

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

**Probiotikumok aktív anyagcseretermékeinek hatása az emésztőrendszeri
oxidatív károsodások megelőzésében**

Készítette: Marosi András (4. évfolyam)

Témavezetők: Dr. Pásztiné Dr. Gere Erzsébet
SZIE ÁOTK, PhD hallgató

Dr. Gálfi Péter
SZIE ÁOTK, tanszékvezető, egyetemi tanár

Budapest

2011

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
2.1. Az oxidatív stressz.....	7
2.2. A citokinek és szerepük a gyulladásban.....	9
2.3. A hő sokkfehérjék.....	11
2.4. Probiotikumok.....	11
2.5. Az IPEC-J2 sejt vonal.....	13
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	15
3.1. IPEC-J2 sejtek tenyésztése.....	15
3.2. Lactobacillus plantarum 2142 probiotikum törzs tenyésztése és sejtmentes felülszójának előállítása.....	16
3.3. IPEC-J2 sejtek kezelése.....	16
3.4. A génexpressziók meghatározása kvantitatív real-time PCR-rel (qPCR).....	17
3.4.1. RNS-izolálás.....	17
3.4.2. Reverz transzkripció.....	19
3.4.3. qPCR.....	19
3.4.4. A PCR-termékek ellenőrzése.....	20
3.4.5. A relatív génexpresszió meghatározása és adatelemzés.....	21
3.5. IL-8-termelés meghatározása szendvics-ELISA módszerrel.....	21
3.6. IPEC-J2 sejtek vitalitásának vizsgálata oxidatív stressz esetén.....	22
3.7. Az IPEC-J2 sejtekben oxidatív hatására fellépő lipidperoxidáció mérése.....	23
3.8. Lactobacillus plantarum 2142 specifikus fehérjetermékeinek kimutatása.....	23
4. EREDMÉNYEK.....	25
4.1. A Lactobacillus plantarum 2142 felülszójának hatása a hidrogén-peroxiddal kezelt IPEC-J2 sejtek génexpressziójára.....	25
4.2. Szerves savak hatása a sejtek génexpressziójára oxidatív stresszben.....	27
4.3. IL-8 szintézis az oxidatív hatás mértékétől függően IPEC-J2 sejtekben.....	29
4.4. A hidrogén-peroxid kezelés kiváltotta sejthalál IPEC-J2 sejteken.....	30
4.5. Oxidatív stressz okozta lipidperoxidáció IPEC-J2 sejteknél.....	31
4.6. A Lactobacillus plantarum 2142 specifikus fehérje- és peptidtermékei.....	32
5. MEGBESZÉLÉS.....	34
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	37
7. MELLÉKLETEK.....	38
8. Summary.....	39
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	41
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	44

Rövidítések jegyzéke

CD és CT = konjugált diének és triének

Ct = threshold cycle, küszöbciklus

CycA = ciklofilin-A

DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole

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

EDTA = etilén-diamin-tetraacetát

EGF = epidermális növekedési faktor

ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay

FBS = fetális borjúsavó

GALT = gut-associated lymphoid tissue

GM-CSF = granulocita makrofág kolóniastimuláló faktor

GSH = glutation

GSH-Px = glutation-peroxidáz

HNE = 4-hidroxi-2-nonenál

HPRT = hipoxantin foszforibozil-transzferáz

Hsp70 = Heat shock protein 70

IBD = inflammatory bowel disease (gyulladásos bélbetegség)

IFN- γ = interferon- γ

IgA = immunglobulin A izotípus

IL-8 = interleukin-8

Lp 2142 = *Lactobacillus plantarum* 2142

MDA = malondialdehyd

MRS = de Man, Rogosa és Sharpe-féle *Lactobacillus* tápleves

NADP = nikotinsavamid-adenozin-dinukleotid-foszfát

PBS = phosphate buffered saline

PUFA = polyunsaturated fatty acid (többszörösen telítetlen zsírsav)

ROS = reactive oxygen species (reaktív oxigén származékok)

SDS-PAGE = SDS(nátrium dodecil szulfát)-poliakrilamid-gélelektroforézis

SMSz = sejtmentes felülúszó/sejtmentes szűrlet (SCS: spent culture supernatant)

SOD = szuperoxid-dizmutáz

TER = transzepitheliális elektromos rezisztencia

TJ = tight junction

TLR = toll-like receptor

TNF- α = tumor nekrozis faktor- α

1. BEVEZETÉS

Az állati szervezetben az élettani sejtműködés része, hogy reaktív oxigén származékok (ROS) képződnek számos biokémiai folyamat eredményeként. Ezek a kiemelkedő kémiai reaktivitású és ennek következtében igen instabil, oxigéntartalmú molekulák reakcióba lépnek a sejtalkotó struktúrák fehérje, lipid és nukleinsav építőköveivel módosítva ezzel a fiziológias funkciókhoz szükséges optimális térbeli szerkezetüket. Az oxidatív károsító hatás bizonyos esetekben kifejezetten előnyös, például a neutrofil granulociták a fagocitózissal felvett idegen anyagokat szabadgyök-képződéssel járó folyamatok során hatástalanítják (NADPH-oxidáz és mieloperoxidáz enzimaktivitás). A mitokondriumokban zajló terminális oxidáció köztitermékeiként, valamint az anaerob dehidrogenáz enzimszrendszerek működése által is folyamatosan képződnek reaktív oxigén származékok a szervezetben. A sejtkárosító hatások kivédése céljából az evolúció során összetett védekezőrendszerek [1] alakultak ki, amelyek képesek a szabadgyököket, és a potenciálisan szabadgyökké alakuló peroxidokat semlegesíteni, és az általuk okozott károsodásokat ellensúlyozni. Az antioxidáns hatásért egyrészt specifikus enzimek felelősek, mint a szuperoxid-dizmutáz (SOD), a kataláz vagy a glutation-peroxidáz (GSH-Px); másrészt nélkülözhetetlen szereppel bírnak egyes vitaminok (tokoferolok, karotinoidok, aszkorbinsav) szabadgyökfogó hatásuknak köszönhetően. Az érzékeny visszacsatolásokkal fenntartott sejtszintű redox homeosztázis könnyen felborulhat, ha az oxidatív túlsúlyt kompenzáló antioxidáns védekező rendszerek kimerülnek.

Napjainkban nagyságrendekkel több a környezeti ártalom, mint korábban, aminek következtében a szervezetet érő az oxidatív terhelés jelentős mértékben fokozódott. A hibás, vitaminhiányos táplálkozás és az állati takarmányozás az antioxidánsok relatív hiányához vezethet. Mindezek miatt a védekezőrendszerek gyakran nem tudnak egyensúlyt tartani a szabadgyökök képződésével, így oxidatív stressz alakul ki [2, 3]. Egyre több humán és állati megbetegedés hátterében válik ismertté az oxidatív stressz jelentősége. Szerepét számos neurológiai [4] és cardiovascularis [5] kórkép, krónikus máj- és vesebetegségek [6], a carcinogenesis [7] és az idült gyulladások [8] kórfejlődésében komoly kutatások igazolták. Az oxidatív stressz sokféle fertőző betegség hajlamosító tényezője is lehet: az oxidatív károsodásokat szenvedett szövetekben a kórokozók szaporodása felgyorsul.

A bélcsatornában a reaktív oxigén származékok (hasonlóan egyes kémiai anyagokhoz és bakteriális toxinokhoz) gyulladásos citokinek termelődését váltják ki az enterocytákban [9], ezzel hozzájárulnak a bélgyulladások kialakulásához és súlyosbodásához. Az oxidatív túlsúly a sejtmembránok lipidperoxidációját és sejthalált is okozhat a bélhámsejtek között [10].

A probiotikumok jótékony hatásai az emésztőrendszerre régóta ismertek. Alkalmazásuk az utóbbi években rohamosan növekszik, mind az emberi, mind az állati egészségmegőrzés céljából: különösen az emésztési zavarok, a bélcsatorna egyes betegségei és tartós *per os* antibiotikum-

terápia esetén gyakori a használatuk. Az állattenyésztést érintő további lényeges szerepük, hogy hozamfokozóként is alkalmazhatók, ami különösen a hasonló célra használt kis-dózisú antibiotikumok Európai Unió betiltása óta került előtérbe.

A probiotikumok eredményessége a gastrointestinalis betegségek megelőzésében figyelemreméltó: a bélcsatornát kolonizálva kiszorítják a patogén mikroorganizmusokat, bakteriocineket termelnek [11], immunmodulátor hatásúak [12], erősítik a bélhámsejtek közötti tight junction (TJ) sejtkapcsoló struktúrákat, stabilizálva ezzel a hámréteg integritását [13]. Az általuk termelt bioaktív molekulák szabályozzák a sejtek anyagcseréjét és válaszát a sejtkárosító hatásokra, így az oxidatív stressz okozta gyulladásos folyamatok visszaszorításában is jelentőségük van. E gyulladáscsökkentő hatás pontos mechanizmusa részleteiben még nem tisztázott, de az egyik fő támadáspont lehet a citokinek bélbeli termelődésének befolyásolása [14]. Amennyiben a probiotikus baktériumok, vagy azok egyes anyagcseretermékei képesek csökkenteni a gyulladásos citokinek termelődését a bélhámsejtekben, az jelentősen csökkentheti az oxidatív stressz- okozta gyulladást és sejtkárosodást a bélcsatornában. Ezért azt vizsgáltuk, hogy a *Lactobacillus plantarum* 2142 (Lp 2142) probiotikum törzs – amely a tanszéken folyó kutatások szűrési eredményei alapján a vizsgált törzsek közül a legeredményesebben csökkentette a gyulladást – sejtmentes felülúszója hogyan hat a bélhámsejtek gyulladásos citokin-termelésére. A kísérleteket *in vitro* sertés jejunum bélhámsejtvonalon (IPEC-J2) végeztük, amelyen az oxidatív stresszt hidrogén-peroxid oldattal váltottuk ki. A probiotikum felülúszójával történt kezelést követően meghatároztuk két gyulladásos citokin (az IL-8 és a TNF- α), valamint a sejtvédő hatású 70 kDa-os hősokkfehérje (Hsp70) génexpresszióját a sejtekben.

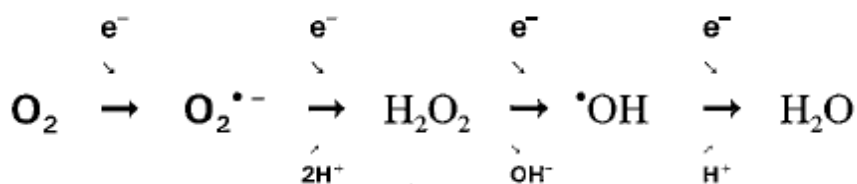
További kérdésként merült fel, hogy a probiotikumok sokféle bioaktív terméke közül melyek felelősek az oxidatív sejtkárosodások elleni védőhatásért. A tejsavbaktériumok legnagyobb mennyiségben rövid szénláncú szerves savakat termelnek [15], ezért bizonyos szerves savak (ecetsav, tejsav) citokin-expresszióra gyakorolt hatását is tanulmányoztuk IPEC-J2 sejteken. Sertés-specifikus ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) kittel meghatároztuk hidrogén-peroxid hatására termelt IL-8 mennyiségét az apikális és bazolaterális médiumokban különböző inkubációs idők után. Mivel a fehérjetermészetű anyagok szerepe jelentős lehet a védőhatásban, a Lp 2142 felülúszójából különböző fehérje összetevőket mutattunk ki.

A vizsgálatok távlati célja olyan aktív komponens izolálása (és részletes hatásmechanizmusának felderítése) a bakteriális termékek közül, amely izolált hatóanyagként hosszú távon, biztonságosan alkalmazható lenne a bélgyulladások kezelésére vagy megelőzésére a gyógyszeres terápiában.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az oxidatív stressz

Az aerob élet kialakulásának fő nehézsége az lehetett, hogy miközben a molekuláris oxigén elengedhetlenné vált az eukarióta élőlények túléléséhez, ugyanez a molekula súlyos veszélyt is jelentett minden élő organizmusra. Az oxigénmolekula ugyanis biradikális gyök; külső elektronhéján két párosítatlan elektron található. Ebben a formában csak gyenge oxidánsnak számít, azonban redukció által szuperoxid anionná válik ($O_2^{\bullet -}$), ami továbbalakulva a még reaktívabb hidroxil ($\bullet OH$) gyök keletkezéséhez vezet. Ez utóbbi szabadgyökök kifejezett sejtkárosító hatásúak. A mitokondriumban a normál terminális oxidáció (oxigénmolekula tetravalens redukciója) mellett kis mértékben mindig végbemegy az univalens redukciós folyamat is (**1. ábra**), aminek köztermékei az említett reaktív szabadgyökök [16]. Ezért minden aerob szervezetben kialakultak a védekező rendszerek, melyek egyik alappillére az antioxidáns vegyületek (C- és E-vitamin, karotinoidok, glutation, ubiquinon) és enzimrendszerek (SOD, kataláz, GSH-Px, kinon-reduktáz), másik pedig a hibajavító (DNS-repair enzimek), és a károsodott molekulákat eltávolító (proteolitikus enzimek, foszfolipáz-A2 [17]) enzimek [18].

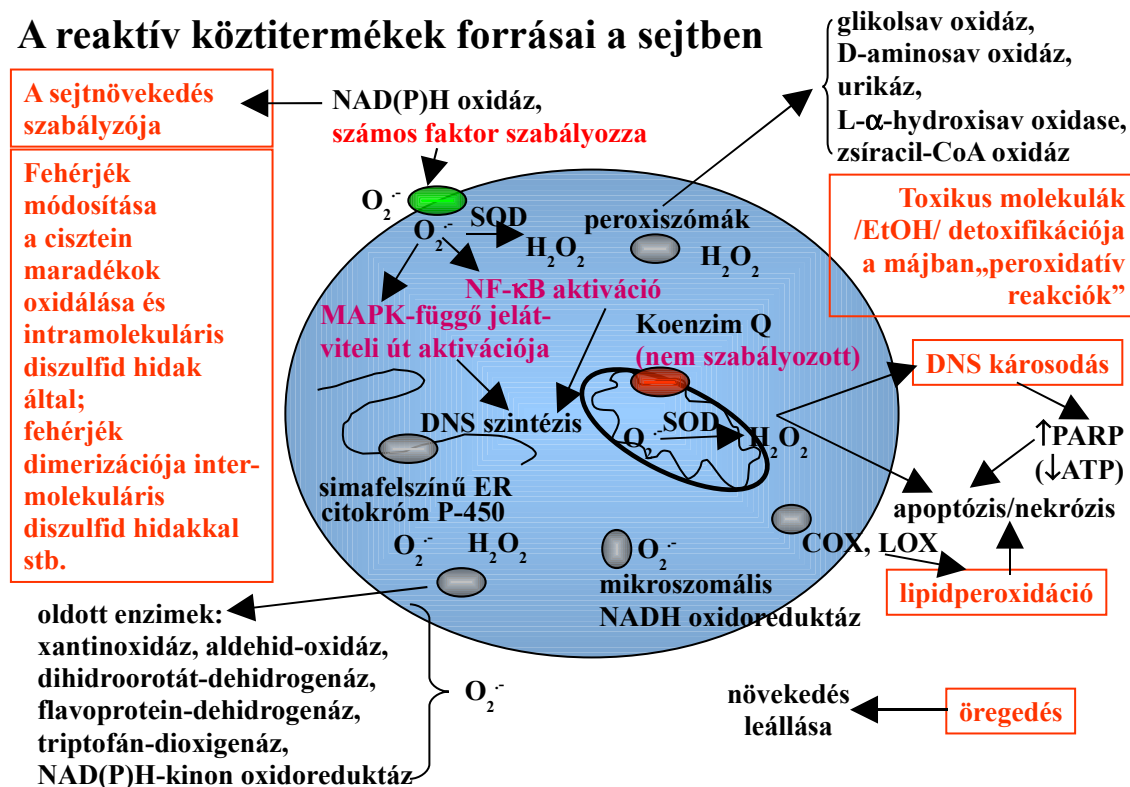


1. ábra: a molekuláris oxigén univalens redukciója

Az oxidatív stressz olyan kóros állapot, amikor a ROS (szabadgyökök és peroxidok) keletkezésével (**2. ábra**) nem tudnak lépést tartani a védekező mechanizmusok, az előbbieik túlprodukciója, és/vagy az utóbbiak hiánya miatt. A mai környezeti hatások között könnyen előállhat ez a helyzet: a környezetszennyezés, az ionizáló sugárzások, különféle élelmiszer-, takarmányadalekok és -összetevők, xenobiotikumok jelentősen hozzájárulhatnak az élettani redox-homeosztázis megváltozásához [19].

A ROS hatására szinte minden celluláris összetevő sérül, különösképpen a DNS, a fehérjék és a (többszörösen) telítetlen zsírsavak. A hidroxil gyök a DNS-ben egyaránt károsító hatást fejt ki purin és pirimidin bázisokra és a pentóz-foszfát gerincre is. Ezek az oxidációs folyamatok gyakran az első lépést jelentik a mutagenesis és carcinogenesis felé, ezzel alapot képezve a sejtszintű öregedést érintő „szabadgyök-elméletnek” [20]. A fehérjék főként az oldalláncok oxidációja révén károsodnak, aminek következtében megnő a karbonil csoportok száma. Különösen érzékenyek az oxidatív stresszre a kéntartalmú aminosavak [19].

