

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Kar
Élettani és Biokémiai Tanszék

Pleva Dániel, IV. évfolyam

***A per os* felvett butirát máj citokróm P450
enzimek aktivitására gyakorolt hatásának
vizsgálata brojlercsirkében**

Témavezető: Dr. Mátiš Gábor, PhD hallgató

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Rövidítések jegyzéke	3
Bevezetés és irodalmi áttekintés	4
<i>A gyomor-bélrendszerben előforduló illózsírsavak általános hatásai, különös tekintettel az n-butirátra</i>	<i>4</i>
<i>Az n-butirát hatásai a kromatinszerkezetre és a génexpresszióra</i>	<i>6</i>
<i>A citokróm P450 enzimcsalád</i>	<i>8</i>
Célkitűzés.....	11
Anyag és módszer	13
<i>Kísérleti állatok és kezelési protokoll</i>	<i>13</i>
<i>Mintavételezés és mikroszóma-izolálás</i>	<i>16</i>
<i>CYP-aktivitás mérése</i>	<i>18</i>
Aminopirin N-demetilációs próba.....	18
Anilin-hidroxilációs próba.....	20
<i>Statisztikai analízis.....</i>	<i>21</i>
Eredmények	22
Megbeszélés	27
Összefoglalás	29
Summary	30
Köszönetnyilvánítás	31
Irodalomjegyzék.....	32

Rövidítések jegyzéke

AME_n = nulla nitrogénretencióra korrigált látszólagos metabolizálható energia

ATP = adenzin-trifoszfát

BSA = bovine serum albumine

CYP = citokróm P450 enzimcsalád

DNS = dezoxiribonukleinsav

EDTA = etilén-diamin-tetraecetsav

g (centrifuga) = a gravitációs gyorsulás jele (9,81 m/s²)

GALT = gut associated lymphoid tissue

H = hiszton

HAT = hiszton-acetil-transzferáz

HDAC = hiszton-deacetiláz

K_M = Michaelis-Menten-konstans

MCT1 = monokarboxilát transzporter 1

mRNS = messenger ribonukleinsav

PB = phenobarbital

pH = az oxóniumionok koncentrációjának negatív tízes alapú logaritmusa vizes oldatban

n = egyedszám (mintaelemszám)

n-butirát = normál (egyenes láncú)-butirát

NADP⁺ = nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

NE = nemzetközi egység

NSP = non-starch polysaccharide, nem keményítő poliszacharid

p = tévedési valószínűség

PCR = polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció

t = próbastatisztika értéke

ttkg = testtömeg kilogramm

VFA = volatile fatty acid, illósírsav

V_{max} = maximális reakciósebesség

Bevezetés és irodalmi áttekintés

A gyomor-bélrendszerben előforduló illózsírsavak általános hatásai, különös tekintettel az n-butirátra

A szénhidrátok anaerob mikrobiális fermentációja során különféle szerves savak keletkeznek. A szerves savak nagy része rövid szénláncú zsírsav (2-4 szénatomos ecetsav, propionsav, vajsav), melyeket illékonyaságuk miatt illózsírsavaknak is neveznek.

Jelentős mennyiségű illózsírsav keletkezhet monogastrius emlősök és madarak vastagbélében, valamint a kérődzők bakteriális fermentációhoz adaptálódott előgyomraiban. Az illózsírsavak termelődését a vastagbélben fokozza, ha a takarmány rosttús, illetve gazdag NSP-ben (nem keményítő poliszacharid), mert ezen anyagokat a gazdaszervezet nem képes bontani, és így azok a mikrobiális emésztés szubsztrátjaiként használnak fel.

A keletkező illózsírsavak a vastagbél-tartalomban igen jelentős, akár 80-120 mmol/l koncentrációt is elérhetnek (Bergman, 1990; Kristensen *et al.*, 1995), egymáshoz viszonyított arányuk átlagosan ecetsav : propionsav : vajsav = 75 : 25 : 10, ezt az arányt azonban a faj, a takarmányozás, és az ennek függvényében változó bélflóra nagymértékben befolyásolja.

Az illózsírsavak legfontosabb szerepe, hogy a vastagbél- és bendőhámsejtek az energiaszükségletük nagy részét e molekulák metabolizmusa során keletkező ATP-ből fedezik. A hámsejtek által nem hasznosított hányadék a *vena portae*-n keresztül a májba juthat. Itt katabolikus vagy anabolikus (az ecetsav és vajsav keto-, a propionsav pedig glükoneogenetikus) úton felhasználódhatnak, vagy a májsejtek működését egyéb módon, például hisztionfehérjékre kifejtett epigenetikus hatásuk révén befolyásolhatják.

A három illózsírsav közül legmarkánsabb metabolikus, illetve epigenetikus hatása az n-butirátnak van (Riggs *et al.*, 1977). Az n-butirát (a továbbiakban: butirát) az egyenes láncú, négy szénatomot tartalmazó, egy karboxilcsoporttal rendelkező vajsav egyszeresen negatív töltésű anionja. Mivel a butirát biológiailag igen aktív molekula, prokarióta és eukarióta sejtekre gyakorolt hatásait számos kutatócsoport vizsgálja.

Egyik legfontosabb szerepe a szervezet számára a már fent említett energiatermelés. A colonocyták elsődleges energiaforrása a butirát (Velázquez *et al.*, 1997), amely a következőképpen hasznosul: a sejtek mitokondriumaiban butiril~koenzim-A-vá alakul, amely mint rövid láncú zsíracil~koenzim-A képes belépni a β -oxidációba, ahol két molekula acetyl~koenzim-A képződik belőle. Az acetyl~koenzim-A a citrátkörbe lépve az egymást követő reakciók során redukált

koenzimek képződését teszi lehetővé, melyek oxidációja, illetve az ezt követő hidrogén- és elektrontranszport a légzési láncban és az ehhez kapcsolódó oxidatív foszforiláció ATP szintéziséhez vezetnek, és így a sejt raktározható energiához jut.

