.: Anti-inflammatory mechanisms of apigenin: Inhibition of cyclooxygenase-2 expression, adhesion of monocytes to human umbilical vein endothelial cells, and expression of cellular adhesion molecules. *Archives Of Pharmacal Research*, 2007. 30. vol. 1318–1327. p.
- LEOPOLDINI, M. et al.: Structure, conformation, and electronic properties of apigenin, luteolin, and taxifolin antioxidant. A first principle theoretical study. *Journal of Physical Chemistry*, 2004. 108. vol. 92–96. p.
- LI, Q.; VERMA, I.M.: NF-kappaB regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 2002. 2. vol. 725–734. p.
- LI, S. et al.: Chemistry and health effects of polymethoxyflavones and hydroxylated polymethoxyflavones. *Journal of Functional Foods*, 2009. 1. vol. 2-12. p.
- LIANG, YC. et al.: Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, 1999. 20. vol. 10. no. 1945–1952. p.
- LIN, N. et al.: Novel anti-inflammatory actions of nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, on human synovial fibroblasts and mouse macrophages. *Biochemical Pharmacology*, 2003. 65. vol. 2065-2071. p.
- LU, H. et al.: Enzymology of methylation of tea catechins and inhibition of catechol-O-methyltransferase by (-)-epigallocatechin gallate. *Drug Metabolism and Disposition*, 2003. 31. vol. 572-579. p.
- MANACH, C.; DONOVAN, J.L.: Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radical Research*, 2004. 38. vol. 771-785. p.
- MASTUDA, H. et al.: Structural requirements of flavonoids for inhibition of antigen-Induced degranulation, TNF-alpha and IL-4 production from RBL-2H3 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2002. 10. vol. 10. no. 3123-3128. p.
- MAZUR, A. et al.: Inhibitory effect of procyanidin-rich extracts on LDL oxidation in vitro. *Atherosclerosis*, 1999. 145. vol. 421-422. p.
- MIEAN, K.H.; MOHAMED, S., Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001. 49. vol. 3106–3112. p.
- MURAKAMI, A. et al.: Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress, and tumor promotion in mice. *Cancer Research*, 2000a. 60. vol. 5059-5066. p.
- MURAKAMI, A. et al.: Suppressive effects of citrus fruits on free radical generation and nobiletin, an anti-inflammatory polymethoxyflavonoid. *Biofactors*, 2000b. 12. vol. 187-192. p.
- MURAKAMI, A. et al.: Zingiberaceous and citrus constituents, 1'-acetoxychavicol acetate, zerumbone, auraptene, and nobiletin, suppress lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 murine macrophages through different modes of action. *Journal of Nutrition*, 2005. 135. vol. 2987S-2992S. p.
- NICHOLAS, C. et al.: Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced lethality in vivo and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF- $\kappa$ B through the suppression of p65 phosphorylation. *Journal of Immunology*, 2007. 179. vol. 7121–7127. p.
- NISSINEN, E. et al.: Catechol-O-methyltransferase activity in human and rat small intestine. *Life Science*, 1988. 42. vol. 2609-2614.p
- PELLETIER, JP: et al.: Synthesis of metalloproteases and interleukin 6 (IL-6) in human osteoarthritic synovial membrane is an IL-1-mediated process. *Journal of Rheumatology Supplement*, 1995. 43. vol. 109-114. p.

- PLATANIAS, L.C.: Map kinase signaling pathways and hematological malignancies. *Blood*, 2003. 101. vol. 4667–4679. p.
- RAHMAN, I. et al.: Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, 2006. 72. vol. 1439-1452. p.
- RASO, GM. et al.: Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774a.1. *Life Sciences*, 2001. 68. vol. 8. no. 921-931. p.
- RICE-EVANS, C. A. et al.: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 1996. 20. vol. 933-956. p.
- RICE-EVANS, C. A. et al.: The relative activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 1995. 22. vol. 375-383. p.
- ROMIER, B. et al.: Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. *Nutrition Reviews*, 2009. 67. vol. 363-378. p.
- SAITO, T. et al.: Nobiletin enhances differentiation and lipolysis of 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2007. 357. vol. 371-376. p.