A reaktív közttermékek forrásai a sejtben



2. ábra: A ROS termelődés lokalizációja és főbb funkciói a sejtben. NAD: nikotinsav-adenozin-dinukleotid, COX: ciklooxygenáz, LOX: lipoxigenáz, SOD: szuperoxid-dizmutáz, ER: endoplazmatikus retikulum, NF-κB: nukleáris faktor kappa B, MAPK: mitogén aktivált protein kináz, PARP: poli-ADP-ribóz-polimeráz

A ROS kártételére legérzékenyebbek a telítetlen zsírsavak, különösen a sok telítetlen kötést tartalmazó típusaik (PUFA). A lipidek a biológiai membránokban találhatók meg legnagyobb mennyiségben, ezért az oxidatív stressz egyik leggyakoribb következménye a membránkárosodás. A lipidperoxidációnak nevezett láncreakciót szabadgyökök indítják el: párosítatlan elektront tartalmazó lipid gyök keletkezik, ami molekuláris oxigént megkötve lipid-peroxil gyökké alakul (iniciáció). Ez az instabil molekula egy újabb lipiddel lép reakcióba, amelyből lipid-peroxid lesz, miközben a lipid-peroxil gyök lipid gyökké alakul vissza (propagáció). A folyamat akkor ér véget, ha már kellően sok lipid gyök képződött, és ezek egymással reagálnak (termináció). Stabil végtermékek jönnek létre (malondialdehid – MDA; 4-hidroxi-2-nonenál – HNE), amelyek indikátorként használhatók a lipidperoxidáció nyomon követésére [19]. Ezek a képződött molekulák [21] roncsolóan hatnak a membránra, megbontva integritását szövetkárosodást okoznak.

A reaktív oxigén származékok koncentrációjától függően más-más hatást gyakorolnak a sejtekre. A fenti sublethalis folyamatok mellett osztódó sejtekben kismértékű oxidatív stressz serkenti a mitózist, erősebb hatásra ellenben befejezik az osztódást, és ezzel párhuzamosan az antioxidáns enzimek up-regulációja figyelhető meg bennük. Kifejezetten erős oxidatív hatásra a sejtek apoptózisba lépnek, míg ennél is nagyobb ROS koncentráció nekrotizist okoz [18].

Ma már az is ismert, hogy a legtöbb sejttípus kis mennyiségben ROS-termeléssel válaszol bizonyos stimulusokra (egyes növekedési faktorok, citokinek, környezeti faktorok) [19]. Az így keletkezett ROS fontos másodlagos hírvivő a szervezetben, a sejtproliferáció, az apoptózis és a gyulladások jelátvitelében is érintett (**2. ábra**). Ezek a folyamatok a terápiának is támadáspontjai lehetnek: ha sikerül gátolni a redox-szenzitív jelátviteli utakat, az a krónikus gyulladások, és számos oxidatív-stresszel összefüggő degeneratív folyamat kezelésében nyitna új perspektívát [8].

Az oxidatív stresszt igen sok emberi és állati betegséggel hozzák összefüggésbe, mint a kórfejlődés fontos tényezője, vagy akár elsődleges kiváltó ok. Humán vonalon az carcinogenesis, az atherosclerosis, az ischaemia/reperfúzió-szindróma, a magas vérnyomás, a diabetes mellitus, a rheumatoid arthritis, neurodegeneratív betegségek (Parkinson-kór, Alzheimer-kór), a gyomorfekély, a gyulladásos bélbetegség (IBD) betegségcsoport (Crohn betegség és ulceratív colitis), és még sok más kórkép kapcsán kerül említésre [19, 20].

Az oxidatív stressz kivédésének állatgyógyászati jelentőségét alátámasztja az, hogy a szabadgyökök és a lipidperoxidáció szerepet játszik egyes máj- és vesebetegségek, a (szubklinikai) mastitis, a carcinogenesis, krónikus bélgyulladások, E-vitamin-/Se-hiányos kórképek (kérődzők fehérhús-betegsége, sertés stressz szindróma, lovak rhabdomyolysise, csirkék exsudative diathesise) kialakulásában is [6].

2.2. A citokinek és szerepük a gyulladásban

A citokinek kis molekulájú szabályozó fehérjék, melyek a sejtek közti kommunikációban kiemelkedő jelentőségűek. Fő hatásuk, hogy immunmodulátorok, befolyásolják mind a veleszületett, mind a szerzett immunrendszer működését, a gyulladásos válaszban is lényeges szerepük van [22] illetve fontos feladatuk az embriogenezis alatt a fetomaternalis immuntolerancia biztosítása [23, 24]. Legnagyobb mennyiségben immunsejtekben termelődnek, de a szervezet szinte összes sejtje képes citokinek előállítására. Főként parakrin és autokrin módon szabályoznak, de a keringésbe jutva szisztémás (endokrin) hatásuk is gyakori (pl. interleukin-1 (IL-1) endogén pirogén működése). A citokinek közé tartoznak az interleukinok, az interferonok, a tumor necrosis factor- α (TNF- α) és - β , és még sok egyéb regulátoros fehérje (kemokinek, nem-immunológiai citokinek, mint az eritropoetin). A citokinekre általánosan jellemző a redundancia (különböző citokinek hasonló feladatokat is ellátnak) és a pleiotrópia (az adott citokinnek többféle eltérő hatása is van) [25].

A citokinek közül az IL-1-et és az interferonokat az elsők között fedezték fel az 1950-es években [26, 27]. Később egymás után azonosították az újabb típusokat és molekulákat; napjainkban több száz citokin molekula ismert [28]. A citokinek specifikus membrán-receptorokhoz kapcsolódva fejtik ki hatásukat: intracelluláris kaszkádot indítanak el a sejtekben, ezzel különféle

fehérjék génjeit aktiválva vagy blokkolva. Tehát közvetett módon megváltoztatják a sejt működését. Hatással vannak saját sejtfelszíni receptoraik expressziójára is (up-reguláció, vagy gátló feedback miatti down-reguláció). A citokinekkal kapcsolatos terápiás lehetőségek köre széles; ezek közül kiemelkedik az interferonok vírusellenes felhasználása, és az anti-TNF ellenanyagok (influximab és adalimumab) illetve TNF-receptor-analógok (etanercept) igénybevétele bizonyos autoimmun betegségek (főként rheumatoid arthritis) kezelése céljából [22].

A citokinek szerepe a gyulladás szabályzásában régóta ismert jelentőségű és intenzíven kutatott terület. Egyes citokinek inkább elősegítik a gyulladásos folyamatokat, ezért proinflammatorikus (gyulladáskeltő vagy gyulladásos) citokineknek nevezzük őket, mint például az IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , stb [29]. Mások inkább a gyulladás ellen hatnak (anti-inflammatorikus citokinek): IL-4, IL-10, IL-11, IL-13, továbbá az IL-1, és TNF- α egyes receptorai is ide sorolhatók, mert megkötik e két gyulladásos citokint [30]. A besorolás ebbe a két ellentétes csoportba azonban nem mindig könnyű. A citokinek pleiotropiája miatt lehetnek egyaránt gyulladást támogató és visszaszorító hatásúak is. Például az IL-4, IL-10, és IL-13 aktiválják a B-limfocitákat, de a sejtekben elnyomják az IL-1, a TNF- α , és a kemokinek termelődéséért felelős géneket. Hasonlóan, az IFN- γ is ellentétes beindíthat gyulladáskeltő és gyulladásellenes folyamatokat [27]. Az oxidatív stressz egyik hatása, hogy elősegíti a gyulladásos citokinek termelődését [31]. Számos citokin e mellett a sejteket más citokinek termelésére készíti [32, 33]. Ezek a folyamatok krónikus gyulladásokhoz vezetnek.

A bélcsatornában a hámsejtek oxidatív stressz (és egyes kémiai anyagok, bakteriális toxinok) hatására a következő gyulladásos citokinek termelnek: IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α [9]. Ezen termékek képződésének detektálása által nyomon követhetjük a gyulladásos folyamatot *in vitro* bélhámsejtvonalon végzett vizsgálatok során. Kísérleteinkben IPEC-J2 bélsejtekben az IL-8-at és a TNF- α expresszióját mértük. Az IL-8 makrofágokban, epithelsejtekben és endothelsejtek Weibel-Palade-testjeiben keletkezik [34]; elsősorban a sejtfelszíni Toll-like receptorok (TLR) idegen antigének okozta aktivációja serkenti a termelődését. Az IL-8 a kemokinek csoportjába tartozik: a neutrophil sejtek kemotaktikus faktora, amelyet a CXCR1 és CXCR2 membrán-receptorok kötnek meg. A TNF- α aktivált macrophagok, és még sok egyéb sejttípus által termelt citokin, aminek prominens szerepe van a gyulladásos válasz és az akut fázisú reakciók kialakításában. Képes apoptózist előidézni, főként károsodott sejtekben, ezért vírus-, és tumorellenes hatású. Nevét is az utóbbi funkciójáról kapta, 1975-ös felfedezésekor [35]. A TNF- α immunstimuláns, képes lázat és cachexiát okozni, túlzott képződése pedig sokféle betegséggel összefügg (krónikus bélgyulladás, daganatok, autoimmun betegségek, idegrendszeri kórképek) [36].

2.3. A hő sokkfehérjék

A hő sokkfehérjék (Hsp) olyan, minden élő organizmusban megtalálható fehérjék, amelyek a sejtek fehérjéinek működőképes állapotát hivatottak fenntartani, főleg stresszhatások esetén [37]. A fehérjék nagyon érzékeny biomolekulák, a hőhatásokra, és kémiai változásokra gyorsan denaturálódnak, nem tudják ellátni a feladatukat, ez pedig a sejt pusztulásához vezet. A Hsp-k képesek a fehérjék normális térszerkezetét visszaállítani, a károsodott hélix-részeket újra „felcsavarni” [38]. Bár egy alacsony szinten mindig képződnek és jelen vannak a sejtekben, hőmérséklet-emelkedésre, vagy egyéb (oxidatív) stresszhatásra az expressziójuk rövid idő alatt sokszorosára növekszik. A Hsp-eket molekulatömeg szerint csoportosítják: a legjelentősebbek a Hsp33, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100, és a kis Hsp-k (sHsp). A Hsp fehérjéknek többféle további élettani szerepe ismert: a Hsp90 nitrogén-monoxid-felszabaduláson keresztül kifejezett értágító [39] és tumorellenes [40] hatásáról is beszámoltak, a Hsp70 idegen anyagokat megkötve antigénprezentáló lehet az immunrendszer számára [41].

2.4. Probiotikumok

A probiotikum elnevezés görög eredetű, jelentése: „az életért” (pro bios). A múlt század első éveiben Ilja Mecsnyikov orosz kutató felfigyelt rá, hogy a Kaukázus területén élő népcsoportokban a hosszabb várható élettartam összefügg a fermentált tejtermékek nagy mennyiségben történő fogyasztásával. A magyarázat az volt, hogy a tejtermékekben megtalálható élő tejsavbaktérium-kultúrák megakadályozták a bélben a patogén, toxintermelő és rothasztó baktériumok elszaporodását, így számos bélrendszeri fertőzés kockázata csökkent [42]. Az elkövetkező évtizedekben a probiotikumok egyre több pozitív hatását fedezték fel. Napjainkban is intenzív kutatás folyik a területen, ezzel párhuzamosan a probiotikumok mind jobban teret hódítanak az ételmiszer- és takarmányiparban, sokféle betegség terápiája terén, és – mint az Európai Unióban betiltott kis-dózisú antibiotikumok alternatívái – hozamfokozóként az állattenyésztésben [43, 44, 45].

Probiotikumnak „olyan élő mikroorganizmusok nevezhetők, amelyek megfelelő mennyiségben fogyasztva jótékony hatással vannak a gazdaszervezet egészségére” [46, 47]. További fontos szempontok, hogy a probiotikum patogén és toxikus nem lehet, a bélben képesnek kell lennie a túlélésre, kolonizációra és metabolikus aktivitásra, továbbá a tárolás és a használat során végig életképesnek kell maradnia [48].

A probiotikus baktériumok terápiás jelentősége a humán- és állatorvoslásban kiemelkedő a bélflóra egyensúlyának károsodásával járó kórképek (például a hosszan tartó peroralis antibiotikum-terápia mellékhatásaként fellépő dysbacteriosis), patogén baktériumok túlszaporodása [49] okozta fertőzések kezelésében. Mivel a probiotikus baktériumok a természetes bélflóra legfőbb

alkotói közé tartoznak, kellő mennyiségben felvéve, és a megfelelő „niche”-t elfoglalva visszaállíthatják a fiziológiás arányokat a bél mikrobiótájában.

További alkalmazási területek lehetnek: bizonyos emésztési zavarok, idült bélgyulladások gyógykezelése, tumoros folyamatok kialakulásának és progressziójának megelőzése, a helyi és szisztémás immunrendszer erősítése. A pontos mechanizmusokat ezeknek a kedvező hatásoknak hátterében még nem tisztázták, de számos tanulmány foglalkozik a kérdéssel, amelyek eredményei közül kiemelkednek a következők:

Fizikai gátat képezve, és a tápanyagokért történő kompetícióban a probiotikumok kiszorítják a patogén kórokozókat [50], és erősítik a nyálkahártya barriert, megakadályozva ezáltal a baktériumok átjutását a bélfalon [51, 52]. Ez utóbbi folyamatban az is segít, hogy a bélhámsejtek között apikálisan található tight junction (TJ) sejtkapcsoló struktúrákat erősítik a probiotikumok: egyes törzsek serkentik a TJ fehérjék (zonula occludens-1 és occludin) szintézisét a bélhámsejtekben a Toll-like receptor 2 (TLR-2) által irányított jelátviteli módon [13], más törzsek a citoszkeleton apikális összehúzódását gátolva akadályozzák meg a TJ-k „kinyílását” [53]. A bél immunrendszerét is serkentik: hatással vannak a „gut-associated lymphoid tissue” (GALT) minden elemének működésére (pl. Peyer-plakkok, lamina propria önálló limfocitái) [54], és fokozzák a secretoros IgA-termelődést [55, 56].

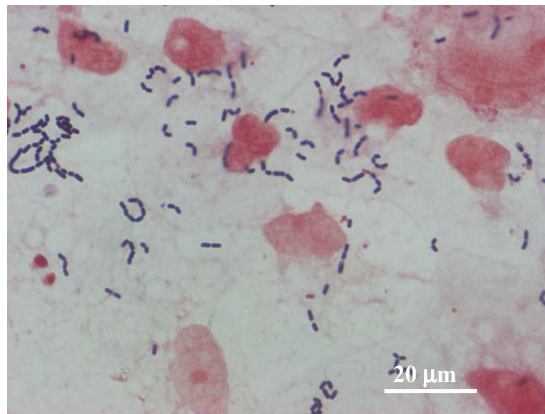
A probiotikumok igen sok biológiailag aktív molekulát termelnek, amelyek a bél sejtjeinek metabolizmusát befolyásolják, vagy antimikrobás hatást mutatnak. Ez utóbbiak közé tartoznak a bakteriocinek, amelyek közvetlenül károsítják a többi mikroorganizmust [11, 57]. Más termékek a gyulladásos választ módosítják [58] a környező sejtekben: főként a pro-inflammatorikus citokinek termelődését gátolják [14, 55, 59], miközben az anti-inflammatorikus citokinek képződése nem csökken [60]. Ez lehet a probiotikumok fő gyulladáscsökkentő hatásmechanizmusa.

Egy adott probiotikus törzs természetesen nem mutathatja egyszerre az összes fenti pozitív effektust, az említett hatásmechanizmusokat jellemzően egy, vagy kettő baktériumtörzset vizsgálva mutatták ki. Tovább bonyolítja a képet, hogy az élő szervezetre kifejtett jótékony hatások mögött meghúzódó biokémiai folyamatok igen összetettek, így a probiotikumok teljes körű szerepének és hatásmódjának tisztázása az emésztőrendszeri és egyéb betegségek elleni védekezésben még a jövő feladata.

A leggyakrabban használt probiotikus baktériumok a *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* nemzetségbe tartozó Gram pozitív, fakultatív- vagy obligát anaerob fajok. További probiotikum fajokat találunk a *Bacillus*, *Streptococcus* és *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* genusokban, és az élesztők között (*Saccharomyces*, *Kluyveromyces*) is [43]. A legtöbb ismert probiotikus törzs használata biztonságos, de egyes *Enterococcus* törzsek igénybevétele átgondolandó, mert kiterjedt

antibiotikum-rezisztenciájukat vertikálisan terjeszthetik más baktériumokra, ezzel multirezisztens patogén törzsek létrejöttét segítve elő. A *cereus*-csoportba tartozó *Bacillus* fajok probiotikumként való alkalmazása is veszélyes lehet, ugyanis enterotoxinok és egy emeticus toxin termelését is igazolták esetükben [61].

Az általunk vizsgált *Lactobacillus plantarum* 2142 (Lp 2142; **3. ábra**) non-starter tejsavbaktérium törzs, fakultatívan heterofermentatív (főként tejsavat, borostyánkőssavat, ecetsavat termel [15]), hidrogén-peroxid- és bakteriocin-termelése által gátolja a *Bacillus cereus*, a *Listeria monocytogenes* [57], és a *Salmonella Enteritidis* 857 növekedését [62].

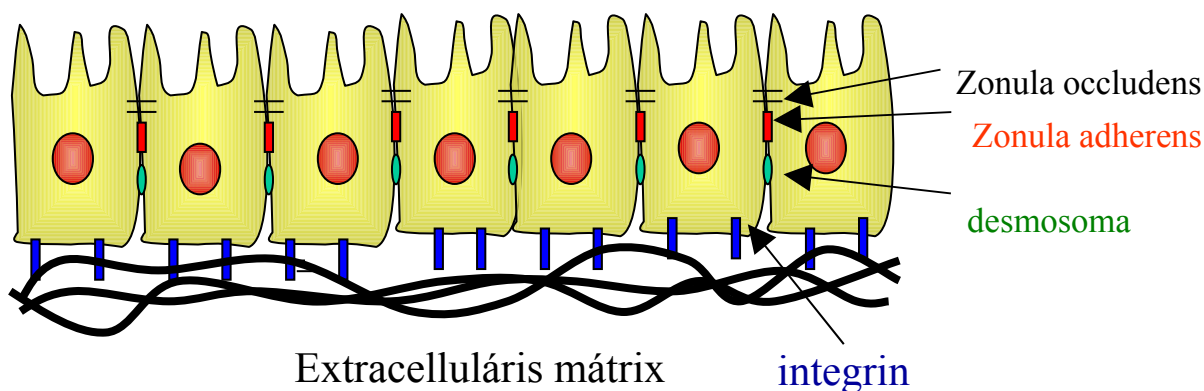


3. ábra: *Lactobacillus plantarum* 2142
adhéziója Caco-2 sejtekhez (Gram festés).