A butirát a bélben nem csak a colonocytákra, hanem a bélflóra egyes baktériumaira is hatást gyakorol. Számos publikáció ismerteti a butirát szelektív antibakteriális hatását, melynek értelmében a butirátot az Európai Unióban 2006-ban betiltott antimikrobiális hozamfokozók helyettesítésére takarmánykiegészítőként alkalmazzák. Egyes patogén kórokozók, például az enterotoxikus *Escherichia coli* törzsek, egyes *Salmonella* és *Clostridium* fajok érzékenyen reagálnak a butirátkoncentráció emelkedésére, de közben a eubiotikus mikroflóra nem károsul (Ricke, 2003; van Immerseel *et al.*, 2005; Fernandez-Rubio *et al.*, 2008). A hatás magyarázata abban keresendő, hogy a butirát a viszonylag alacsonyabb pH-jú extracelluláris térből (a baktérium esetében a béllumenből) disszociálatlan formában, passzív transzporttal jut át a baktérium sejthártyáján. Azonban az intracelluláris, viszonylag magasabb pH-jú környezetben a molekula disszociált állapotba kerül, és ilyen formában már nem képes passzív transzporttal a koncentrációgradiensnek megfelelően kijutni a sejtől (Warnecke and Gill, 2005). Így fokozatosan csökken a pH a baktérium citoplazmájában (Russel, 1992), ami aktiválja a baktérium energiafüggő protonpumpa mechanizmusait, és kimeríti az energiaraktárakat. Ezen kívül az alacsonyabb intracelluláris pH-érték csökkenti a DNS-szintézis sebességét, és ezzel a baktériumok osztódását is lassítja (van Immerseel *et al.*, 2005; Fernández-Rubio *et al.*, 2008).

A baktériumok érzékenysége a pH csökkenéssel szemben különböző, és ezáltal a protonpumpa aktiválódása és a sejt kimerülése sem alakul ki minden baktérium esetében, mely magyarázatát adja butirát esetében az antibakteriális hatás szelektivitásának. A gastrointestinalis rendszer eubiotikus flórájának tagjai (*Lactobacillus* fajok, *Streptococcus bovis*), mivel jóval ellenállóbbak az intracelluláris pH-csökkenéssel szemben, normális életműködésüket képesek fenntartani a hozamfokozóként adagolt butirát jelenléte mellett is (Gálfi and Neogrady, 1996).

A takarmánykiegészítőként adott butirát további, hozamnövekedést okozó hatásai között említendő, hogy szükséges a GALT (gut associated lymphoid tissue = a bélcsatorna immunrendszere) megfelelő fejlődéséhez (Friedmann *et al.*, 2005), valamint gyulladáscsökkentő hatása is bizonyítást nyert (Segain *et al.*, 2000).

A gastrointestinalis hámsejtekben nem metabolizálódott butirát a *vena portae*-n keresztül a májba jut. A májsejtek a disszociálatlan molekulát passzívan, illetve a monokarboxilát-transzporter 1 (MCT1) segítségével veszik fel. A molekula a máj anyagcseréjét is befolyásolja, mivel a májsejtek szubsztrátként ugyancsak felhasználhatják a β -oxidáció folytán, de a ketogenezisben is

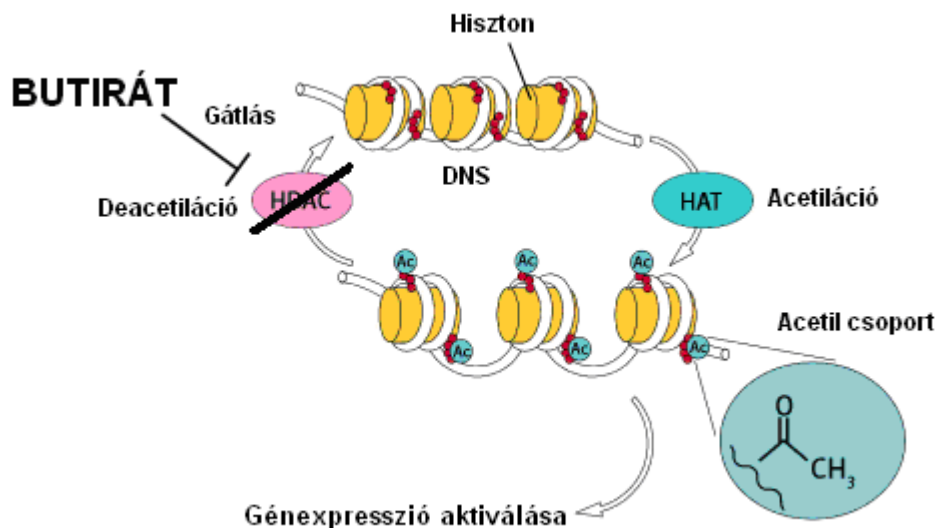
részt vehet. A metabolizmus során nem hasznosult hányada fejt ki az alább leírt epigenetikus hatást.

Az endogén úton keletkező butirátnak csak kis hányada jut át a szisztémás keringésbe (Guilloteau *et al.*, 2010). A takarmánykiegészítőként adott nagy mennyiségű, esetenként a máj metabolizáló funkcióját kimerítő butirát viszont a keringésen át a szervezet egészére is kifejtheti hatását: növelheti a sejtek inzulinérzékenységét, ezáltal befolyásolhatja a vérplazma glükóz- és zsírsav-koncentrációját is (Gao *et al.*, 2009).