- SAWASDEE, P. et al.: Anticholinesterase activity of 7-methoxyflavones isolated from *Kaempferia parviflora*. *Phytotherapy Research*, 2009. 23. vol. 1792-1794. p.
- SEGER, R.; KREBS, E. G.: The MAPK signalling cascade. The FASEB Journal; Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 1995. 9. vol. 726-735. p.
- SEKHER, P. et al.: Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001. 282. vol. 1161–1168. p.
- SMOLINSKI, A.T.; Pestka, J.J.: Modulation of lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine production in vitro and in vivo by the herbal constituents apigenin (chamomile), ginsenoside Rb1 (ginseng) and parthenolide (feverfew). *Food and Chemical Toxicology*, 2003. 41. vol. 1381–1390. p.
- SOOKKONGWAREE, K et al.: Inhibition of viral proteases by Zingiberaceae extracts and flavones isolated from *Kaempferia parviflora*. *Pharmazie*, 2006. 61. vol. 717-721. p.
- SPENCER, J. P. E. et al.: Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004. 423. vol. 148-161. p.
- TANAKA, K. et al.: Control of I $\kappa$ B $\alpha$  proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochimie*, 2001. 83. vol. 351–356. p.
- TANG, M. et al.: Protective effects of citrus nobiletin and auraptene in transgenic rats developing adenocarcinoma of prostate (TRAP) and human prostate carcinoma cell. *Cancer Science*, 2007. 98. vol. 471-477. p.
- TEP-AREENAN, P. et al.: Possible mechanisms of vasorelaxation for 5,7-dimethoxyflavone from *Kaempferia parviflora* in the rat aorta. *Phytotherapy Research*, 2010. 24. vol. 1520-1525. p.
- TUBOLY S.: Állatorvosi járványtan I. Budapest: Mezőgazda Kiadó. 1998. 611. p.
- VAN DE LOO, FA et al.: Role of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction. Effect of in situ blocking murine antigen- and zymosan-induced arthritis. *Arthritis and Rheumatology*, 1995. 38(2). vol. 164-172. p.
- WALLE, T. et al.: Disposition and metabolism of the flavonoid chrysin in normal volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2001. 21. vol. 143-146. p.
- WALLE, T. et al.: High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metabolism and Disposition*, 2004. 32. vol. 1377-1382. p.
- WALLE, T.: Methoxylated flavones, a superior cancer chemopreventive flavonoid subclass? *Seminars in Cancer Biology*, 2007. 17. vol. 354-362. p.



- WANG, Y.C.; Huang, K.M.: In vitro anti-inflammatory effect of apigenin in the *Helicobacter pylori*-infected gastric adenocarcinoma cells. *Food Chem Toxicol*, 2013. 53. vol. 376-383. p.
- WEN, X. et al.: 5,7-Dimethoxyflavone downregulates CYP1A1 expression and benzo[a]pyrene-induced DNA binding in Hep G2 cells. *Carcinogenesis*, 2005. 26. vol. 803-809. p.
- WEN, X.; WALLE, T.: Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability. *Drug Metabolism and Disposition*, 2006. 34. vol. 305-330. p.
- WEN, X.; WALLE, T.: Methylation protects dietary flavonoids from rapid hepatic metabolism. *Xenobiotica*, 2006. 36. vol. 387-397. p.
- WRIGHT, B. et al.: A structural basis for the inhibition of collagen-stimulated platelet function by quercetin and structurally related flavonoids. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2010. 159. vol. 1312–1325. p.
- YENJAI, C. et al.: Bioactive flavonoids from *Kaempferia parviflora*. *Fitoterapia*, 2004. 75. vol. 89-92. p.
- YOCHUM, L. et al.: Dietary flavonoid intake and the risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *American Journal of Epidemiology*, 1999. 149. vol. 943-949.p.
- YUAN, L.H. et al.: Inhibition of PKB/Akt activity involved in apigenin-induced apoptosis in human gastric carcinoma cells. *Chinese Science Bulletin*, 2007. 52. vol. 2226–2232. p.
- ZHANG, L. et al.: Three flavonoids targeting the b-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase from *Helicobacter pylori*: crystal structure characterization with enzymatic inhibition assay. *Protein Science*, 2008. 17. vol. 1971–1978. p.