2.5. Az IPEC-J2 sejtvonala

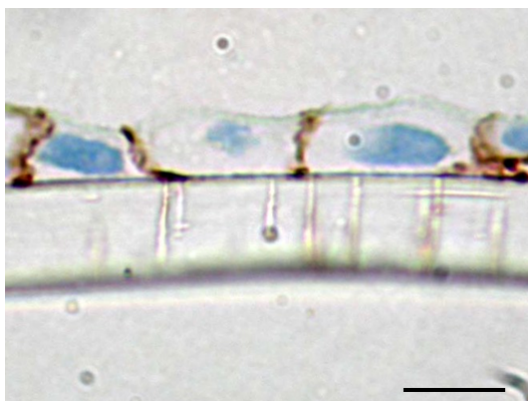
Az IPEC-J2 egy sertés bélhámsejtvonala (**5. és 6. ábrák**), amely tumorosan nem transzformált jejunum sejtekből áll, újszülött, kolosztrumot még fel nem vett malacból származik, és folyamatos *in vitro* tenyészetben fenntartható [63]. A sejtek membrán inzerten egy rétegben nőnek. Az érett sejtkultúrában nagyobb szögletes-, és közöttük kisebb lapos bélhámsejtek láthatók, kehelysejtekkel nem lehet találkozni.

Az IPEC-J2 sejtvonala megfelelően modellezi az élő állatok bélnyálkahártyájának hámrétegét, ugyanis sejtjei polarizáltak, apikálisan mikrobolyhos kefeszegélyt növesztenek, míg bazális és laterális részen rövidebb citoplazma-nyúlványokat bocsájtanak az intercellularis térbe. Sejtkapcsoló struktúrákkal összekapcsoltak (**4. ábra**): apikálisan TJ, alatta zonula adherens kapcsolatok alakulnak ki, így a monolayer integritása megfelelő, ami az apikális és a bazolaterális folyadéktér közötti transzepithelialis elektromos rezisztencia (TER) mérésével igazolható. A mikrobolyhok felületén glycocalix-réteg (mukopoliszacharid) figyelhető meg [64].

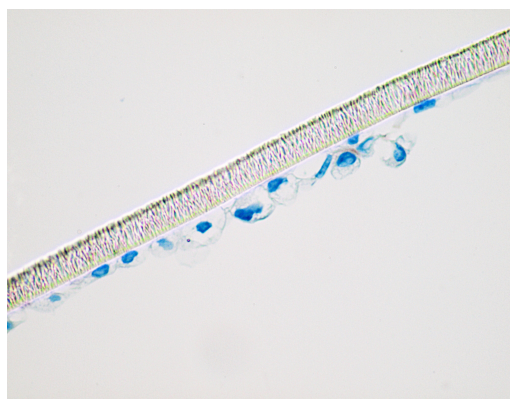


4. ábra: A bélhámsejtek közti sejtkapcsoló struktúrák sematikus ábrázolása.

A hámsejtek képesek metabolikus választ adni különböző stresszhatásokra, mint a bakteriális fertőzés vagy az oxidatív stressz. Ilyenkor a reakció gyulladásos citokinek és egyéb anyagok szintézise: kimutatható az IL-1 α , IL-6, IL-7, IL-8, IL-18, TNF- α , és az ún. granulocita makrofág kolónia-stimuláló faktor (GM-CSF) génexpressziója. Különböző patogén baktériumok hatására megnőhet az IL-8, a TNF- α , vagy a CC chemokine 20 transzkripciójának szintje [64, 65, 66], illetve a TJ fehérjék károsodása miatt a sejtréteg integritása (és ezzel a TER érték) drasztikusan csökkenhet [67].



5. ábra: IPEC-J2 monolayer fénymikroszkópon claudin4-immunhisztokémiai festés, hematoxilin háttérfestéssel. A fekete vonal 10 μ m-t jelöl. A barna elszíneződés a claudin4 molekulák lokalizációját mutatja (a bélhámsejtek közötti TJ-ben).



6. ábra: IPEC-J2 monolayer fénymikroszkópon claudin7-immunhisztokémiai festés, hematoxilin háttérfestéssel. 400X nagyítás. Csak kék festődés látható, pozitív reakcióra utaló barna szín nem figyelhető meg: a próba negatív volt.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. IPEC-J2 sejtek tenyésztése

A kísérletekhez olyan IPEC-J2 sejtekre volt szükségünk, amelyek a kollagénnel bevont membrán inzertet, mint alaphártyát egy rétegben beborítják, polarizáltak, kialakultak közöttük a megfelelő sejtkapcsoló struktúrák, és az apikális és bazolaterális folyadékterek kizárólag a membránban lévő 0,4 μm -es pórusokon keresztül vannak kapcsolatban egymással. Ennek az állapotnak az eléréséhez a – megelőzően cseppfolyós nitrogénben tárolt – sejteket 22-25 napig kellett tenyészteni. A tenyésztés minden szakasza 37°C-on, 5% CO_2 jelenlétében történt. A médium DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle medium és Ham's F-12 Nutrient 1:1 arányú tápfolyadék-keveréke; Sigma-Aldrich) volt, kiegészítve 5% fetális borjúsavó (FBS), 5 $\mu\text{g/ml}$ inzulin, 5 $\mu\text{g/ml}$ transferrin, 5 ng/ml szelén, 5 ng/ml epidermális növekedési faktor (EGF) és 1% penicillin-sztreptomycin keverékével.

Az első, 7 napos fázis 25 cm^2 -es flaskában és 10 ml tápfolyadékban történő tenyésztést jelentett. A flaskában növekvő sejtek a passzálása a következők szerint zajlott: a tápoldat eltávolítása és 5 ml PBS-sel (phosphate buffered saline) történő átmosás után 3 ml tripszin-EDTA-oldatot (0,05% tripszin és 0,6 mM etilén-diamin tetraacetát) adtunk a sejtekhez, amelyek az oldat hatására 10 percen belül leváltak a flaska felületéről (erre rásegítettünk a flaska kíméletes rázogatóásával is). Az új (steril) flaskákba 1-1 ml-t pipettáztunk a sejteket tartalmazó tripszin-EDTA oldatból. Az további inkubáció megkezdése előtt flaskák folyadéktartalmát 10 ml-re egészítettük ki DMEM/F12-vel.

Egy hét elteltével a sejtek átkerültek a kollagénnel bevont poliészter membrán inzertekre, 6 lyukú sejtenyésztő edénybe (Costar Transwell; 4,67 cm^2 /lyuk). Az eredeti flaskákban 2 ml sejtszupenziót hagytunk, amit tápfolyadékkal 20 ml-re egészítettünk ki. Ebből a tenyésztőedény lyukaiba, az inzert apikális részére 1,5-1,5 ml mennyiséget pipettáztunk ($1-2 \times 10^5$ sejt/1,5 ml). A bazolaterális térbe 2,6 ml DMEM/F12 került. A tenyésztés során minden másnap lecseréltük a tápfolyadékot, és ilyen alkalmakkor rendszeresen ellenőriztük a TER értékeket is (készülék: EVOM Epithelial Tissue Volt/Ohmmeter; World Precision Instruments, Berlin) a 6-lyukú edény összes lyukánál (ezzel az apikális és bazolaterális kompartmentek közti elektromos ellenállás határozható meg, ami szoros összefüggésben áll a hámréteg integritásával). A sejtenyészeteket akkor ítéltük alkalmasnak a kísérletre, ha a TER érték elérte 8000 $\Omega \times \text{cm}^2$ -t.

A sejtvonalat tanszékünk Dr. Jody Gookin ajándékaaként kapta (Department of Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Raleigh).

3.2. Lactobacillus plantarum 2142 probiotikum törzs tenyésztése és sejtmentes felülszójának előállítása

A *Lactobacillus plantarum* 2142 baktériumtörzset (Lp 2142; beszerzési forrás: Culture Collection of the Institute of Dairy Microbiology, Agricultural Faculty of Perugia University, Perugia) -80°C-on tároltuk, 20% glicerintartalmú tápfolyadékban. A tervezett kísérletek előtt 2 nappal ezt oltottuk be 10 ml MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) táplevesbe, 1% arányban. Az MRS összetétele, 1 literben: 10 g kazein pepton; 8 g húskivonat; 4 g élesztőkivonat; 20 g D-glükóz; 2 g K₂HPO₄; 1 ml Tween 80; 2 g (NH₄)₂-citrát; 5 g Na-acetát; 0,2 g MgSO₄ x 7 H₂O; 0,04g MnSO₄ x H₂O.

24 óra 37°C-on történő inkubáció után újabb leoltás következett (ismét 1%-ban 10 ml MRS-be). További 1 nap elteltével előállítottuk a sejtmentes felülszót (sejtmentes szűrlet; SMSz) a következőképpen: 3000 g-vel, 5°C-on, 10 percig centrifugáltuk a Lp 2142 tenyészetet, majd a felülszót steril kémcsőbe vittük át, és mikroszűrőn átszűrtük (0,22 µm pórusátmérő). Az ily módon nyert SMSz-t használtuk fel a kísérletekben.

3.3. IPEC-J2 sejtek kezelése

A megfelelő TER értéket elért sejtenyészetek tápfolyadékát eltávolítottuk, majd a sejteket 37°C-ra felmelegített, antibiotikumokat és FBS-t nem tartalmazó (plain) DMEM/F12 oldattal átmostuk (pDMEM/F12). A bazolaterális kompartmentet 2,6 ml pDMEM/F12-vel töltöttük fel. A tenyészetek apikális folyadékterébe pipettáztuk a kísérlethez szükséges anyagokat olyan mennyiségben, hogy a pDMEM/F12-vel a végtérfogatra, 1,5 ml-re való kiegészítés után azok a kívánt koncentrációban legyenek az oldatban (**1.**, **2.**, és **3. táblázat**). Az oxidatív stressz kiváltása hidrogén-peroxid (H₂O₂) oldattal történt: 10 mM-os H₂O₂ törzsoldatból 150 µl-t juttatunk az apikális kompartmentbe (a 1,5 ml végtérfogatban 1 mM-os lett koncentráció). A védőhatás vizsgálatához különböző koncentrációkban Lp 2142 SMSz-t; illetve a Lp 2142 által nagy mennyiségben termelt – ecetsavat és tejsavat (racém-, D-, és L-módosulat) adtunk a sejtekhez a H₂O₂-al együtt. Kontrollként az SMSz mellett annak táplevesével, MRS-sel is elvégeztük a kísérletet, annak a lehetőségnek kizárása érdekében, hogy a kapott eredményt a tápleves anyagai okozzák. A kísérleti elrendezéseket a **1.**, **2.**, és **3. táblázat** tartalmazza.

A kezelés után a sejteket 37°C-on, 60 percig inkubáltuk CO₂-termosztátban. Ezután újból megmértük a TER értékeket, eltávolítottuk az oldatokat és pDMEM/F12-vel átmostuk a sejtenyészeteket.

A sejthalált és a lipidperoxidációt vizsgáló kísérletekhez (ld. **3.6.** és **3.7.** pontok) 2 hetes, membrán inzert nélküli 6 lyukas lemezben tenyésztettük az IPEC-J2 sejteket.

1. táblázat: IPEC-J2 sejtek kezelése a Lp 2142 SMSz oxidatív stressz elleni védőhatását vizsgáló kísérletben

	pDMEM/F12	H ₂ O ₂ (10 mM)	MRS	SMSz
Kontroll	1500 µl	-	-	-
1mM H ₂ O ₂	1350 µl	150 µl	-	-
13,3 v/v% MRS	1300 µl	-	200 µl	-
13,3 v/v% SMSz	1300 µl	-	-	200 µl
1mM H ₂ O ₂ + 3,3 v/v% MRS	1300 µl	150 µl	50 µl	-
1mM H ₂ O ₂ + 3,3 v/v% SMSz	1300 µl	150 µl	-	50 µl
1mM H ₂ O ₂ + 6,3 v/v% MRS	1250 µl	150 µl	100 µl	-
1mM H ₂ O ₂ + 6,3 v/v% SMSz	1250 µl	150 µl	-	100 µl
1mM H ₂ O ₂ + 13,3 v/v% MRS	1150 µl	150 µl	200 µl	-
1mM H ₂ O ₂ + 13,3 v/v% SMSz	1150 µl	150 µl	-	200 µl

2. táblázat: IPEC-J2 sejtek kezelése az ecetsav oxidatív stressz elleni védőhatását vizsgáló kísérletben (50 mM ecetsav törzsoldat készítése során a hígítás pDMEM/F12-vel történt)

	pDMEM/F12	H ₂ O ₂ (10 mM)	Ecetsav (50 mM)
Kontroll	1500 µl	-	-
1mM H ₂ O ₂	1350 µl	150 µl	-
1,3 mM ecetsav	1460 µl	-	40 µl
6,7 mM ecetsav	1300 µl	-	200 µl
1mM H ₂ O ₂ + 1,3 mM ecetsav	1310 µl	150 µl	40 µl
1mM H ₂ O ₂ + 6,7 mM ecetsav	1150 µl	150 µl	200 µl

3. táblázat: IPEC-J2 sejtek kezelése a tejsav oxidatív stressz elleni védőhatását vizsgáló kísérletben (50 mM tejsav törzsoldat készítése során a hígítás pDMEM/F12-vel történt). A kísérletet racém-, D-, és L-tejsav használatával is elvégeztük

	pDMEM/F12	H ₂ O ₂ (10 mM)	Tejsav (50 mM)
Kontroll	1500 µl	-	-
1mM H ₂ O ₂	1350 µl	150 µl	-
6,7 mM tejsav	1300 µl	-	200 µl
1mM H ₂ O ₂ + 6,7 mM tejsav	1150 µl	150 µl	200 µl

3.4. A génexpressziók meghatározása kvantitatív real-time PCR-rel (qPCR)

3.4.1. RNS-izolálás

Homogenizálás: A 3.3. pontban leírtak elvégzése után 1 ml TRIzol reagenst (fenolt és guanidin-izotiocianátot tartalmazó RNS izoláló folyadék; Invitrogen) mértünk minden sejtenyészetre. A sejteket pipettával alaposan szuszpendáltuk az oldatban, és a keletkezett sejtlyázátumot steril mikrocentrifuga csövekbe mértük át.

RNS-kivonás 5 perc 4°C-on történő inkubáció után 0,2 ml -20°C kloroformot (Reanal) mértünk a csövekbe, amiket ezután alaposan vortexeltük (15 mp). Újabb inkubáció (5 perc, 4°C) után egy 12000 g-val történő centrifugálás következett (15 perc, 4°C). A centrifugálás után szétváló 3 fázis közül a felső, vizes fázis tartalmazta az RNS-t (az alsó egy kloroformból és fenolból álló

fázis, a középső fázis átmeneti). A felső fázist pipettával óvatosan másik steril mikrocentrifuga csövekbe vittük át. Az új csövekkel az RNS-kivonási lépést megismételtük a kloroform bemérésétől kezdve.

RNS-kicsapás: a második kivonási művelet végén a vizes fázis ismét újabb csövekbe került. Ezekhez 1:1 arányban -20°C-os izopropil alkoholt adtunk. Vortexes keverés után 4°C-on 10 percig inkubáltuk a mintákat, majd centrifugáltuk őket (12000 g, 15 perc, 4°C). A felülúszót előntve a mikrocentrifuga csövek alján a precipitálódott, fehér színben előtűnő RNS maradt.

RNS-tisztítás: Az RNS-pellethez 1 ml 75%-os -20°C-os etanolt mértünk. A csöveket vortexeltük, majd ismét centrifugáltuk (7500g, 5 perc, 4°C), a keletkező felülúszót pedig leöntöttük. A kivonáshoz hasonlóan ezt a lépést is megismételtük.

RNS-feloldás: A felülúszó eltávolítása után az RNS-pelletet 10-15 percig szárítottuk, és feloldottuk 50 µl RNáz-mentes vízben (Molecular Biology Grade Water, Eppendorf).

Maradék DNS-emésztés: a mintában kis mennyiségű maradék DNS sem tolerálható a PCR nagy érzékenysége miatt. A DNS emésztését az Amplification Grade DNase I (Sigma-Aldrich) RNáz-mentes DNáz-al végeztük el: 8 µl RNS-mintához 1-1 µl reakciópuffert és DNáz-t (1 egység/µl) adtunk, a felhasznált (RNáz-mentes) PCR-csövek tartalmát összekevertük, és 15 percig 37°C-on inkubáltuk. Az elegyekhez 1 µl leállító oldatot adtunk, aminek feladata az enzim inaktiválása. Ezt egy 10 perces, 70°C-os hőkezelés követte, amivel denaturáltuk a DNáz-t.

RNS-ellenőrzés: a kinyert RNS mennyiségének és tisztaságának megállapítására spektrofotometriás módszert használtuk. A nukleinsavak (DNS és RNS) mennyisége 260 nm-en mérhető. Az általunk használt berendezés (NanoDrop ND-1000 spektrofotométer; Thermo Scientific) szoftvere az eredményként kapott abszorbanciából kiszámítja az RNS koncentrációját µg/ml-ben. Az RNS tisztaságát szintén az említett spektrofotométer segítségével határoztuk meg; az A_{260}/A_{280} és A_{260}/A_{230} arányok megállapításával. Előbbi hányados a fehérje-szennyezettséget jelzi (a fehérjék abszorpció maximuma 280 nm), elfogadható értéke 1,8 és 2,0 között van. Az A_{260}/A_{230} arány a mintában maradt szerves oldószerek és szénhidrátok mennyiségére jellemző, 1,5 feletti értéke esetén mondható az RNS minta tisztának.