Az n-butirát hatásai a kromatinszerkezetre és a génexpresszióra

A butirát aktív, epigenetikus hatású molekula, amit több kutatási eredmény is alátámaszt. A hatás kifejeződésének lényege, hogy a butirát befolyásolja a DNS metiláltsági fokát, valamint a hisztonfehérjék acetiláltsági állapotát, és ezáltal a kromatinállomány minőségét is (Doyle, 2010).

Ennek alapja a DNS és a hisztonfehérjék kapcsolata. A negatív töltésű, erősen foszforilált DNS kötődik a lizinben gazdag és éppen ezért pozitív töltésű hisztonfehérjékhez. Ebben az állapotában a kromatinszerkezet zárt, a DNS-ről transzkripció nem történik. A sejtmag egyik enzime, a hiszton-acetil-transzferáz (HAT) azonban képes a lizinek ϵ -aminocsoportjait acetilálni, ezáltal azok elvesztik pozitív töltésüket és DNS-kötő képességüket. A DNS így szabaddá, és éppen ezért az átírásra alkalmassá válik, róla mRNS íródik, és ennek megfelelően a riboszómákban fehérje szintetizálódik. Az egyensúlyt a hiszton-deacetiláz (HDAC) enzim tartja fent, amely a hisztonokról lehasítja az acetil-csoportot, és újra zárttá teszi a kromatinszerkezetet. A butirát ezt a körforgást a HDAC gátlása révén befolyásolja, ezáltal növeli az egyes DNS-szakaszok átíródásának gyakoriságát és a rajtuk kódolt fehérjék koncentrációját. A folyamat mechanizmusát az **1. ábra** szemlélteti.



1. ábra. A butirát hatása a DNS acetiláltsági fokára
(HAT: hiszton-acetil-transzferáz; HDAC: hiszton-deacetiláz)
(forrás: www.rikenresearch.riken.jp)

A butirát hiszton-hiperacetilációs hatása *in vitro* körülmények között már régóta ismert. A vizsgált gerinces állatfajokból származó sejtvonalak mindegyikénél megfigyelték a H3 és H4 hisztonfehérjék hiperacetilációját, továbbá patkány sejtenyészeten a H2A és H2B acetiláltsági fokának növekedését is (Candido *et al.*, 1978).

Igen kevés irodalmi adat áll viszont rendelkezésünkre a butirát hiszton-acetilációra gyakorolt *in vivo* hatásairól. Kien és munkatársai (2008) a hiszton-acetiláció szignifikáns fokozódását figyelték meg sertések vakbelében az állatok *per os* laktulózzal történő kezelését követően (a laktulóz vastagbélben zajló bakteriális fermentációjának végterméke jelentős részben butirát). Tanszéki kutatócsoportunk korábbi vizsgálatainak elsődleges célja volt annak feltárása, hogy a szájon át adott butirát befolyásolja-e a májsejtek hiszton-acetilációját csirkében. Az eredmények alapján a takarmány-kiegészítőként (1,5 g/takarmány-kg dózisban) adott butirát hiperacetilálja a H2A hisztont (Mátis *et al.*, 2012a), ami elegendő ahhoz, hogy a DNS-hiszton kötelék annyira fellazuljon, hogy a kromatinállomány transzkripcionálisan aktívvá váljon (Ishibashi *et al.*, 2009). A bolusban adott butirát viszont összetettebb, részben dóziszfüggő módon hat a H3 és H4 hisztonok acetilációjára is (Mátis *et al.*, 2012b).

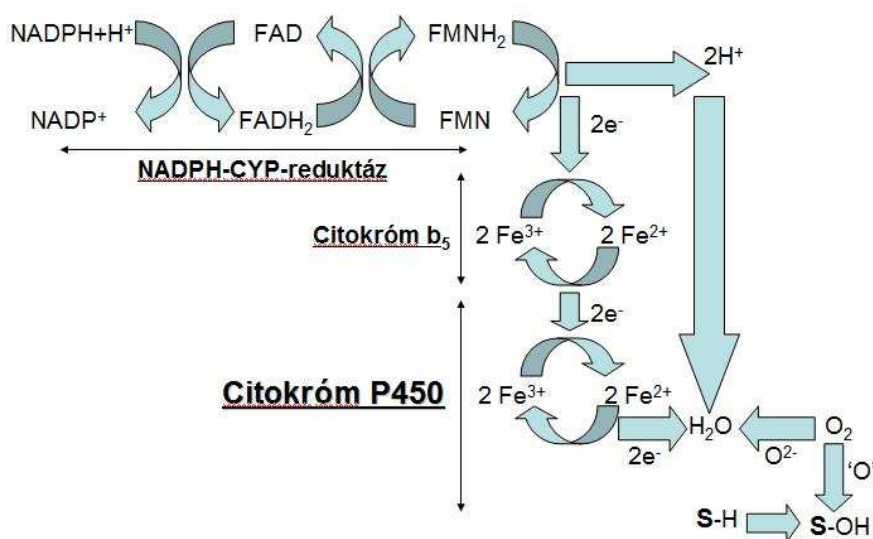
A butirát génexpresszióra gyakorolt hatásai következtében a sejtekben lezajló számos alapvető élettani folyamatot befolyásol. A bélhámsejtek esetén megfigyelték, hogy butirát hatására a tight junction fehérjék (cingulin és okkludin) szintézisének fokozódásával javult a bélfal barrier

funkciója (Bordin *et al.*, 2004). Ezen kívül számos olyan gén átírására is hatást gyakorol, amelyek befolyásolják a sejtek differenciációját, növekedését, illetve apoptózisát (Yoo *et al.*, 2006). *In vitro* a butirát gátló hatással van a sejtosztódásra (Gálfi *et al.*, 1981), ugyanakkor *in vivo* körülmények között a bélhámsejtek fokozott proliferációját okozza. Az eltérés oka feltehetőleg a sejtenyészetben használt tápfolyadék, illetve a bendő- és vastagbélfolyadék pH-ja közötti eltérése alapul (Gäbel *et al.*, 1987; Kaufman *et al.*, 1979). A butirát koncentrációfüggő, reverzibilis hatással van a sejtek növekedésére, ami meghatározza a bendőhámsejtek napi növekedési ciklusát (Gálfi and Neogrady, 2001). Ugyanakkor a HDAC enzim gátlásával irreverzibilisen képes serkenteni egyes (pl. daganatos) sejtek apoptózisát vagy differenciációját (Csordás, 1996), s így potenciális részévé válhat a daganatellenes kezeléseknek.