Az RNS-degradáció kizárása érdekében a minta agaróz gélelektroforézises ellenőrzését is el kell végezni. Az 1%-os agaróz gél 1 g agarózból (Sigma-Aldrich), 10 ml 10x TBE pufferből (107,8 g/l Tris, 57 g/l bórsav, 7,4 g/l EDTA; pH=8,3), 90 ml dietil-pirokarbonátból (DEPC) készült víz segítségével. Amikor a gél hőmérséklete 50°C alá csökkent, hozzákevertünk 10 µl etídium-bromidot (10 µg/ml, Fluka). E nélkül a gélképen nem látszanának az RNS-t jelölő csíkok. A gél zsebeit 2 µl minta és 1 µl töltőpuffer (6x Orange Loading Dye Solution, Fermentas) keverékével töltöttük fel. Az elektroforézis 25 percig tartott, 80 V feszültséggel, 1x TBE pufferben (ebben az összetevők koncentrációja 1/10-e a 10x TBE puffernél leírtaknak). A gél elemzéséhez az InGenius

LHR Gel Documentation and Analysis System (Syngene) programot vettük igénybe; az RNS detektálása UV fény segítségével történt. Ideális esetben (megfelelő integritású RNS) két csík látható a géliképen (18S rRNS és 28S rRNS). Kettőnél több csík megjelenése esetén a minta nem használható a továbbiakban.

3.4.2. Reverz transzkripció

Mivel a PCR eljárás során RNS nem amplifikálható, ezért az RNS-t szükséges cDNS-é átírni. A folyamathoz a RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit-et (Fermentas) használtuk, a következők szerint: PCR csövekben 1 µl RNS minta, 1 µl random hexamer primer és 10 µl RNáz-mentes víz keverékét 70°C-on, 5 percig inkubáltuk az RNS molekulák linearizációja érdekében. Az inkubációs idő leteltét követően a csövek tartalmát 4 µl reakciópufferrel, 1 µl RNáz inhibitorral (RiboLock) és 2 µl dNTP-keverékkel egészítettük ki. Az 1 µl reverz-transzkriptáz hozzáadását megelőzően az elegyeket összekevertük és 25°C-on, 5 percig inkubáltuk. Az átírás 10 percig 25°C-on, majd 60 percen keresztül 42°C-on folyt. Végül, egy 10 perces, 70°C-os periódus leállította a reakciót.

3.4.3. qPCR

PCR-készülékünk (MiniOpticon System; BioRad) kvantitatív real-time PCR vizsgálatok elvégzésére alkalmas: a DNS-amplifikáció minden ciklusa után detektálja a minták fluoreszcenciáját megfelelő hullámhosszú gerjesztő fényben (ez a dsDNS-ekhez reverzibilisen kötődő, reakcióelegyben lévő fluoreszcens festéknek köszönhető). Így a PCR termékek mennyiségét a berendezés a reakció közben folyamatosan méri.

A különböző kísérletekben a következő célgének szerepeltek: IL-8, TNF- α és Hsp70. Referencia génnek a hipoxantin foszforibozil-transzferázt (HPRT) és a ciklofilin-A-t (CycA) választottuk. A primer-párok szekvenciáit az **4. táblázat** tartalmazza.

PCR vizsgálatainkhoz az iQ SYBR Green Supermix kit-et (BioRad) használtuk (ebben van a fluoreszcens festék). A cDNS mintákat ötszörös hígításban használtuk PCR-templátként (hígítás: RNáz-mentes vízzel). A reakcióelegy 2,5 µl hígított cDNS mintából, 12,5 µl 2x iQ SYBR Green Supermix-ből, 0,5 µl forward primerből (10 µM), 0,5 µl reverse primerből (10 µM) és 9 µl RNáz-mentes vízből állt. A végtérfogat így minden csőben 25 µl volt. Minden cDNS mintából két reakcióelegyet készítettünk (két párhuzamos minta).

4. táblázat: A PCR-reakcióban használt primer-párok

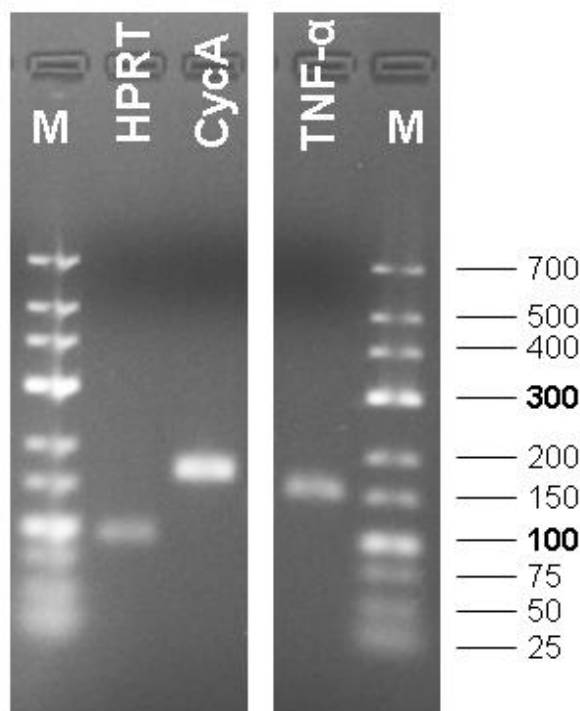
Gén	NCBI azonosító	Primer szekvenciák	PCR termék mérete (bp)
IL-8	NM_213867	F 5'-AGAGGTCTGCCTGGACCCCA-3' R 5'-GGGAGCCACGGAGAATGGGT-3'	126
TNF- α	NM_214022	F 5'-TTCCAGCTGGCCCCCTTGAGC-3' R 5'-GAGGGCATTGGCATAACCCAC-3'	146
Hsp70	NM_001123127	F 5'-GCCCTGAATCCGCAGAATA-3' R 5'-TCCCCACGGTAGGAAACG-3'	???
HPRT	NM_001032376	F 5'-GGACTTGAATCATGTTTGTG-3' R 5'-CAGATGTTTCCAAACTCAAC-3'	91
CycA	NM_214353	F 5'-GCGTCTCCTTCGAGCTGTT-3' R 5'-CCATTATGGCGTGTGAAGTC-3'	160

A PCR reakciók hőprofilja: 3 perc 95°C (cDNS denaturáció), ezután 40 egyforma ciklus (20 mp 95°C, 30 mp 60°C, 30 mp 72°C, 10 mp fluoreszcencia-leovás). Az utolsó ciklus végeztével a PCR-készülék a hőmérsékletet lassan emelve minden 0,5°C növekedés után megméri a minták fluoreszcenciáját (olvadáspont-analízis). Ez arra szolgál, hogy megtudjuk, mennyire volt specifikus a reakció, hányféle PCR termék keletkezett.

A PCR reakciók hatékonyságát úgy állapítottuk meg, hogy egy kiválasztott (ötszörös hígítású) cDNS mintából hígítási sort készítettünk, majd az így készült oldatokkal PCR-t végezve az összes használt génre (célgénnek és referenciagénnek) nézve, felvettük azok standard görbéit. Ezekből lehet meghatározni a hatékonyságot.

3.4.4. A PCR-termékek ellenőrzése

Agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, hogy a PCR termékek hossza a vártnak megfelelő-e, tehát a kívánt gének amplifikációja történt-e meg. A 3.4.1. pontban leírt módszertől eltérően itt 2%-os agaróz gélét készítettünk (2 g agarózból). A gél zsebeibe 5 μ l PCR-termék és 1 μ l töltőpuffer keverékét juttattuk. A legszélső zsebekbe 2 μ l molekulasúly marker (O'GeneRuler Low Range DNA Ladder; Fermentas) került. A 25 perces elektroforézis 1x TBE pufferben, 80 V feszültség alatt zajlott le. A megjelenő csíkok vizualizációját a 3.4.1. pont szerint végeztük (7. ábra), míg az ampikonok hosszát a GeneTools Software-el (Syngene) határoztuk meg.



7. ábra: TNF- α , és a két referenciagén képe agaróz gélen. M: molekulatömeg marker

3.4.5. A relatív génexpresszió meghatározása és adatelemzés

A küszöb ciklus érték (Ct) azt a ciklusszámot jelenti, ahol küszöbvonal el metszi a felvett fluoreszcencia görbét. Ezt a mutatót a PCR-készülék számítja ki mindegyik minta esetében, a következő szempont alapján: a küszöbvonalat a fluoreszcens jel exponenciálisan növekvő tartományába igazítja, ugyanis a láncreakció hatékonysága ekkor a legjobb (minden ciklus során megduplázódik a templátok mennyisége). Kézenfekvő módon azokhoz a mintákhoz, ahol a cDNS koncentrációja nagyobb, kisebb Ct érték fog tartozni, mivel kevesebb ciklus is elég lesz hozzá, hogy a PCR termékek mennyisége elérje a fluoreszcencia detektálásához szükséges szintet.

A vizsgált célgének relatív expressziójának meghatározásához a REST 2009 programot (Relative Expression Software Tool) használtuk. A szoftver által a génexpresszió meghatározására használt képlet a következő:

$$\text{koncentráció} = \text{efficiencia}^{Ct(\text{kontroll}) - Ct(\text{minta})}$$

$$\text{relatív expresszió} = \frac{\text{a célgén koncentrációja}}{\text{referenciagén koncentrációjának geometriai átlaga}}$$

Az R 2.11.1 programcsomag (2010) segítségével elvégzett statisztikai kiértékelésnél a relatív génexpresszió értékeket átlag $\pm$ SEM (n) formában adtuk meg, ahol a SEM standard hibát jelent, az n pedig az párhuzamos mérések számát. Az átlagok közti eltéréseket varianciaanalízissel (ANOVA) állapítottuk meg, 5%-os szignifikancia szint mellett ($p=0,05$). Az ANOVA megerősítette az adatok normál eloszlását és a varianciák homogenitását.

3.5. IL-8-termelés meghatározása szendvics-ELISA módszerrel

Az IL-8 gyulladáscsökkentő citokin termelődését sertés-specifikus IL-8 ELISA-kittel (Invitrogen) vizsgáltuk (TNF- α -hoz nem találtunk megfelelő kippet, amivel elvégezhetjük volna az ELISA-t). A membrán-inzerten tenyésztett IPEC-J2 sejteket 1 órán keresztül H₂O₂-al kezeltük (1 mM). Ezután a különböző sejtenyészeteket kísérleti csoporttól függően további 0, 1, 4, 6, vagy 24 órán át inkubáltuk. Az inkubációs idő leteltével az apikális és bazolaterális médiumot összegyűjtöttük, amivel a gyártó utasításai szerint elvégeztük az ELISA-tesztet:

A liofilizált Sw IL-8 antigén standardet hígítópufferben (Standard Diluent Buffer) feloldva 10000 pm/ml standard törzsoldatot készítettünk, ebből 120 μ l-t egy 480 μ l hígítópuffert tartalmazó csőbe mértünk át, így egy 2000 pg/ml koncentrációjú oldat jött létre. Kétszeres hígításokkal hígítási sort készítettünk (2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, és 31,2 pg/ml-es oldatok). A hígítási sor a kalibrációs görbe felállításához volt szükséges.

Az – IL-8 elleni – antitestekkel borított belső felületű lyukakat tartalmazó műanyag lemez lyukaiba 50 μ l inkubációs puffert pipettáztunk. Egy lyukat fenntartottunk a vaknak (chromogen

blank), ezt az első lépések alatt üresen hagytuk. A kalibrációs görbe első pontjának megfelelő lyukba 50 µl hígítópuffer került, további 7 lyukba pedig a hígítási sornak megfelelően a standard különböző koncentrációjú oldataiból mértünk be 50-50 µl-t. A többi lyukba mintáinkat (apikális és bazolaterális médium) pipettáztuk, szintén 50 µl mennyiségben. A lemezt letakarva 2 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk, ez alatt az antigének az antitestekhez kötődtek. A lyukak folyadéktartalmát leszívtuk, majd a lyukakat mosópuffer (Wash Buffer Concentrate 25X) és víz 1:24 arányú keverékével négyszer átmostuk.

A lyukakba ezután 100 µl biotinizált IL-8 ellenanyag-oldatot juttatunk (Sw IL-8 Biotin Conjugate); az ellenanyagok a következő 1 órás inkubáció (szobahőmérsékleten, letakarva) alatt hozzákötődtek a lyukak alján lévő antitestekhez kihorgonyozott IL-8 molekulákhoz, létrehozva az ellenanyag-antigén-ellenanyag „szendvicset”. A folyadék újbóli eltávolítása és mosás után a streptavidin-peroxidáz komplex (Streptavidin-HRP) 100-szoros hígítású oldatát mértük a lyukakba (100 µl). A korábbiakhoz hasonló körülmények között inkubáltuk a lemezt, ezúttal 30 percig. A inkubáció során a biotin kötőhelyeihez kapcsolódtak az avidin-enzim komplexek (egy biotin molekulához 4 avidin képes kötődni, ez megnöveli a reakció szenzitivitását). Az inkubáció után az oldatokat eltávolítottuk, a lyukakat átmostuk, majd hozzáadtuk az utolsó komponenst, a kromogén szubsztrátot (Stabilized Chromogen, 100 µl). A 100 µl kromogént az eddig üresen álló chromogen blank lyukába is bemértük.

Pozitív esetben a peroxidáz hatására azonnal kékülni kezd a kromogén. 30 perc, sötét helyen történő inkubáció után 100 µl leállító oldatot adtunk a mintákhoz (a chromogen blank-hez is). A kék szín sárgára váltott a csövekben, aminek intenzitását mikrotiter lemez leolvasóval (MRX TC revelation Mikroplate Reader; DYNEX Technologies) detektáltuk a vak ellenében. Az abszorbanciát 450 nm-en olvasta le a készülék (OD-érték), amelynek szoftvere felvette a kalibrációs görbét, és annak alapján kiszámította a minták IL-8 koncentrációját pg/ml-ben.

3.6. IPEC-J2 sejtek vitalitásának vizsgálata oxidatív stressz esetén

Az IPEC-J2 sejtek vitalitását DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) festéssel határoztuk meg különböző koncentrációkban alkalmazott H₂O₂-kezelés után. A DAPI egy fluoreszcens festék, ami a sejtmagban a DNS A-T gazdag szakaszaihoz kötődik, így a sejtmagok fluoreszcens fényben kék színben tűnnek elő. A DAPI az élő sejtek membránján csak nagy koncentrációban hatol át, ezért használható a nekrozis kimutatására: 1 µg/ml DAPI/PBS oldat használatakor csak a halott sejtek láthatók kék színben.

A DAPI festés előtt a sejteket 1 órán keresztül H₂O₂-kezelésnek tettük ki, 0, 0.5, 1, 2, és 4 mM koncentrációkban. Ezután a H₂O₂-oldatot eltávolítottuk, a sejteket pDMEM/F12-vel mostuk, és

1 µg/ml DAPI/PBS oldattal 1 órán keresztül festettük. A festés végén a sejteket PBS-el ötször átmostuk, majd 4 v/v%-os formaldehid/PBS oldattal fixáltuk. A fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatig a mintákra 3:1 arányú glicerín/PBS oldatot rétegeztünk és 5°C-on tároltuk őket.

3.7. Az IPEC-J2 sejtekben oxidatív hatására fellépő lipidperoxidáció mérése

Az IPEC-J2 sejteken H₂O₂-kezelés hatására kialakuló lipidperoxidáció mértékét a következő paraméterek mérésével határoztuk meg: konjugált diének (CD) és -triének (CT) (a lipidperoxidáció kezdeti szakaszának termékei), valamint az MDA (az előrehaladott lipidperoxidáció végterméke) mennyisége. Az antioxidáns rendszer állapotát jelző redukált GSH-tartalmat és GSH-Px enzimaktivitást is vizsgáltuk.

A kontroll sejtekhez PBS és MRS keverékét adtuk (1,3 ml és 0,2 ml), a többi sejthez a 0,2 ml MRS mellett 1,3 ml PBS-el hígított H₂O₂ oldatot pipettáztunk. A peroxid-koncentráció az 1,5 ml folyadékban a kísérleti csoportoknak megfelelően 1, 2, és 4 mM volt. 1 óra szobahőmérsékleten történő inkubálás után az oldatokat eltávolítottuk, és a tenyészeteket PBS-el kétszer átmostuk. A PBS leöntését követően a sejtekhez 1,5 ml 0,3 w/v%-os KCl-oldatot mértünk, majd a sejtkaparóval leválasztottuk őket a tenyésztőedény felületéről. A lekaparás után a sejtszuszpenziót a KCl-oldatban 20 másodpercig szonikáltuk ultrahangos homogenizátorral (Sonoplus UW 2200; BANDELIN Electric), majd 3000 RPM-el centrifugáltuk (5°C, 20 perc). A felülúszót összegyűjtöttük a lipidperoxidációs kísérletekhez.

A mintákat külső laboratóriumba küldtük (SzIE-MKK, Állattudományi Alapok Intézet Takarmányozástani Tanszék laboratóriuma), ahol egyrészt az MDA, CD és CT tartalmakat mérték (spektrofotometriás módszerrel; MDA: 535 nm, CD: 234 nm, CT: 268 nm), másrészt megállapították a minták redukált GSH-tartalmát és GSH-Px enzimaktivitását.

3.8. Lactobacillus plantarum 2142 specifikus fehérjetermékeinek kimutatása

A Lp 2142 felülúszójában található peptid és fehérje termékeket két különböző fehérjeanalitikai módszerrel vizsgáltuk: a kisebb molekulatömegű peptideket (<7 kDa) kapilláris-zónaelektroforézissel (CZE), az ennél nagyobb fehérje-produktumokat (7-200 kDa) SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) mutattuk ki.

A CZE elválasztás BioFocus 2000 készüléken (Bio-Rad) történt, bevonat nélküli, 38°C-os kvarc kapillárisban, UV detektálással (200 nm: ez a hullámhossz a peptidkötésre jellemző). A vivőelektrolit 0,1 M-os foszfátpuffer volt (pH=2,5). Az elektroforézis megkezdése előtt szükséges volt az SMSz (minta) és MRS (kontroll) hőkezelése (100°C, 10 perc), a fehérjék eltávolítása céljából; így csak a kisebb peptidek maradtak az oldatokban. A használt módszer eredetileg a húsban található biológiailag aktív dipeptidek (karnozin és anzerin) kimutatására lett kidolgozva, a

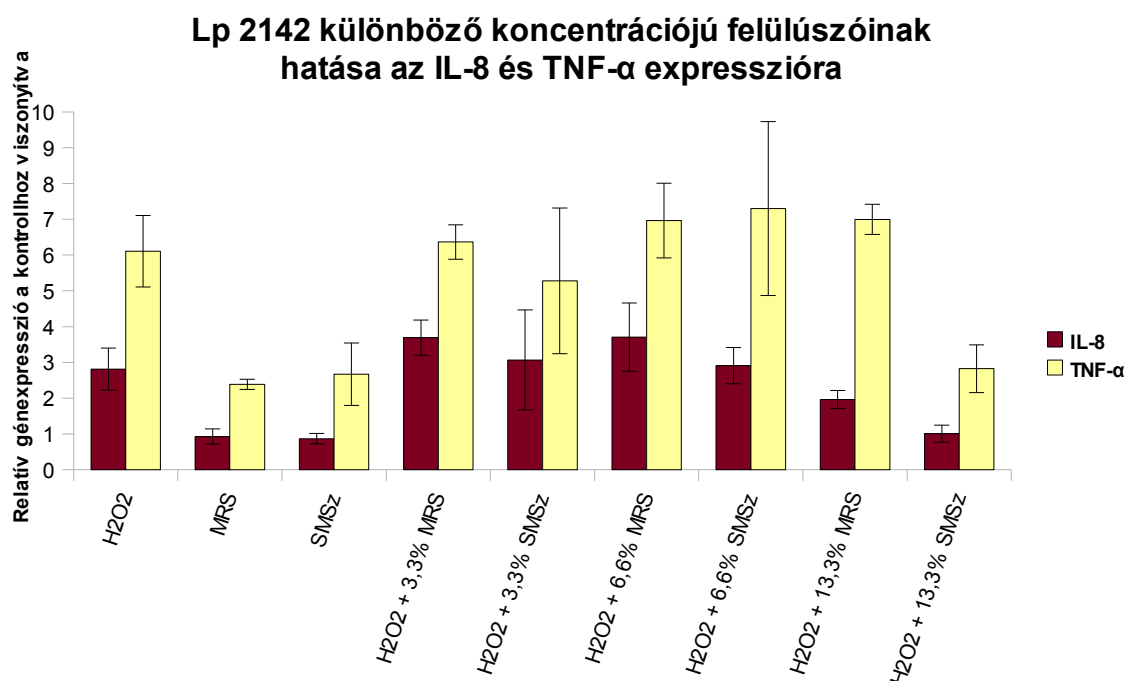
kimutatási határ karnozin esetében 0,016 μ M.

Az SDS-PAGE elválasztás Laemmli módszerével történt [68], Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad) készüléket használva, 15%-os akrilamid gélben. A liofilizált minta 300 μ l mintaoldó pufferben (3% Na-dodecil-szulfát (SDS), 62 mM Trisz-(hidroximetil)-amino- metán, 8,7% glicerin, 10% β -merkaptó-etanol, pH: 6,8) lett feloldva. 5 perc forralás után a gél zsebeibe 5, 10, és 15 μ l mennyiségben kerültek minták (SMSz és MRS-kontroll). A gél festése Coomassie Brilliant Blue R-250 festékoldattal (érzékenység: 100 ng) illetve ezüst nitráttal (érzékenység: 5-10 ng) történt. A gél dokumentációjára a Gel Doc 2000 (Bio-Rad) rendszert használtuk. A kiértékelést a Quantity One Software 1-el (Bio-Rad) végeztük, a fehérjék jeleit az első zsebbe töltött molekulatömeg standard (LMW Pharmacia) sávjaihoz hasonlítva.

4. EREDMÉNYEK

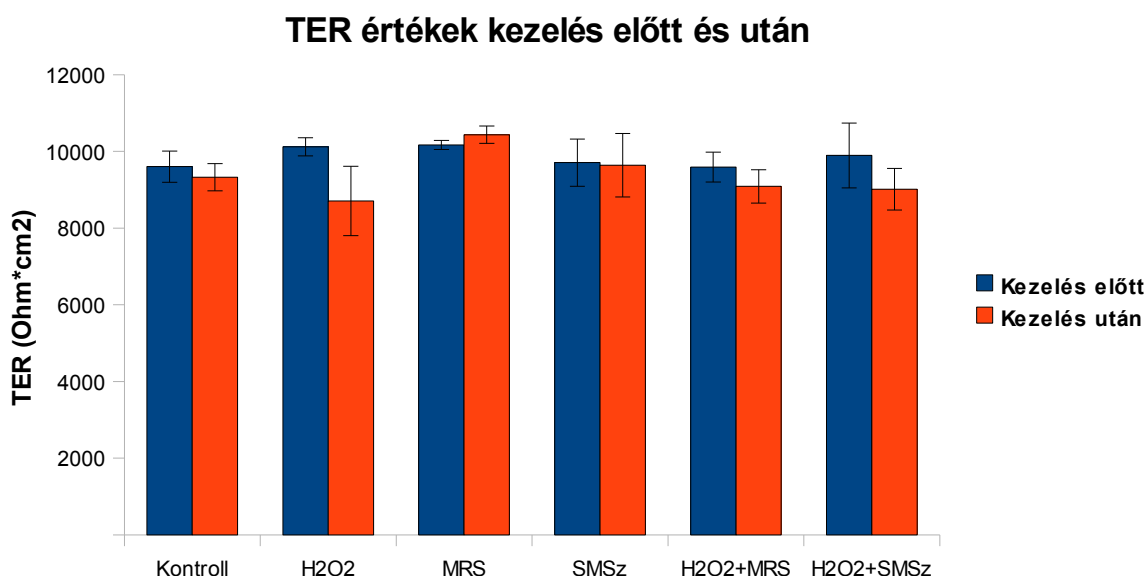
4.1. A *Lactobacillus plantarum* 2142 felülúszójának hatása a hidrogén-peroxiddal kezelt IPEC-J2 sejtek génexpressziójára

A Lp 2142 SMSz három különböző koncentrációját használva vizsgáltuk a gyulladásokeltő citokinek expresszióját hidrogén-peroxiddal kezelt IPEC-J2 sejtekben. A **8. ábrán** látható, hogy a 3,3 és 6,6 v/v% koncentrációjú felülúszók nem okoztak szignifikáns változást az IL-8 és TNF- α expresszióban a kizárólag hidrogén-peroxiddal kezelt csoporthoz képest. A pozitív effektus ($P < 0,05$) csak 13,3%-os SMSz-t használva volt megfigyelhető, ezért a későbbi kísérletekben ezzel a koncentrációval dolgoztunk. A számszerű eredmények a mellékletekben megtalálhatóak (7. táblázat).



8. ábra: A Lp 2142 felülúszó különböző koncentrációinak hatása a gyulladásos citokinek génexpressziójára hidrogén-peroxiddal kezelt IPEC-J2 sejteken. Átlag $\pm$ standard hiba (SEM). $n=4$

A **9. ábrán** a kísérletek előtti és a kezelések utáni TER értékek láthatók (ld. még: a mellékletek **8. táblázata**). Mindegyik kiindulási sejtenyészetben mért TER érték meghaladta a kísérletek elkezdésének feltételül szabott 8000 Ohm/cm² értéket (ez a többi, például a szerves savakat vizsgáló qPCR-es kísérlethez használt sejtenyészetnél is így volt), egymástól pedig alig különböznek. A H₂O₂, illetve az SMSz vagy MRS hozzáadása sem változtatta meg markánsan a TER-t, ami arra utal, hogy egyik kezelés sem károsította súlyosan az enterocita-monolayer integritását.



9. ábra: Az IPEC-J2 sejteken mért TER értékek H₂O₂, SMSz (Lp 2142 felülűszo), MRS kezelések előtt és után

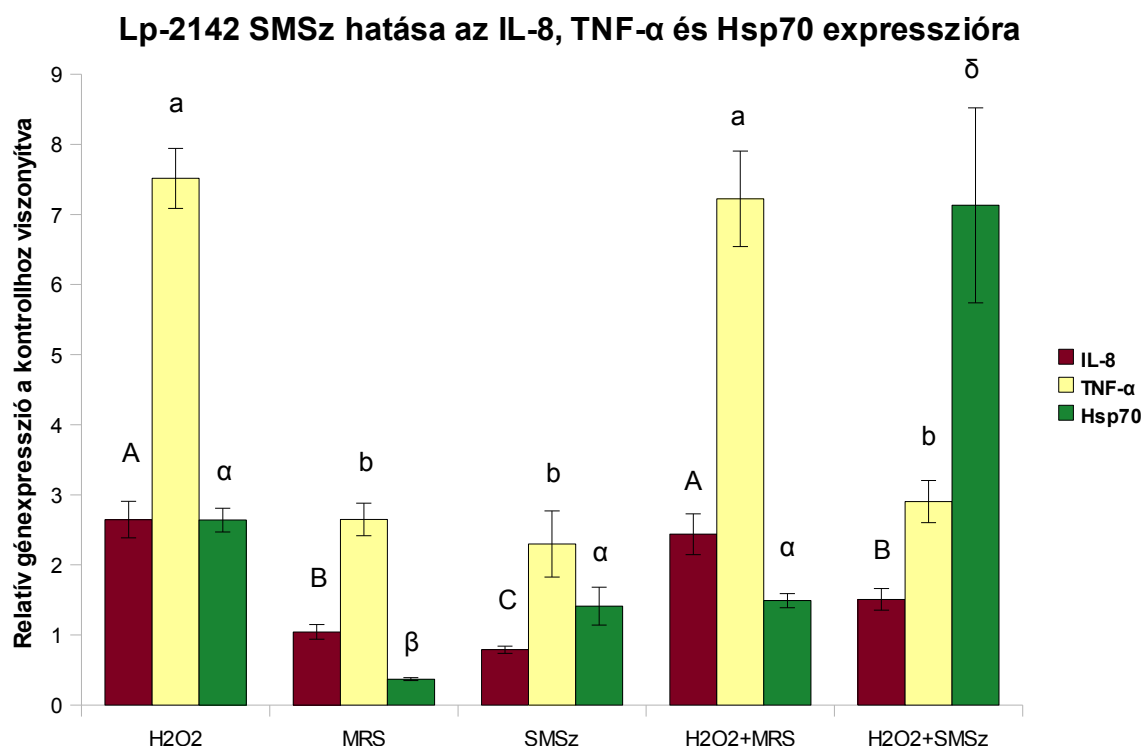
Az IL-8 és TNF- α gyulladásos citokinek és a Hsp70 hősokkfehérje génjeinek relatív expresszióját a peroxidkezelés és SMSz hatására a **10. ábra** szemlélteti.

Az IL-8 esetében látható, hogy az SMSz és az MRS nem változtatja meg a transzkripció mértékét, de H₂O₂ hatására mintegy 2,5-szeresére ($P < 0,05$) megnő az expresszió a negatív kontrollhoz képest, regulátoros válaszként az oxidatív stresszre. A Lp 2142 felülűszoja hatásosnak bizonyult a gyulladásos citokin termelésének mérséklésében: a peroxid mellett SMSz-el is kezelt sejttényeszetek IL-8 expressziója csak kevéssel haladja meg (nem szignifikánsan) a negatív kontrollnál mért szintet, miközben az érték jóval alacsonyabb, mint a pozitív kontroll esetében ($P < 0,05$). Megfigyelhető, hogy a *Lactobacillus* tápleves (MRS) nem befolyásolta a sejtek H₂O₂-ra adott reakcióját.

A TNF- α -t tanulmányozva hasonló tendencia figyelhető meg, mint az IL-8-nál, de a különbségek kifejezettebbek. Érdekes, hogy az önmagában adott SMSz és MRS hatására is szignifikáns (2-3-szoros) up-reguláció figyelhető meg. Az oxidatív túlsúly (pozitív kontroll) a génexpresszió több, mint 7-szeres növekedését váltotta ki a bélhámsejtekben. Az MRS itt sem véd a gyulladás ellen, az SMSz azonban szinte teljesen neutralizálja a H₂O₂ hatását ($P < 0,05$): az expresszió peroxid és SMSz együtt adása esetén nem haladja meg szignifikánsan az SMSz kontrollnál mért szintet. A gyulladást mérséklő hatás itt tehát még kifejezettebb, mint az IL-8 esetében.

A Hsp70 expressziója az alaptermelés mintegy 2,5-szeresére emelkedik H₂O₂-ot adva a sejtekhez. Az SMSz itt ellenkezőleg hat, mint a két előző esetben: jelentősen tovább emeli a Hsp70 génjének transzkripcióját (alapérték kb. 7-szerese). Ez szignifikáns eltérést jelent a pozitív kontrollhoz képest. A Hsp70-expresszió növekedése sejtvédő hatású a gyulladás okozta

károsodásokkal szemben, ugyanis chaperonhatásuknál fogva segítik fenntartani vagy helyreállítani a sérült szerkezetű sejtfehérjék natív állapotát. Az MRS a Hsp70-termelés tekintetében sem módosítja szignifikánsan az IPEC-J2 sejtek H₂O₂-ra adott válaszát, egyedüli adása viszont több, mint 50%-kal csökkenti a hősokkfehérje alaptermelődését. Az SMSz kontroll csoportoknál ez nem figyelhető meg. Összességében az eredményekből kiderült, hogy a Lp 2142 sejtmentes felülűszója csökkenti a gyulladásos folyamatokat és védi a sejteket az oxidatív károsodásoktól. Az eredmények a mellékletekben is megtalálhatók (9. táblázat).

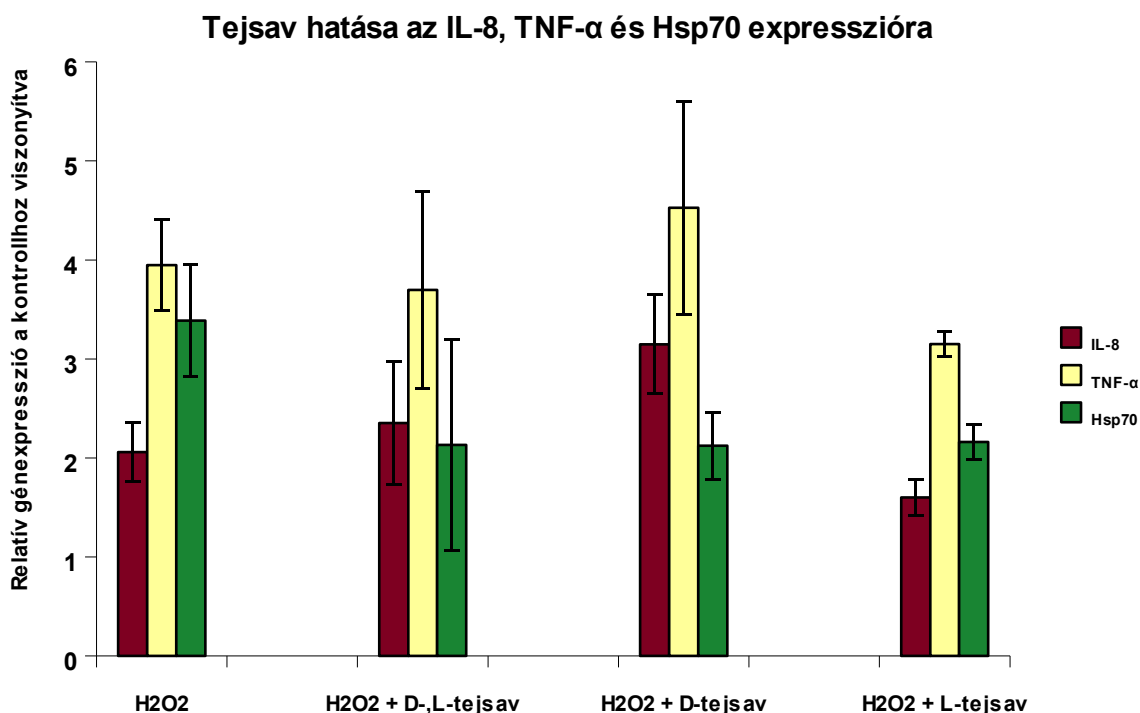


10. ábra: Az IPEC-J2 sejteken mért IL-8, TNF- α , és Hsp70 relatív génexpresszió változásai H₂O₂, SMSz (Lp 2142 felülűszó), MRS kezelések hatására. A különbözően jelölt csoportok közti eltérés szignifikáns (P<0,05)

Átlag $\pm$ SEM. n=3

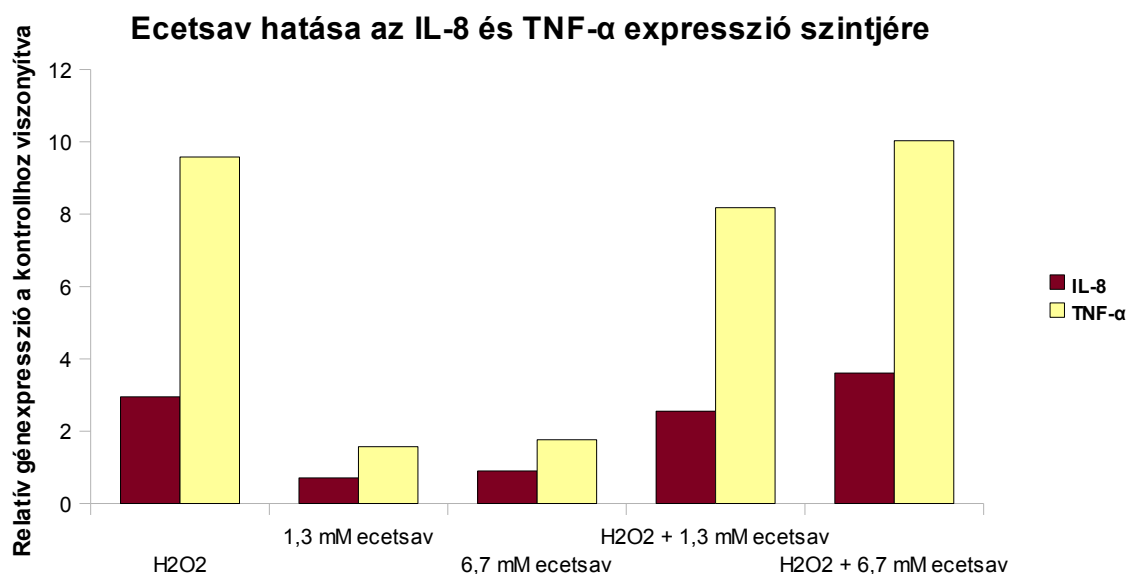
4.2. Szerves savak hatása a sejtek génexpressziójára oxidatív stresszben

A 6,7 mM koncentrációjú racém-, D-, és L-tejsav szerepét a H₂O₂ kiváltotta oxidatív stresszben, a gyulladásos citokinek és a Hsp70 hősokkfehérje termelődésének mértékére a **11. ábra** (és a mellékletek között a **10. táblázat**) mutatja be. Amint a diagramról leolvasható, nincs lényeges különbség a tejsav három módosulatának hatása között. Statisztikailag nem bizonyítható, hogy bármelyik tejsav optikai izomer szignifikáns védőhatást gyakorolna az oxidatív stresszel szemben.