A citokróm P450 enzimcsalád

A citokróm P450 (CYP) enzimek a hemoproteidek közé tartoznak, fő feladatuk a xenobiotikumok detoxikációja (Albores *et al.*, 1992), az ún. első fázisú reakciók katalizálása. Emellett számos endogén szubsztrát, így például a szteroidok metabolizmusában is részt vesznek. Nevüket onnan kapták, hogy redukált formájuk képes szén-monoxiddal komplexet képezni, amely 450 nm-en mutat abszorpciós maximumot. Működésük a máj mikroszomális elektrontranszportjához kapcsolódik, aktivitásukhoz NADPH+H⁺ redukáló ágens szükséges, a redukciót a NADPH-citokróm P450 reduktáz enzim katalizálja. A CYP által katalizált hidroxilezési reakciók során a redukált CYP megköti az oxidálandó szubsztrátot, és azon molekuláris oxigén felhasználásával hidroxilcsoportot alakít ki vízképződés mellett. A CYP enzimek működését szemlélteti a **2. ábra**.

A Citokróm P450 enzimrendszer működése



2. ábra. A citokróm P450 (CYP) enzimrendszer működése (saját ábra)

Szerkezetük nem egységes, az egyes enzimek családokba (pl. CYP2) és alcsaládokba (pl. CYP2H) sorolhatók. Előfordulásuk fajoként is eltér, házityúkban a CYP2H1, CYP2H2 és CYP3A37 izoenzimek szerepe a legfontosabb.

A citokróm P450 enzimek – hasonlóan más enzimekhez – epigenetikus kontroll alatt állnak. Például lesóványodott, éhezettett házityúkban a szteroidok és a többszörösen telítetlen zsírok metabolizmusáért felelős CYP2C45 enzim expressziója nőtt (míg elhízott csirkében a lipogenezis enzimrendszerének expressziója fokozódott) (Bourneuf *et al.*, 2006).

Egyes anyagok az állat kondíciójához és a környezeti hatásokhoz hasonlóan képesek indukálni vagy éppen csökkenteni a CYP enzimek szintézisét, így például az ismert enziminduktor phenobarbital (PB) transzkripció szinten hatva serkenti a CYP-aktivitást (Paolini *et al.*, 1997; Davidson *et al.*, 2001).

Nagyon kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre a xenobiotikumok CYP enzimekre gyakorolt hatásáról csirkében. Leírták, hogy egyes fluorokinolonok (enrofloxacin, marbofloxacin) befolyásolják a CYP1A és CYP3A alcsaládok expresszióját brojlerben (Zhang *et al.*, 2011).

Bizonyított, hogy a hisztonok morfológiai változásai hatással vannak egyes CYP-et kódoló génszakaszok expressziójára (Baer-Dubrowska *et al.*, 2011). Példaként említhető, hogy a HDAC inhibitor hatású trichosztatin A változást indukált *in vitro* a CYP3A alcsalád expressziójában (Dannenberg and Edenberg, 2006).

Kvantitatív real-time PCR vizsgálattal *in vitro*, csirke primer májsejttenyészetben sikerült igazolni a butirát CYP enzimek expressziójára gyakorolt hatását (Fekete, 2009). Egyes izoenzimek esetében (CYP1A1, CYP3A37) a butirát csökkentette a génexpressziót (down-reguláció), míg másoknál (CYP2H1) indukció volt megfigyelhető (up-reguláció). Ez alapján megállapítható, hogy a butirát *in vitro* mRNS szinten befolyásolta a CYP génexpressziót.

Célkitűzés

Régóta ismeretes a takarmánykiegészítőként alkalmazott butirát pozitív hatása a bélflóra egyensúlyának fenntartásában, a colonocyták energia-háztartásában vagy a bél immunműködésének stimulálásában. Azonban keveset tudunk arról, hogy a hozamfokozóként adott butirát milyen hatást fejt ki a sejtek kromatinszerkezetére és ezáltal a génexpresszióra, egyes fehérjék szintézisére, bizonyos enzimek aktivitására.

A korábbiakban leírt *in vitro* és *in vivo* kísérletek igazolják, hogy a butirát hiszton-hiperacetilációt idéz elő a májsejtekben, és *in vitro* megváltoztatja egyes CYP gének expresszióját. Kutatómunkánk során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk, a szájon át különböző módon és adagban felvett butirát *in vivo* befolyásolja-e a máj legfontosabb mikroszomális CYP enzimeinek aktivitását csirkében. Eredményeink választ adhatnak arra a kérdésre is, hogy a takarmánykiegészítőként adott butirát befolyásolja-e a szervezetbe kerülő xenobiotikumok metabolizmusát, vagyis kialakulhat-e farmakoepigenetikus interakció a butirát és a vele egy időben alkalmazott gyógyszerek között. Ezen kérdés tisztázása közvetlen élelmiszer-biztonsági és terápiás jelentőséggel is bír, így a butirát biztonságos alkalmazhatóságának igazolásához vizsgálata elengedhetetlen.