11. ábra: Az IPEC-J2 sejteken mért IL-8, TNF- α , és Hsp70 relatív génexpresszió változásai H₂O₂ és tejsav-kezelések hatására. Átlag $\pm$ SEM. n=3

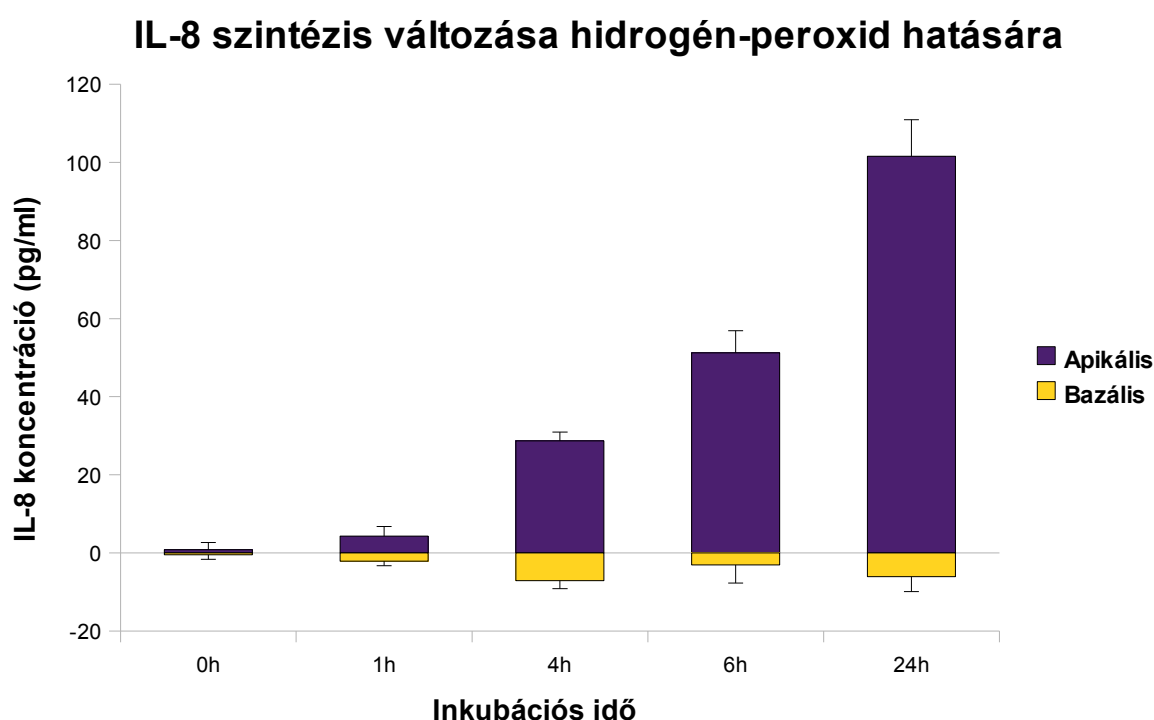
A két különböző koncentrációban történő ecetsavas kezelés hatása az IL-8 és TNF- α gének átírására a **12. ábrán** figyelhető meg (ld. még: mellékletek, **11. táblázat**). A kontrollokhoz képest markáns, majdnem tízszeres mértékű TNF- α - és a szintén szignifikáns, kb. 2,5-szeres IL-8 up-regulációt az ecetsav egyik vizsgált koncentrációjában alkalmazva sem csökkentette. Kijelenthető, hogy a tejsavnak és ecetsavnak sincs kizárólagos jótékony hatása az oxidatív stressz okozta gyulladások elleni védekezésben.



12. ábra: Az IL-8, TNF- α , és Hsp70 relatív génexpresszió változásai H₂O₂ és ecetsav-kezelések hatására.

4.3. IL-8 szintézis az oxidatív hatás mértékétől függően IPEC-J2 sejtekben

A qRT-PCR-el végzett kísérletünkben a gyulladásos citokinek és a Hsp70 génexpressziójának meghatározása arra irányult, hogy a sejtekben milyen reakciókat vált ki az oxidatív stressz, és számolhatunk-e az SMSz vagy az általa termelt szerves savak védőhatásával a gyulladás ellen. A vizsgálatok igazolták, hogy hidrogén-peroxid hatására a sejtekben a gyulladásos termékek génexpressziója nő. A citokinek tényleges termelődésének kimutatásához szükségesek a transzlációs szintű vizsgálatok, amelyek során arra is fény derülhet, mennyi idővel követi a transzkripciót a fehérje-szintézis. Ebben a kísérletben az egyik pro-inflammatorikus citokin, az IL-8 koncentrációját detektáltuk az apikális és bazolaterális tápfolyadékban oxidatív stresszt követően, szendvics-ELISA módszerrel.



13. ábra: Az IPEC-J2 sejtek médiumában mért IL-8 koncentráció oxidatív stressz esetén, 0-24h inkubáció után. A különböző betűjelű csoportok között a különbség szignifikáns ($P < 0,05$). Átlag $\pm$ SEM. $n=7$

Amint az a **13. ábrán** látható (ld. még: mellékletek, **12. táblázat**), méréseink az apikális médiumban már 4 óra után szignifikáns emelkedést mutattak az IL-8 koncentrációban (peroxidkezelés nélkül egy igen alacsony alapszokréción figyelhető csak meg). A citokin mennyisége 6 óra inkubáció után a 4 órás szint majdnem kétszeresére nőtt, a legnagyobb mértékű szintézist pedig 24 óra elteltével tapasztaltuk (a kontrollhoz képest több, mint 100-szoros növekedés). Az IL-8 mennyiségének növekedése tehát időfüggőnek bizonyult.

Míg az IL-8 génexpresszió csúcsa 1 óra inkubációs idő után mérhető; a fehérjeszintézis lassabban történik, a következő 1 nap során fokozatosan nő az apikális koncentráció, amelynek

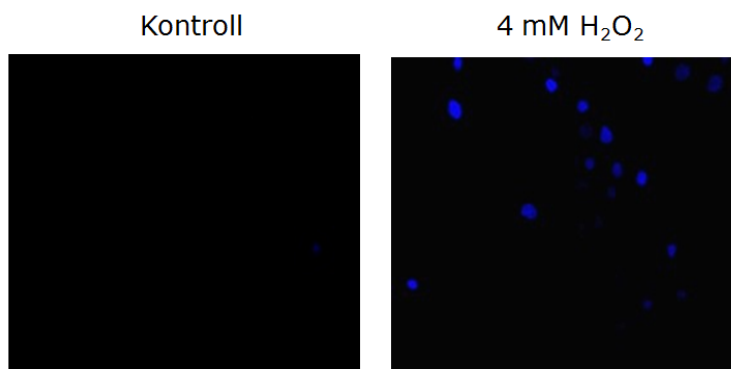
végző értéke meghaladja a 100 pg/ml-t. A bazolaterális kompartmentben az IL-8 mennyisége csak kevéssel nőtt az amúgy is minimális alapértékhez viszonyítva (nem szignifikáns), ez azt bizonyítja, hogy a megtermelt citokint a bélhámsejtek az apikális térbe választják ki (*in vivo* körülmények közt ez a bél lumenének felel meg).

4.4. A hidrogén-peroxid kezelés kiváltotta sejthalál IPEC-J2 sejteken

A sejtek vitalitását különböző koncentrációkban alkalmazott peroxid-kezelés után vizsgáltuk. A DAPI festés során a nekrotikus sejtek aránya a H₂O₂-koncentrációtól függően változott (**5. táblázat**): 0,5 mM és 1 mM koncentrációkban nem tapasztaltunk számottevő sejthalált (1-2%-os arány, ez nem különbözik szignifikánsan a kontroll csoportnál mért értéktől, ahol nem tettük ki a sejteket oxidatív stressznek), ezzel szemben a 2 és 4 mM-os H₂O₂-oldatok használatakor már jelentősen megnőtt a nekrozis a bélhámsejtek között (P<0,05). A mikroszkópos vizsgálat során kék fluoreszcenciát mutattak az

14. ábra: DAPI festés eredménye a kontroll csoportnál, és 4 mM-os

elhalt sejtek magjai (**14. ábra**).



H₂O₂ oldat használatakor (a nekrotikus sejtek magjai kék színűek)

5. táblázat: Sejthalál IPEC-J2 sejteknél DAPI festéssel vizsgálva, H₂O₂-kezelést követően

H ₂ O ₂ koncentráció (mM)	Elpusztult sejtek (DAPI)
0 mM	2,00%
0,5 mM	1,10%
1 mM	1,40%
2 mM	10,10%
4 mM	14,60%

4.5. Oxidatív stressz okozta lipidperoxidáció IPEC-J2 sejteknél

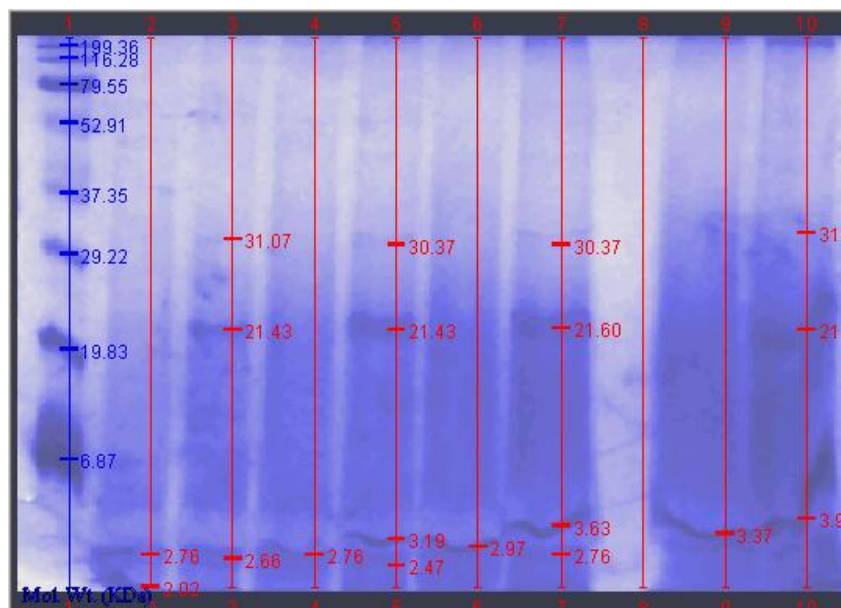
A ROS egyik legjelentősebb sejtkárosító hatása a – főleg a biológiai membránokat érintő – lipidperoxidáció [19]. Ennek markereit vizsgálva nem sikerült igazolni feltételezésünket, hogy a H₂O₂-koncentrációk növekedésével arányosan nő a lipidperoxidációs termékek mennyisége és csökken az antioxidáns védekezőrendszerek kapacitása az entrocytákban. Ez a tendencia statisztikailag a kísérletünkben vizsgált egyik paraméternél sem volt igazolható (**6. táblázat**).

6. táblázat: A glutation-védekezőrendszer kapacitása és lipidperoxidációs értékek. GSH: glutation, GSH-Px: glutation-peroxidáz, MDA (malondialdehid), CD (konjugált diének), CT (konjugált triének). Átlag $\pm$ SEM, n=3

	GSH (μ M)	GSH (μ M/ g fehérje)	GSH-Px (E/ g fehérje)	MDA (nmol/ g fehérje)	CD (ABS 234 nm)	CT (ABS 268 nm)
0 mM H ₂ O ₂	189,902 $\pm$ 2,3	161,205 $\pm$ 22,86	37,263 $\pm$ 5,69	2,495 $\pm$ 0,89	0,528 $\pm$ 0,18	0,122 $\pm$ 0,03
1 mM H ₂ O ₂	198,186 $\pm$ 2,3	216,573 $\pm$ 38,84	43,996 $\pm$ 6,79	1,637 $\pm$ 0,35	0,577 $\pm$ 0,24	0,135 $\pm$ 0,04
2 mM H ₂ O ₂	196,275 $\pm$ 2,3	181,724 $\pm$ 14,4	46,026 $\pm$ 3,52	1,851 $\pm$ 0,25	0,453 $\pm$ 0,03	0,107 $\pm$ 0,01
4 mM H ₂ O ₂	235,147 $\pm$ 38,24	237,797 $\pm$ 57,17	42,138 $\pm$ 3,02	1,556 $\pm$ 0,33	0,790 $\pm$ 0,14	0,165 $\pm$ 0,3

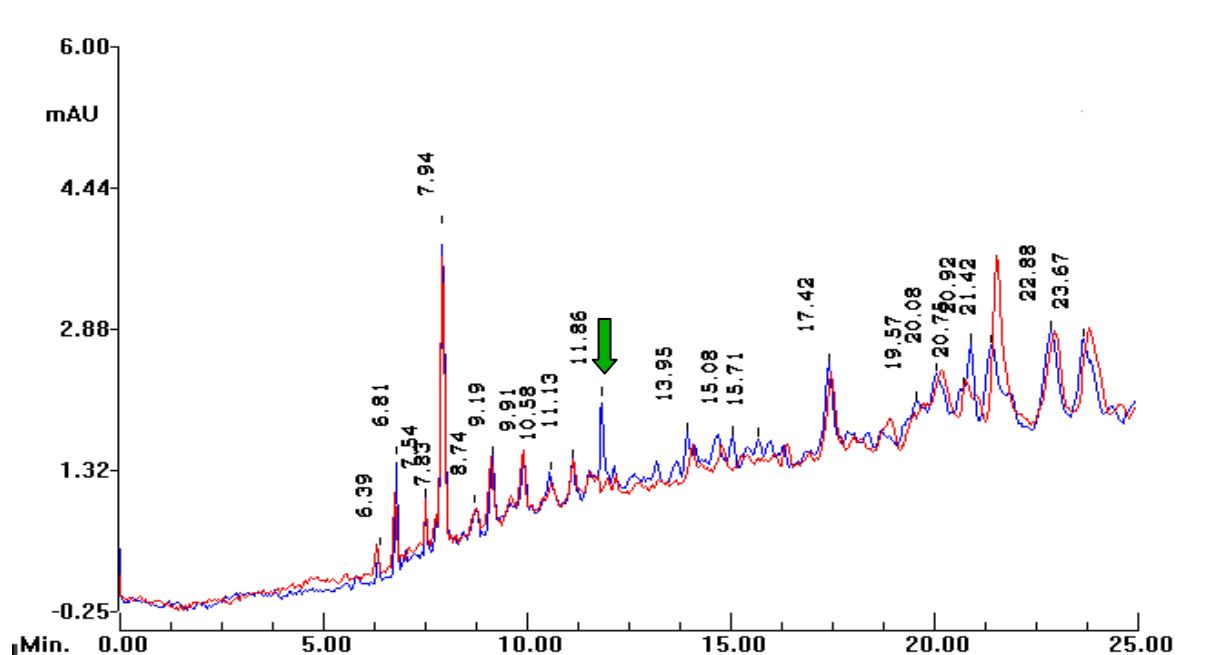
4.6. A *Lactobacillus plantarum* 2142 specifikus fehérje- és peptidtermékei

A *Lactobacillus* fajok sokféle fehérjetermészetű biológiailag aktív anyagot termelnek, ilyenek például a bakteriocinek [11] Lp 2142 gyulladáscsökkentő hatásának hátterében jelentőségük lehet a peptid és fehérje termékeknek. A 7-200 kDa molekulasúlyú fehérjék kimutatásához használt 15% SDS-PAGE elválasztás három párhuzamos minta elemzése során (n=3), két különböző fehérjét mutatott ki a Lp 2142 SMSz-ben, amelyeket az MRS nem tartalmaz. Ezek a specifikus termékek két jól látható sávként tűnnek elő a Coomassie Brilliant Blue R-250-el és ezüst-nitráttal festett géleken. A nagyobb mennyiségben jelen lévő, erősebb sávot adó fehérje mérete a 20-29 kDa közti tartományban van (kb. 21,5 kDa), a halványabb sávot adó másik termék molekulatömege 29 és 37 kDa közötti (kb. 31,5 kDa). A gélelektroforézis eredménye a **15. ábrán** látható.