Amellett, hogy a csirke a butirát alkalmazását illetően célállatfaj, kitűnő modellállatként is alkalmazható a takarmánykiegészítőként adott butirát epigenetikus hatásainak tanulmányozására: az azonos törzsbe tartozó madarak genetikailag homogének, CYP enzimrendszerük jól indukálható, és fiatal korban nem rendelkeznek számottevő endogén butiráttermeléssel.

Kérdéseink megválaszolása érdekében két kísérletet végeztünk.

Első kísérletünkben a butirátot 1-21 napos brojlercsirkék takarmányába kevertük, a nagyüzemi brojkertartásban is alkalmazott 1,5 g/takarmány-kg dózisban, ezzel folyamatos, tartós butirátfelvételt biztosítva.

A második kísérlet során a csirkék 19-24 napos korukban éjszakai éheztetést követően, bolusban adagolva kapták a nátrium-butirátot begyszonda segítségével. A koplaltatott csirkében a butirát felszívódása hatékonyabban zajlik, egyrészt mert nincsenek egyéb takarmánykomponensek a gastrointestinalis traktusban, amelyek gátolnák a felszívódást, másrészt az üres gyomor pH-ja jóval alacsonyabb, melynek következtében a butirát nem vagy alig disszociál, és így nagyobb arányban szívódik fel. Modellünkkel a gyorsan felszívódó és közvetlenül a májba jutó butirát rövid távú hatását kívántuk vizsgálni. E kísérletben az egyik állatcsoport a brojkertartásban elfogadott 1,5

g/takarmány-kg=0,25 g/ttkg butirát mennyiséget, a másik állatcsoport pedig ezen adag ötszörösének megfelelő (1,25 g/ttkg) butirátot kapott, hogy a butirát hatásainak dóziszfüggőségét is vizsgálni tudjuk.

Anyag és módszer

Kísérleti állatok és kezelési protokoll

Az általunk végzett állatkísérletek a hatályos hazai és európai uniós (86/609/EEC) jogszabályok betartásával, a Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság engedélyével zajlottak.

Kísérleteinkbe napos, kevert ivarú, Ross 308 törzsbe tartozó, a Bábolna Tetra Kft. uraiújfalusi neveldejéből származó brojlercsirkéket vontunk be, az állatokat Karunk Élettani és Biokémiai Tanszékének állatházában helyeztük el. A vegyes ivarú csirkéket ötös csoportokban tartottuk friss faforgács almon, 1,5 m² alapterületű fémketrecekben. A fényprogram megfelelt az állatok igényeinek: a betelepítéstől számított 7. napig napi 23 óra, a 8.-tól a 14. napig napi 18 óra, ezt követően a kísérlet befejezéséig napi 16 óra megvilágítást kaptak. A hőmérséklet beállítása is megfelelt a fejlődő csibék szükségleteinek: az első napokban megszabott 30-33°C-ról fokozatosan 25-26°C-ra csökkentettük. A relatív páratartalom a nevelés teljes ideje alatt 35 és 45% között mozgott.

1. kísérlet:

Az állatok takarmányozása, illetve kezelése három, véletlenszerűen kialakított csoportra osztva történt:

- Tíz állat kontroll, butirátmentes indító tápot kapott. A kontroll brojlerkép összetételét mutatja be az **1. táblázat**.
- Tíz állat takarmányát nátrium-butiráttal egészítettük ki, 1,5 g/takarmány-kg dózisban. (A butirát takarmányba keverésének pontossága gázkromatográfiás méréssel került ellenőrzésre.)
- A harmadik csoport tíz állata a kontroll indító táp etetése mellett a kísérlet utolsó három napján (19., 20., 21. napok) intracoelomalis PB injekcióban részesült (Phenobarbital sodium, Ph. Eur. 7.1, steril, pirogén- és endotoxin-mentes fiziológiás konyhasóoldatban oldva, napi egyszeri 80 mg/ttkg dózisban alkalmazva).

1. táblázat. A brojlersirkék takarmányának összetétele és beltartalmi paraméterei

Összetevők, g/kg	
Kukorica	593,7
Szója	310,0
Kukoricaglutén	50,0
Takarmánymész	15,0
Kalcium-foszfát	18,5
NaCl	4,0
Vitamin-ásványi anyag keverék ¹	6,0
L-lizin-HCl	1,8
DL-metionin	1,0
Beltartalmi paraméterek	
Nyersfehérje, g/kg	212,2
Nyerszsír, g/kg	29,4
Nyersrost, g/kg	25,3
Nyershamu, g/kg	65,9
AME _n , MJ/kg	11,9
Lizin, g/kg	11,9
Metionin, g/kg	4,9
Metionin + Cisztein, g/kg	8,6
Kalcium, g/kg	11,6
Foszfát, elérhető, g/kg	4,5

¹Ásványianyag- és vitamintartalom (takarmány-kg-ra számolva): Se: 0,24 mg; Fe: 135 mg; Mn: 136 mg; Cu: 22 mg; Zn: 110 mg; I: 1,2 mg; retinil-acetát: 4,14 mg; kolekalciferol: 0,075 mg; α-tokoferol: 26,85 mg; kolin-klorid: 360 mg; menadion: 3,0 mg; riboflavin: 7,0 mg; kobalamin: 0,03 mg; niacin: 40 mg; pantoténsav: 12 mg; folsav: 1,0 mg; piridoxin: 5,0 mg.

Ivóvíz és takarmány a kísérlet során *ad libitum* az állatok rendelkezésére állt. A takarmányok keverése és beltartalmi paramétereinek megállapítása a herceghalmi Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézetben történt. A táp nem tartalmazott coccidiostaticumot, mivel azok befolyásolhatták volna a máj CYP-aktivitását.

2. kísérlet:

A kísérlet során 36 darab* brojlercsirkét használtunk fel. A betelepítéstől számított 19. napig ebben az esetben is *ad libitum* rendelkezésükre állt az **1. táblázatban** bemutatott, az előző kísérletben alkalmazottal azonos összetételű és beltartalmú takarmány, valamint az ivóvíz.

Az állatok a kísérlet 20-24. napján azonban négy, véletlenszerűen kialakított csoportra osztva, naponta egyszer az alábbiakban leírt kezeléseket kapták. A kezeléseket megelőzően a csirkéket 12 órán keresztül, illetve a bolus beadása után 2 órán át éhezttettük. Az éheztetési periódusokat leszámítva az állatok az **1. táblázatban** leírt takarmányt a kísérlet végéig (a 24. napig), illetve az ivóvizet a kísérlet során végig *ad libitum* kapták.

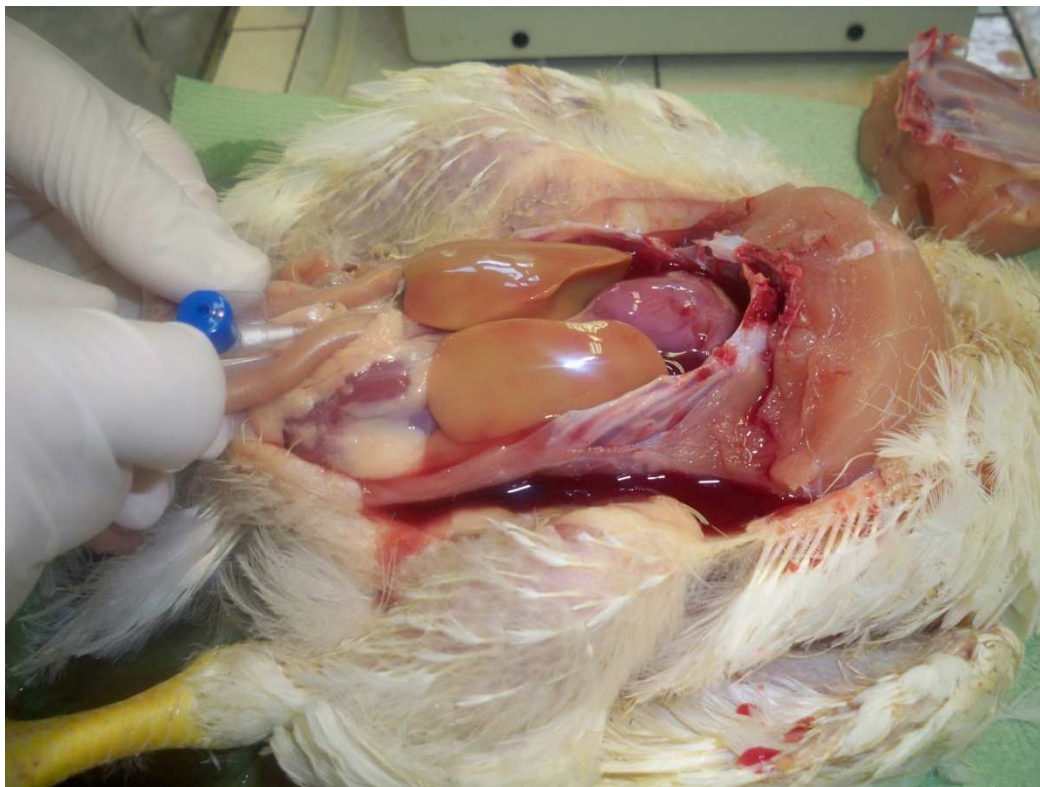
- 1. csoport (10 db): Az állatok begyszondán keresztül nátrium-butirátot kaptak 0,25 g/ttkg (alap) dózisban. Ez a butirátmennyiség méréseink alapján megközelítőleg megfelelt annak, amennyit az 1. (etetési) kísérletben az állatok takarmánykiegészítőként naponta felvettek.
- 2. csoport (9 db): Butirátkelés begyszondán keresztül emelt dózisban (1,25 g/ttkg).
- 3. (kontroll) csoport (9 db): Desztillált víz beadása szondán keresztül.
- 4. (pozitív kontroll) csoport (6 db): PB beadása intracoelomalisán 80 mg/ttkg dózisban.

* technikai okok miatt 2 állat kizárásra került: a 2. és a 3. csoport létszáma 1-1 egyeddel csökkent

Mintavételezés és mikroszóma-izolálás

A kísérlet utolsó napján mindkét esetben az állatok leölésére és a májból történő mintavételezésekre került sor. Az 1. (etetési) kísérletben részt vett csirkéknél 12 órával a vágást megelőzően megvontuk az állatok takarmányát, a 2. kísérlet során pedig két órával az utolsó kezelést követően végeztük el az állatok levágását.

A csirkéket szén-dioxidos narkózisban dekapitáltuk, majd a testüreg felnyitását követően bekanuláltuk a *vena portae*-t, és jégbe hűtött fiziológiás sóoldattal perfundáltuk a májat (30 ml/perc sebességgel). A máj vértelenítését követően (**3. ábra**) kivettük azt a testüregből, folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd további feldolgozásig -80°C-on tároltuk.



3. ábra. A máj vértelenítése

A mikroszóma frakció (mikroszomális CYP enzimek) izolálása több lépcsős differenciáló centrifugálással, van der Hoeven és Coon (1974) módszere szerint történt. A mintákat először jégben hűtve homogenizáltuk a máj tömegével arányos mennyiségű pufferrel, amely 1,15 m/m% kálium-kloridot és 0,1 mol/liter EDTA-t tartalmazott. Az így kapott homogenizátumot 4°C-on 2000 g gyorsulással 10 percre centrifugáltuk.