15. ábra: Az SDS-PAGE fehérjeanalízis eredményeként kapott gélképek. Bal oldali: Coomassie Brilliant Blue R-250 festés, jobb oldali: ezüst-nitrátos festés. Oszlopok balról jobbra mindkét gélnél: molekulastandard (1), 5 µl tápfeles-MRS (2), 5 µl felülúszó-SMSz (3), 10 µl MRS (4), 10 µl SMSz (5), 15 µl MRS (6), 15 µl SMSz (7), üres hely (8), 20 µl MRS (9), 20 µl SMSz (10). Kiértékelés: Quantity One Software-I (Bio-Rad)

Kapilláris zónaelektroforézis segítségével kis molekulatömegű peptidek (<7 kDa) jelenlétét próbáltuk kimutatni. A **16. ábrán** látható elektroforetogram számos csúcsa közül egy olyan látható, amely az SMSz mellett nincs meg a kontrollként használt tápfeles, az MRS görbéjében is. Ez a Lp 2142-specifikus peptid 11,86 perces retenciós idővel volt eluálható a kapillárisról.



16. ábra: Akapilláris-elektroforézisben (UV detektálás, 200 nm) eredményül kapott elektroforetogram, amely a *Lactobacillus* felülúszó (SMSz, kék görbe) és a tápfeles (MRS kontroll, piros) 7 kDa-nál kisebb peptidjeit mutatja. Zöld nyíl jelzi a Lp 2142-specifikus peptidet (11,86 percnél)

5. MEGBESZÉLÉS

Az oxidatív stressz hatásának feltérképezése kiemelkedő jelentőségű humán és állategészségügyi szempontból is. Sejt- és molekuláris szintű megismerésének és kivédésének igénye egyre inkább meghatározza a gyulladásos folyamatok kezelési lehetőségeinek kutatási irányát. Bár ismert jó néhány élettani szerepe, leggyakrabban mégis azon betegségekkel kapcsolatban kerül említésre, amelyek patogenezisében mint kórok, vagy mint hajlamosító tényező szerepel. Az ilyen kórképek kezelésében és megelőzésében az oxidatív stressz csökkentése kiemelt fontosságú feladat.

Az oxidatív stressz sejtkárosító hatására a sejtek vitalitása csökken. H_2O_2 -kezelést követően a sejthalál mértéke DAPI festéssel vizsgálva szoros korrelációt mutatott az alkalmazott peroxid-koncentrációval.

Feltételeztük, hogy az oxidatív károsodások legjellegzetesebb megnyilvánulásának, a lipidperoxidációnak számszerűsített értékei is a H_2O_2 -koncentrációval arányosan változnak, és eközben a celluláris antioxidáns védekezőrendszerek kapacitásának (GSH, GSH-Px) fokozatos csökkenése mutatható ki. Az eredmények nem igazolták a várakozásokat, mert egyik paraméter sem függött az oxidatív behatás mértékétől.

Az emésztőrendszerben az oxidatív stressz csökkentésének egyik terápiás lehetőséget a probiotikumok jelentik, melyeket széles körben alkalmaznak, elsősorban a bélflóra egyensúlyának fenntartása érdekében, emésztési funkciók javítására, és különböző bélgyulladások esetén is. A gyulladáscsökkentő hatás – bár sokszor igazolták állatgyógyászati és humán terápiás vizsgálatok is [69, 70, 71] – mechanizmusának részletei még kevésbé ismertek. A hatás kialakításában jelentős szerepet játszhat a bélbeli immunsejtek és az enterocyták citokin-termelésének módosítása [72, 73, 59], ami az immunrendszer parakrin szabályozását befolyásolja. A reaktív oxigén származékok nagy koncentrációban sejthalált okoznak [18], egyes probiotikus baktériumtörzsek ez ellen is mutathatnak védőhatást [74, 75].

A gyulladásos citokinek termelésének csökkentéséhez az élő probiotikumok jelenlétére nincs feltétlenül szükség. A Gyógyszertani és Méregtani Tanszéken végzett korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a jótékony hatás kiváltható tejsavbaktériumok sejtmentes felülűszojával is: a Lp 2142 törzs felülűszoja jelentősen csökkentette a hidrogén-peroxid által előidézett IL-8 termelődést Caco-2 sejtekben [74]. Jelen vizsgálatunkban is igazoltuk a Lp 2142 SMSz gyulladáscsökkentő szerepét: a felülűszo megakadályozta hidrogén-peroxiddal kiváltott IL-8 és TNF- α up-regulációt. Kimutattuk továbbá, hogy az SMSZ sejtvédő hatású: a Hsp70 hősokkfehérje génexpressziója szignifikánsan emelkedett oxidatív körülmények között. Fontos kiemelni, hogy kísérleteinkben a korábban alkalmazott humán vastagbél adenocarcinoma sejtvonal (Caco-2) helyett nem transzformált, sertés jejunumából származó bélhámsejt vonalat (IPEC-J2) használtunk. Az ezt alkotó (polarizált, apikálisan mikrobolyhokat fejlesztő) sejtek által képezett egyrétegű tenyészet

jobb modellt szolgáltat az élő állatokban zajló fiziológiás folyamatokhoz.

Az a tény, hogy a probiotikumok sejtmentes felülúszója önmagában képes csökkenteni a gyulladásos mediátorok termelését azt is jelenti, hogy a baktériumok által termelt és leadott anyagok között olyan (egy vagy több) aktív komponens van, ami alkalmas az oxidatív stressz miatt kialakuló gyulladás csökkenésére. Ha sikerülne azonosítani a jótékony hatásért felelős bakteriális termékeket, a krónikus bélgyulladások kezelésében új lehetőségek nyílnának meg, ugyanis egy izolált hatóanyagot tartalmazó gyógyszerkészítmény terápiás felhasználása számos előnnyel rendelkezne az élő probiotikumokkal szemben. Utóbbiaknál komoly korlátozó tényező, hogy tárolásuk során életképesnek kell maradniuk, megfelelő mennyiségben kell elérniük a gyomor-bélrendszert, ott meg kell tapadniuk a nyálkahártya hámrétegén, és el kell tudniuk szaporodni, hogy a kívánt feladatot ellássák. E miatt ráadásul a hatás kialakulása gyakran lassabb a szükségesnél. A probiotikum tartalmú étrendkiegészítők, gyógyszerkészítmények és állati tápok gyártása során az alkalmazható technológiát behatárolják az említett kritériumok. Természetesen az aktív komponens izolálása esetén sem lehet elvetni a probiotikumok hagyományos használatát, hiszen például a patogén baktériumok elleni küzdelemben és az antibiotikumok okozta hasmenés kezelésében csak az élő és intenzív szaporodásra képes probiotikus baktériumok jöhetnek szóba. A gyógyszer technológia feladata olyan hatékony, célzott hatóanyagleadást biztosító terápiás rendszerek és gyógyszerformák fejlesztése, amelyek igénybevételével az élő probiotikumok kevesebb veszteséggel és nagyobb biztonsággal vihetők be az emésztőrendszerbe. Számos modern elképzelés létezik erre a célra (például electrospinning technikával előállított nanoszálakba zárt *Lactobacillus* törzsek [76]).

A probiotikumok által termelt gyulladáscsökkentő molekulák jellegéről az irodalomban megoszlanak a vélemények. Nem kizárt, hogy több különböző típusú termék együttes hatása nyilvánul meg a bakteriális felülúszók gyulladáscsökkentésének hátterében. Egyes tanulmányok a szerves savak szerepét hangsúlyozzák, mondván, hogy a tejsavbaktériumok által legnagyobb mennyiségben előállított tejsav (esetleg ecetsav és más szerves sav is) felelős a gyulladások keltő citokinek bélben történő termelődésének mérsékléséért [75]. Vizsgálataink nem igazolták a rövid szénláncú szerves savak jelentőségét a gyulladásos folyamatok visszafogásában: H_2O_2 -kezelés mellett tejsavat (racém-, D-, és L-módosulat) és ecetsavat adva a sejttenyészetekhez a gyulladásos citokinek génexpressziója nem volt szignifikánsan kisebb, mint a csak H_2O_2 -nak kitett kísérleti csoportban.

Az irodalom kiemeli a fehérjék jelentőségét a probiotikumok hatásmechanizmusában [11, 77]. A Lp 2142 specifikus peptid- és fehérjetermékeinek kimutatásához kétféle fehérjeanalitikai eljárást alkalmaztunk: SDS-PAGE elválasztással – a 7-200 kDa közötti mérettartományban – két, eltérő molekulatömegű fehérjeterméket mutattunk ki, míg egy kis molekulájú peptid jelenlétét az

SMSz-ben kapilláris elektroforézissel igazoltuk.

A génexpresszió qRT-PCR-el végzett tanulmányozása mellett IL-8 esetében transzlációs szintű vizsgálatot is végeztünk: a sejttenyészetek apikális médiumban mérhető IL-8 koncentráció hidrogén-peroxid hatására 4 óra inkubáció után szignifikánsan nőtt. A legmagasabb citokinszintet 24 órás inkubációt követően mértük. A bazolaterális folyadékközegben az IL-8 koncentráció csak minimális mértékben változott, mert a citokint a bélhámsejtek az apikális oldalon adják le, ami *in vivo* körülmények között a bél lumenét jelenti (*in vitro* sejttenyészetben pedig az apikális tápfolyadékot).

A későbbi vizsgálatok fő célja a Lp 2142 SMSz-ben jelen lévő biológiailag aktív (gyulladáscsökkentő) anyagcseretermékek izolálása. Ehhez folytatni kívánjuk a fehérjeanalitikai vizsgálatokat, hogy tisztított formában kinyerhessük a kimutatott fehérjetermészetű bakteriális termékeket, és azok hatásait megállapíthassuk a gyulladásos citokinek génexpressziójára. A további összetevők elválasztását különböző kromatográfiás eljárások segítségével tervezzük végrehajtani. Ha egy vagy több, tisztított formában kinyert komponensről beigazolódik, hogy önmagában hatékonyan mérsékli a gyulladásos folyamatokat, akkor a következő feladatok a szerkezetének felderítése és molekuláris szintű hatásmechanizmusának megállapítása (jelátviteli folyamatok, redox szabályzás).

Ezen kívül tervezzük, hogy a gyulladásos folyamatban érintett további fehérjéket, prosztaglandin /leukotrién szintézisben szerepet játszó enzimeket is bevonunk a qRT-PCR-es génexpresszió vizsgálatokba, folytatjuk az transzlációs szinten történő kísérleteket szendvics ELISA módszerrel és újabb probiotikus baktériumtörzsek bélgyulladás-ellenes hatását vizsgáljuk. A későbbiekben szeretnénk *in vitro* eredményeinket *in vivo* állatkísérletekkel (rágcsáló és/vagy sertés) is alátámasztani.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az antioxidáns rendszerek alapvető szerepe, hogy ellensúlyozzák a szervezetben képződött reaktív oxigén származékok káros hatásait. Ha ez az egyensúly felbomlik, oxidatív stressz alakul ki, ami betegségek széles körével összefüggésbe hozható, mint kiváltó ok vagy hajlamosító tényező. A bélcsatornában az oxidatív stressz – közvetlen sejtkárosító hatásán túl – gyulladásokkeltő citokinek termelődését váltja ki a bélhámsejtekben és lipidperoxidációt idéz elő a membránokban. A probiotikumok terápiás értékét számos esetben igazolták a bélrendszer gyulladásos megbetegedéseiben, a fertőzések megelőzésében és kezelésében, azonban a gyulladáscsökkentő hatás hátterében meghúzódó mechanizmus részleteiben még kevésbé ismert.

Vizsgálataink arra irányultak, hogy a probiotikumok sejtmentes felülűszója hogyan befolyásolja a bélhámsejtek oxidatív stresszre adott válaszát, és képes-e megvédeni azokat a károsodásoktól. Célunk volt továbbá, hogy a bakteriális felülűszóból olyan aktív komponenseket azonosítsunk, amelyek szerepet játszhatnak a védőhatásban. A probiotikus törzsek közül előzetes eredményeink alapján a *Lactobacillus plantarum* 2142 védőhatása bizonyult legjelentősebbnek, ezért a kísérletekben ennek a törzsnek felülűszóját használtuk.

Az akut oxidatív stressz és a probiotikumok hatásának vizsgálatát kollagénnel bevont poliészter membrán inzerter tenyésztett, IPEC-J2 in vitro bélhámsejtvonalon végeztük, amely újszülött sertés jejunum eredetű, daganatosan nem transzformált enterocyttákból áll. A sejtekben az oxidatív stresszt hidrogén-peroxid oldattal váltottuk ki.

A peroxiddal kezelt IPEC-J2 sejtekben a gyulladásos citokinek (IL-8 és TNF- α) és a citoprotektív hatású 70 kDa-os hő sokkfehérje (Hsp70) relatív génexpresszióját kvantitatív real-time PCR-rel határoztuk meg a felülűszó, illetve az ebben megtalálható rövid szénláncú szerves savak (ecetsav és tejsav) hozzáadása után.

Eredményeink szerint a *Lactobacillus plantarum* 2142 sejtmentes felülűszója hatékonyan csillapította az oxidatív túlsúly okozta gyulladásos folyamatokat: hatására az IL-8 és TNF- α expressziója szignifikánsan csökkent, míg a Hsp70 génexpressziója jelentős növekedést mutatott. A probiotikum által termelt ecetsav és tejsav nem okozott szignifikáns csökkenést a gyulladásos citokinek expressziójában. Fehérjeanalitikai módszerek (SDS-poliakrilamid gél elektroforézis és kapilláris elektroforézis) segítségével sikerült eltérő molekulásúlyú fehérjék jelenlétét kimutatni a felülűszóból, melyeknek szerepe lehet a gyulladásos citokinek up-regulációjának mérséklésében és a gyulladáscsökkentő hatás kifejtésében. További kutatási munkánk célja kettős: az aktív komponensek izolálása tejsavbaktériumok felülűszójából és az oxidatív sejtkárosodások kivédésének hátterében lezajló folyamatok típusának meghatározása (jelátviteli mechanizmusok, antioxidáns hatás).

7. MELLÉKLETEK

7. táblázat: IPEC-J2 sejteken mért IL-8 és TNF- α relatív génexpresszió H₂O₂, eltérő koncentrációjú Lp 2142 felülúszó és MRS kezelések után. Átlag $\pm$ SEM, n=4

	IL-8	TNF- α
1 mM H ₂ O ₂	2,809 $\pm$ 0,591	6,105 $\pm$ 1,000
13,3% MRS	0,924 $\pm$ 0,212	2,385 $\pm$ 0,138
13,3% SMSz	0,865 $\pm$ 0,145	2,667 $\pm$ 0,873
1 mM H ₂ O ₂ + 3,3% MRS	3,692 $\pm$ 0,492	6,366 $\pm$ 0,481
1 mM H ₂ O ₂ + 3,3% SMSz	3,065 $\pm$ 1,399	5,281 $\pm$ 2,036
1 mM H ₂ O ₂ + 6,6% MRS	3,703 $\pm$ 0,954	6,963 $\pm$ 1,042
1 mM H ₂ O ₂ + 6,6% SMSz	2,904 $\pm$ 0,507	7,298 $\pm$ 2,431
1 mM H ₂ O ₂ + 13,3% MRS	1,957 $\pm$ 0,253	6,997 $\pm$ 0,419
1 mM H ₂ O ₂ + 13,3% SMSz	1,004 $\pm$ 0,237	2,824 $\pm$ 0,668

9. táblázat: IPEC-J2 sejteken mért IL-8, TNF- α , és Hsp70 relatív génexpresszió H₂O₂, Lp 2142 felülúszó és MRS kezelések után. Átlag $\pm$ SEM. n=3

	IL-8	TNF- α	Hsp70
1 mM H ₂ O ₂	2,65 $\pm$ 0,26	7,51 $\pm$ 0,43	2,64 $\pm$ 0,17
13,3% MRS	1,04 $\pm$ 0,10	2,65 $\pm$ 0,23	0,37 $\pm$ 0,02
13,3% SMSz	0,79 $\pm$ 0,05	2,30 $\pm$ 0,47	1,41 $\pm$ 0,27
1 mM H ₂ O ₂ + 13,3% MRS	2,44 $\pm$ 0,29	7,22 $\pm$ 0,68	1,49 $\pm$ 0,10
1 mM H ₂ O ₂ + 13,3% SMSz	1,51 $\pm$ 0,15	2,90 $\pm$ 0,30	7,13 $\pm$ 1,39

11. táblázat: IPEC-J2 sejteken mért IL-8 és TNF- α relatív génexpresszió H₂O₂ és ecetsav-kezelések után. n=1

	IL-8	TNF- α
1 mM H ₂ O ₂	2,95	9,58
1,3 mM ecetsav	0,71	1,57
6,7 mM ecetsav	2,55	8,18
1 mM H ₂ O ₂ + 1,3 mM ecetsav	0,9	1,76
1 mM H ₂ O ₂ + 6,7 mM ecetsav	3,61	10,3

8. táblázat: IPEC-J2 sejteken mért TER értékek H₂O₂, SMSz (Lp 2142 felülúszó), MRS kezelések előtt és után. Átlag $\pm$ SEM, n=3