A felülúszót először 4°C-on és 10000 g-n 25 percig, majd ismét a felülúszót 100000 g-n 75 percig centrifugáltuk. A pelletet ezután ultrahangos homogenizátorral reszuspendáltuk, majd megismételtük az utolsó centrifugálást. Végül az üledéket 0,05 mólos, 20% glicerint tartalmazó foszfátpufferben vettük fel, és 10 másodperces szonikációt követően folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd -80°C-on tároltuk.

A mikroszomális enzimaktivitás standardizálásához szükség volt a mikroszomális összfehérje-koncentráció meghatározására, amelyet Folin-reakcióval végeztünk el.

A Folin-reakció során a fehérjék tirozin és triptofán aminosavai lépnek kölcsönhatásba a reagensekkel. A keletkező kék színű vegyületek (molibdénkék, wolframkék) fotometrálassal detektálhatóak, és mennyiségük arányos az oldat tirozin- és triptofántartalmának összegével.

A reakcióhoz kétféle komponens szükséges. Az első egy komplexképző reagens („Folin I”), amely 2 m/m%-os nátrium-karbonát oldatot, 1 m/m%-os kristályvizes réz-szulfát oldatot és 2 m/m%-os kálium-nátrium-tartarát oldatot tartalmaz 100:1:1 arányban. A második reagens („Folin II”) egy foszfor-wolframsavat, foszfor-molibdénsavat, lítium-szulfátot és sósavat tartalmazó gyári oldat, amelyet a felhasználás előtt desztillált vízzel háromszorosára hígítottunk.

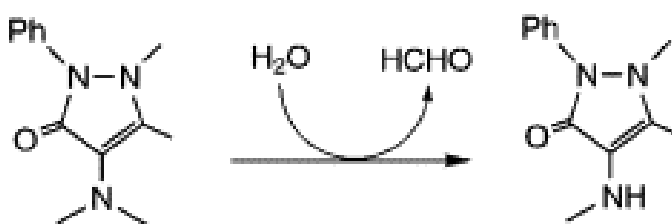
A kísérlet során mindegyik mintából három párhuzamos mérést végeztünk. Első lépésként minden csőbe 0,2 ml 50x hígítású, előzőleg vortexszel homogenizált mikroszómá-izolátumot pipettáztunk. Erre 1-1 ml Folin I reagenst mértünk, majd 10 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. Ezt követően minden mintához 0,1 ml Folin II reagenst adtunk, vortexeltük, és 30 percig inkubáltuk ugyancsak szobahőmérsékleten. Az így keletkezett kék oldatot 750 nm-es hullámhosszon fotometráltuk. A mérések során standardként bovine serum albumine (BSA) szolgált.

CYP-aktivitás mérése

Aminopirin N-demetilációs próba:

A mikroszomális CYP2H/3A enzimek aktivitása aminopirin N-demetilációs próbával került meghatározásra. Az enzimkinetikai vizsgálat a García-Agúndez és munkatársai (1990) által leírt protokoll módosítása szerint zajlott.

Az aminopirin (dimetil-aminoantipirin) ugyanis víz jelenlétében CYP2H, illetve CYP3A alcsaládba tartozó enzimek hatására formaldehid keletkezése közben egy metilcsoportját elvesztve monometil-aminoantipirinné alakul át (**4. ábra**).



4. ábra. Az aminopirin átalakulása 4-monometil-aminoantipirinné
(forrás: Tafazoli and O'Brien, 2005)

A CYP enzimek működése NADPH+H⁺-t igényel, amely a reakció során NADP⁺-vé oxidálódik. A NADP⁺ visszaredukálásához magnéziumra, glükóz-6-foszfát-dehidrogenázra és szubsztrátjára, glükóz-6-foszfátra van szükség. A reakció egyenlete:

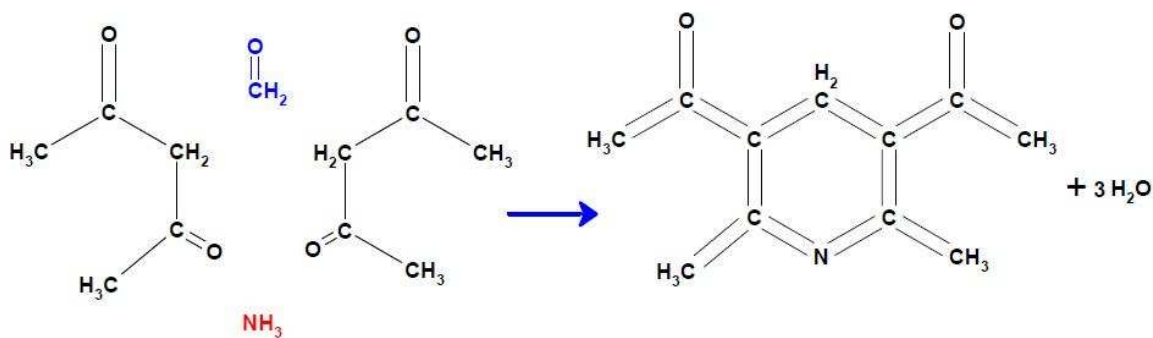


Emiatt a reakcióelegy tartalmazott egy NADPH+H⁺-regeneráló kofaktor mixet, amely 0,5 mmol/l NADPH+H⁺-ból, 50 mmol/l glükóz-6-foszfátból, 4 NE/l glükóz-6-foszfát dehidrogenázból, 5 mmol/l MgCl₂-ből és 50 mmol/l szemikarbazidból állt.

10 percig 37°C-on inkubáltunk 100 µl mikroszóma szuszpenziót 200 µl kofaktor mixszel és 900 µl 0,05 mol/l foszfátpufferrel (pH 7,4), különböző koncentrációjú (0; 1,25; 2,5; 5; 10 mmol/l) dimetilamino-antipirin (aminopirin szubsztrát) oldatok jelenlétében. A reakciót 200 µl 40%-os töménységű triklórecetsavval állítottuk le.