	TER (Ohm*cm ²) kezelés előtt	TER (Ohm*cm ²) kezelés után
Kontroll (nincs kezelés)	9605 $\pm$ 407	9331 $\pm$ 355
1 mM H ₂ O ₂	10121 $\pm$ 236	8710 $\pm$ 904
13,3% MRS	10173 $\pm$ 121	10439 $\pm$ 229
13,3% SMSz	9709 $\pm$ 617	9642 $\pm$ 826
1 mM H ₂ O ₂ + 13,3% MRS	9591 $\pm$ 390	9089 $\pm$ 437
1 mM H ₂ O ₂ + 13,3% SMSz	9898 $\pm$ 847	9014 $\pm$ 543

10. táblázat: IPEC-J2 sejteken mért IL-8, TNF- α , és Hsp70 relatív génexpresszió H₂O₂ és tejsav-kezelések után. Átlag $\pm$ SEM. n=3

	IL-8	TNF- α	Hsp70
1 mM H ₂ O ₂	2,06 $\pm$ 0,30	3,95 $\pm$ 0,46	3,39 $\pm$ 0,57
1 mM H ₂ O ₂ + 6,7 mM D-,L-tejsav	2,35 $\pm$ 0,63	3,70 $\pm$ 0,99	2,13 $\pm$ 1,07
1 mM H ₂ O ₂ + 6,7 mM D-tejsav	1,60 $\pm$ 0,19	3,15 $\pm$ 0,13	2,16 $\pm$ 0,18
1 mM H ₂ O ₂ + 6,7 mM L-tejsav	3,15 $\pm$ 0,50	4,53 $\pm$ 1,08	2,12 $\pm$ 0,34

12. táblázat: Az IPEC-J2 sejtek médiumában mért IL-8 koncentráció oxidatív stressz esetén, 0-24h inkubáció után. Átlag $\pm$ SEM. n=7

	Apikális	Bazolaterális
0 h	0,82 $\pm$ 1,84	0,45 $\pm$ 1,21
1 h	4,26 $\pm$ 2,51	2,09 $\pm$ 1,18
4 h	28,68 $\pm$ 2,27	7,14 $\pm$ 2,00
6 h	51,24 $\pm$ 5,61	3,08 $\pm$ 4,66
24 h	101,54 $\pm$ 9,36	6,08 $\pm$ 3,81

8. SUMMARY

EFFECT OF BIOACTIVE METABOLITES OF PROBIOTICS IN PREVENTION OF GASTROINTESTINAL OXIDATIVE INJURY

An essential role of antioxidant systems is that they counteract the harmful effects of reactive oxygen species. Oxidative stress is caused by changes in this delicate balance. It is associated with a wide range of diseases as underlying cause or predisposing factor. The intestinal oxidative stress, aside from its direct cell-damaging effect, induces the production of proinflammatory cytokines in enterocytes and causes lipid peroxidation in membranes. The therapeutical value of probiotics has been proven in the prevention of several intestinal inflammatory diseases and treatment of infections, however, the main driving force responsible for this anti-inflammatory effect remains to be elucidated.

The aim of our investigations was to reveal the influence of spent culture supernatant (SCS) of probiotics on the response of enterocytes to oxidative stress, and the SCS's ability to protect them from oxidative injury. Another goal was to find out which active components of the SCS can play a role in this beneficial effect. Our preliminary data indicated that probiotic strain *Lactobacillus plantarum* 2142 has the most promising protective effect against oxidative stress-induced inflammation. Therefore, we used its SCS in our experiments.

To determine the impact of probiotics in acute oxidative stress, the experiments were performed on IPEC-J2 in vitro intestinal epithelial cell line (cultured on collagen-coated polyester membrane inserts), which contains non-transformed enterocytes isolated from the jejunum of a neonatal piglet. We used hydrogen peroxide solution to provoke oxidative stress in cells. We determined the relative gene expression of two inflammatory cytokines (IL-8 and TNF- α) and that of cytoprotective 70 kDa heat shock protein (Hsp70) in peroxide-treated IPEC-J2 cells using a quantitative real-time PCR method after addition of the SCS or its defined components (short chain fatty acids: acetic acid, and lactic acid).

According to our results, the SCS of *L. plantarum* 2142 effectively reduced oxidative stress-induced inflammation: there was a significant decrease in the expression of IL-8 and TNF- α , while the gene-expression of Hsp70 increased significantly. Acetic and lactic acid produced by the probiotic strain could not reduce the expression of inflammatory cytokines. The production of *L. plantarum* 2142-specific proteins of different molecular weights was ascertained from the SCS by two bioanalytical methods (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and capillary electrophoresis). These products may play key role in reducing the up-regulation of inflammatory cytokines and in the anti-inflammatory effect. In the future, our goals are to isolate active components present in the SCS of lactobacilli and to determine the type of processes behind protection against oxidative cell damage (signal transduction pathways and/or free radical scavenging effect).

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. HALLIWELL, B.: Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine*, 1991. 91. vol 3. no. p. S14-S22.
2. SIES, H.: What is oxidative stress? In: Keany, J. F.: Oxidative stress and vascular disease. Norwell: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 1-5.
3. SIES, H.: Oxidative Stress: an introduction. In: Sies, H.: Oxidative Stress. London: Academic Press, 1985. p. 1-8.
4. JESBERGER, J. A., RICHARDSON, J. S.: Oxygen free radicals and brain dysfunction. *International Journal of Neuroscience*, 1991. 57. vol. 1-2. no. p. 1-17.
5. GRIENDLING, K. K., FITZGERALD, G. A.: Oxidative Stress and Cardiovascular Injury Part II: Animal and Human Studies. *Circulation*, 2003. 108. vol. 17. no. p. 2034-2040.
6. ABD ELLAH, M. R.: Involvement of free radicals in animal diseases. *Comparative Clinical Pathology*, 2010. 19. vol. 6. no. p. 615-619.
7. KLAUNIG, J. E., KAMENDULIS, L. M.: The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2003. 44. vol. p. 239-267.
8. HENSLEY, K. et al.: Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000. 28. vol. 10. no. p. 1456-1462.
9. SON, D. O. et al.: Histidine inhibits oxidative stress- and TNF- α -induced interleukin-8 secretion in intestinal epithelial cells. *FEBS Letters*, 2005. 579. vol. 21. no. p. 4671-4677.
10. VINCENT, H. K., TAYLOR, A. G.: Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *International Journal of Obesity*, 2006. 30. vol. p. 400-418.
11. CORR, S. C. et al.: Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007. 104. vol. 18. no. p. 7617-7621.
12. 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.
13. 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. 298. vol. 6. no. p. G851-G859.
14. CHRISTENSEN, H. R. et al.: Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 2002. 168. vol. 1. no. p. 171-178.
15. ZALÁN Z. et al.: Production of organic acids by *Lactobacillus* strains in three different media. *European Food Research and Technology*, 2010. 230. vol. 3. no. p. 395-404.
16. DAVIES, K. J.: Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposia*, 1995. 61. vol. p. 1-31.
17. van KUJIK, F. J. et al.: A new role for phospholipase A2: Protection of membranes from lipid peroxidation damage. *Trends in Biochemical Sciences*, 1987. 12. vol. p. 31-34.
18. DAVIES, K. J.: The Broad Spectrum of Responses to Oxidants in Proliferating Cells: A New Paradigm for Oxidative Stress. *IUBMB Life*, 1999. 48. vol. 1. no. p. 41-47.
19. VALKO, M. et al.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2007. 39. vol. 1. no. p. 44-84.
20. HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C.: Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 1999.
21. MARNETT, L. J. et al.: Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*, 1999. 424. vol. 1-2. no. p. 83-95.
22. VILCEK, J., FELDMANN, M.: Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2004. 25. vol. 4. no. p. 201-209.
23. SAITO, S.: Cytokine cross-talk between mother and the embryo/placenta. *Journal of Reproductive Immunology*, 2001. 52. vol. 1-2. no. p. 15-33.
24. MAROSI A. et al.: Placentáció elevenszülő pikkelyes hüllőkben 2. rész. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2011. 133. évf. 4. sz. p. 242-250.
25. OZAKI, K., LEONARD, W. J.: Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002. 277. vol. 33. no. p. 29355-29358.
26. BENNETT, I.L. Jr., BEESON, P. B.: Studies on the pathogenesis of fever, II: characterization of fever-producing substances from polymorphonuclear leukocytes and from the fluid of sterile exudates. *The Journal of Experimental Medicine*, 1953. 98. vol. p. 493-508.
27. ISAACS, A., LINDENMANN, J.: Virus interference. 1. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences*, 1957. 147. vol. p. 258-267.
28. VILCEK, J.: The cytokines: an overview. In: Thomson, A. W., Lotze, M. T.: The Cytokine Handbook. 4th ed. Amsterdam: Academic Press, 2003. p. 3-18.
29. DINARELLO, C. A.: Proinflammatory cytokines. *Chest*, 2000. 118. vol. 2. no. p. 503-508.
30. OPAL, S. M., DEPALO, V. A.: Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, 2000. 117. vol. 4. no. p. 1162-1172.

31. DAVID, F. et al.: Cytokine and chemokine gene expression of IL-1 β stimulated equine articular chondrocytes. *Veterinary surgery*, 2007. 36. vol. 3. no. p. 221-227.
32. VLAHOPOULOS, S. et al.: Nuclear factor-kappaB-dependent induction of interleukin-8 gene expression by tumor necrosis factor alpha: evidence for an antioxidant sensitive activating pathway distinct from nuclear translocation. *Blood*, 1999. 94. vol. 6. no. p. 1878-1889.
33. TIAN, B. et al.: A TNF-induced gene expression program under oscillatory NF-kappaB control. *BMC genomics*, 2005. 28. vol. 6. no. p. 137.
34. UTGAARD, J. O. et al.: Rapid secretion of prestored interleukin 8 from Weibel-Palade bodies of microvascular endothelial cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 1998. 188. vol. 9. no. p. 1751-1756.
35. CARSWELL, E. A. et al.: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1975. 72. vol. 9. no. 3666-3670.
36. LOCKSLEY, R. M. et al.: The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 2001. 104. vol. 4. no. p. 487-501.
37. SANTORO, M. G.: Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochemical pharmacology*, 2000. 59. vol. 1. no. p. 55-63.
38. BORGES, J. C., RAMOS, C. H.: Protein folding assisted by chaperones. *Protein and peptide letters*, 2005. 12. vol. 3. no. p. 257-261.
39. ANTONOVA, G. et al.: Functional significance of hsp90 complexes with NOS and sGC in endothelial cells. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 2005. 37. vol. 1-2. no. p. 19-35.
40. DIDELOT, C. et al.: Anti-cancer therapeutic approaches based on intracellular and extracellular heat shock proteins. *Current Medicinal Chemistry*, 2007. 14. vol. 27. no. p. 2839-2847.
41. NISHIKAWA, M. et al.: Heat shock protein derivatives for delivery of antigens to antigen presenting cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008. 354. vol. 1-2. no. p. 23-27.
42. VAUGHAN, R. B.: The Romantic Rationalist: A Study Of Elie Metchnikoff. *Medical History*, 1965. 9. vol. 3. no. p. 201-215.
43. GAGGIÀ, F. et al.: Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 2010. 141. vol. p. S15-S28.
44. CASTANON, J. I.: History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds. *Poultry Science*, 2007. 86. vol. 11. no. p. 2466-2471.
45. WENK, C.: Growth promoter alternatives after the ban on antibiotics. *Pig News and Information*, 2003. 24. vol. 1. no. p. 11-16.
46. FAO/WHO: Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization) working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, 2002.
47. SALMINEN, S. et al.: Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Science and Technology*, 1999. 10. vol. p. 107-110.
48. JIMÉNEZ, M. B.: Treatment of irritable bowel syndrome with probiotics. An etiopathogenic approach at last? *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 2009. 101. vol. 8. no. p. 553-564.
49. KYRIAKIS, S. C. et al.: The effect of probiotic LSP 122 on the control of post-weaning diarrhoea syndrome of piglets. *Research in Veterinary Science*, 1999. 67. vol. 3. no. p. 223-228.
50. QUIGLEY, E. M.: Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacological research*, 2010. 61. vol. 3. no. p. 213-218.
51. ZAREIE, M. et al.: Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress. *Gut*, 2006. 55. vol. p. 1553-1560.
52. MATTAR, A. F. et al.: Effect of probiotics on enterocyte bacterial translocation in vitro. *Pediatric Surgery International*, 2001. 17. vol. 4. no. p. 265-268.
53. AIT-BELGNAOUI, A. et al.: *Lactobacillus farciminis* treatment suppresses stress induced visceral hypersensitivity: a possible action through interaction with epithelial cell cytoskeleton contraction. *Gut*, 2006. 55. vol. 8. no. p. 1090-1094.
54. SHANAHAN, F.: The host-microbe interface within the gut. *Best practice research Clinical gastroenterology*, 2002. 16. vol. 6. no. p. 915-931.
55. REID, G. et al.: Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice. *Clinical Microbiology Reviews*, 2003. 16. vol. 4. no. p. 658-672.
56. ISOLAURI, E. et al.: Probiotics: effects on immunity. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2001. 73. vol. p. 444S-450S.
57. ZALÁN Z. et al.: Influence of Growth Medium on Hydrogen Peroxide and Bacteriocin Production of *Lactobacillus* Strains. *Food Technology and Biotechnology*, 2005. 43. vol. 3. no. p. 219-225.
58. O'HARA, A. M., SHANAHAN, F.: Gut microbiota: mining for therapeutic potential. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2007. 5. vol. 3. no. p. 274-284.
59. GAREAU, M. G. et al.: Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 2010. 7. vol. p. 503-514.

60. MCCARTHY, J. et al.: Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. *Gut*, 2003. 52. vol. 7. no. p. 975-980.
61. ANADÓN, A. et al.: Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 2006. 45. vol. 1. no. p. 91-95.
62. CSIBRIKNÉ NÉMETH E.: Investigation of the efficiency and mode of action of lactic acid bacteria suitable for probiotic food production. Doktori értekezés, 2007.
63. BERSCHNEIDER, H. M. (ed.): 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. 774 p.
64. 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. 125. vol. 3. no. p. 293-305.
65. 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. 115. vol. 3-4. no. p. 299-308.
66. ARCE, C. et al.: Innate immune activation of swine intestinal epithelial cell lines (IPEC-J2 and IPI-2I) in response to LPS from Salmonella typhimurium. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2010. 33. vol. 2. no. p. 161-174.
67. JOHNSON, A. M. et al.: Disruption of transepithelial resistance by enterotoxigenic Escherichia coli. *Veterinary microbiology*, 2010. 141. vol. 1-2. no. p. 115-119.
68. LAEMMLI, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970. 227. vol. p. 680.
69. GERMAN, A. J. et al.: Chronic intestinal inflammation and intestinal disease in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2003. 17. vol. 1. no. p. 8-20.
70. MARTEAU, P. et al.: Probiotics and intestinal health effects: a clinical perspective. *British Journal of Nutrition*, 2002. 88. vol. 1. suppl. p. S51-S57.
71. MADSEN, K. L. et al.: *Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology*, 1999. 116. vol. p. 1107-1114.
72. MATSUMOTO, S. et al.: Probiotic *Lactobacillus*-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 2005. 140. vol. 3. no. p. 417-426.
73. SARTOR, R. B.: Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections. *Current Opinion in Gastroenterology*, 2005. 21. vol. 1. no. p. 44-50.
74. NÉMETH E. et al.: Influence of lactic acid bacteria and their spent culture supernatant on hydrogen peroxide-induced interleukin-8 synthesis and necrosis of Caco-2 cells. *Food and Agricultural Immunology*, 2007. 18. vol. 2. no. p. 95-105.
75. WATANABE, T. et al.: Probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota prevents indomethacin-induced small intestinal injury: involvement of lactic acid. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2009. 297. vol. 3. no. p. G506-G513.
76. WAGNER I. et al.: Electrospun biohybrid nanofibers for drug delivery. 4th European Conference on Chemistry for Life Sciences, Budapest, 2011.
77. YAN, F. et al.: Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology*, 2007. 132. vol. 2. no. p. 562-575.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni mindazoknak a segítségét, akik bármilyen módon hozzájárultak tudományos diákköri munkám sikerességéhez. Elsősorban a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék munkatársainak tartozom hálás köszönettel, akik idejüket nem kímélve mindig segítségemre voltak, hasznos tanácsokkal láttak el, és irányították munkámat.

Külön kiemelném Csizinszky Ritát, Palócz Orsolyát, dr. Szekér Krisztinát és Csibrikné dr. Németh Edinát a kutatási folyamat során nyújtott önzetlen segítségükért, továbbá dr. Farkas Orsolyát és dr. Jerzsele Ákost a dolgozat értékét növelő hasznos észrevételeikért, javaslataikért.

Köszönettel tartozom Némethné dr. Szerdahelyi Emőkének, Háderné Sólyom Katalinnak és dr. Gelencsér Évának (Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet Élelmiszer-biztonsági Főosztály Biológiai Osztály) a fehérje-analitikai vizsgálatok elvégzésében nyújtott segítségükért. Köszönöm Dr. Mézes Miklósnak és dr. Balogh Krisztiánnak (Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Állattudományi Alapok Intézet Takarmányozástani Tanszék) a lipidperoxidációs vizsgálatok terén nyújtott segítségét. Köszönettel tartozom még dr. Jakab Csabának (Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszék) az immunhisztokémiai festések kivitelezéséért.

Köszönöm családomnak, hogy munkám során biztattak, mindenben támogattak, és hasznos tanácsokkal láttak el.

Végül; a legnagyobb köszönet témavezetőimnek – dr. Pásztiné dr. Gere Erzsébetnek és Dr. Gálfi Péternek – illeti, amiért lehetővé tették tudományos diákköri munkámat és végig segítségemre voltak; nélkülözhetetlen útmutatásuk és javaslataik nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.