A reakció végtermékei közül legegyszerűbben a formaldehid mennyiségét tudtuk meghatározni, Nash (1953) módszerével. A reakció lényege, hogy a egy formaldehid molekula két acetilaceton és egy ammónia molekulával 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidin

molekulává egyesül (5. ábra), amely kiterjedt konjugált kettőskötésrendszerrel bír, ezért sárga színű, így fotometrálnak.



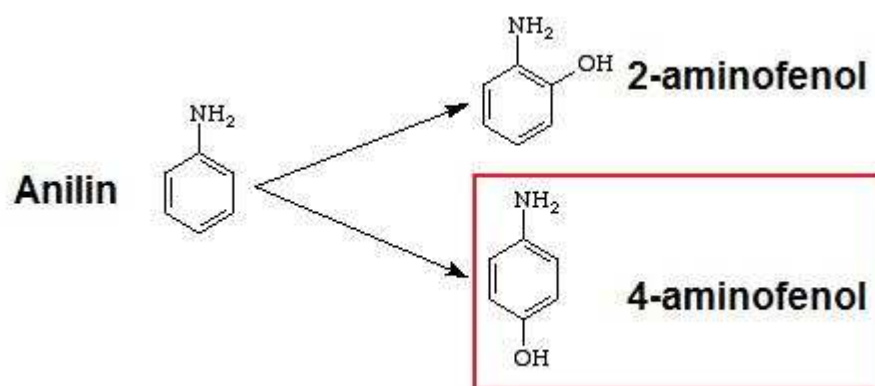
5. ábra. A Nash-reakció (forrás: <http://www.biokemia-old.sote.hu>)

A triklórecetsav hozzáadását követően az elegyet 4500 g-n centrifugáltuk 5 percig, majd 800 µl felülúszót adagoltunk 400 µl Nash-reagenshez (0,16 ml acetilacetone és 0,24 ml koncentrált ecetsav feloldva 20 ml 4 mol/l töménységű ammónium-acetát oldatban). Az így kapott elegyet 30 percig 60°C-on inkubáltuk, majd jégen lehűtöttük és spektrofotométerrel mértük a kialakult sárga szín abszorbanciáját 415 nm-es hullámhosszon. Minden állatnál, minden szubsztrátkoncentráció esetén három párhuzamos mérést végeztünk, amelyek abszorbanciájának átlagából levontuk egy előzőleg triklórecetsavval gátolt vak abszorbanciáját. A keletkezett formaldehid koncentrációját standard sor segítségével határoztuk meg. Végül meghatároztuk a specifikus enzimaktivitást (átlagos reakciósebességet), kiszámoltuk a K_M (Michaelis-Menten-konstans) és V_{max} (maximális reakciósebesség) értékeket, és összehasonlítottunk ezeket a kezelési csoportok között. Minden eredményt a mikroszómaminták összfehérje-koncentrációjára korrigálva adtuk meg.

Anilin-hidroxilációs próba:

Az anilin-hidroxilációs próbával a májsejtek CYP2H aktivitását határoztuk meg. A kísérlet a Murray és Ryan (1982) által módosított protokoll szerint zajlott.

A CYP2H alcsaládba tartozó enzimek hatására az anilin 4-aminofenollá alakul (6. ábra), a 4-aminofenol mennyisége spektrofotométer segítségével meghatározható.



6. ábra. Az anilin hidroxilációja: a CYP2H enzimek hatására 4-aminofenol keletkezik.

(forrás: <http://users.humboldt.edu>)

Mivel a CYP enzimek aktiválásához ebben az esetben is $\text{NADPH}+\text{H}^+$ szükséges, a reakcióelegy az aminopirin N-demetilációs kísérlethez hasonlóan ugyanolyan mennyiségű, azonos összetételű $\text{NADPH}+\text{H}^+$ -regeneráló kofaktor mixet tartalmazott.

100 μl mikroszóma szuszpenziót inkubáltunk 15 percig 37°C -on 200 μl kofaktor mixszel és 900 μl , 0,05 mol/l koncentrációjú, 7,4 pH-jú foszfátpufferrel, amely különböző koncentrációban (0; 1,25; 2,5; 5; 10 mmol/liter) tartalmazott anilin-hidrokloridot. A reakciót 200 μl , 20%-os triklórecetsav oldattal állítottuk le. Az elegyet 4500 g-n, 4°C -on 10 percig centrifugáltuk, majd 400 μl felülúszóhoz adagoltunk 400 μl 10%-os Na_2CO_3 oldatot és ugyanennyi lúgos fenololdatot (0,8%-os fenol 0,2 mol/l NaOH-ban oldva). Az elegyet 30 percig 37°C -on inkubáltuk, majd jégen lehűtöttük. A keletkezett kék színű oldatok abszorbanciáját spektrofotométerrel határoztuk meg 605 nm hullámhosszon. Minden állatnál, minden szubsztrátkoncentráció esetén három párhuzamos mérést végeztünk, amelyek abszorbanciájának átlagából levontuk egy előzőleg triklórecetsavval gátolt vak abszorbanciáját. A keletkezett 4-aminofenol koncentrációját standard sor segítségével határoztuk meg. Végül meghatároztuk a specifikus enzimaktivitást, kiszámoltuk a K_M és $V_{\max}$ értékeket, az előző kísérlethez hasonlóan. Minden eredményt a mikroszómaminták összfehérje-koncentrációjára standardizálva adtunk meg.

Statisztikai analízis

Az eredmények kiértékeléséhez az R program 2.11.1-es verzióját használtuk. Az eredményeket átlag $\pm$ standard hiba formában adtuk meg.

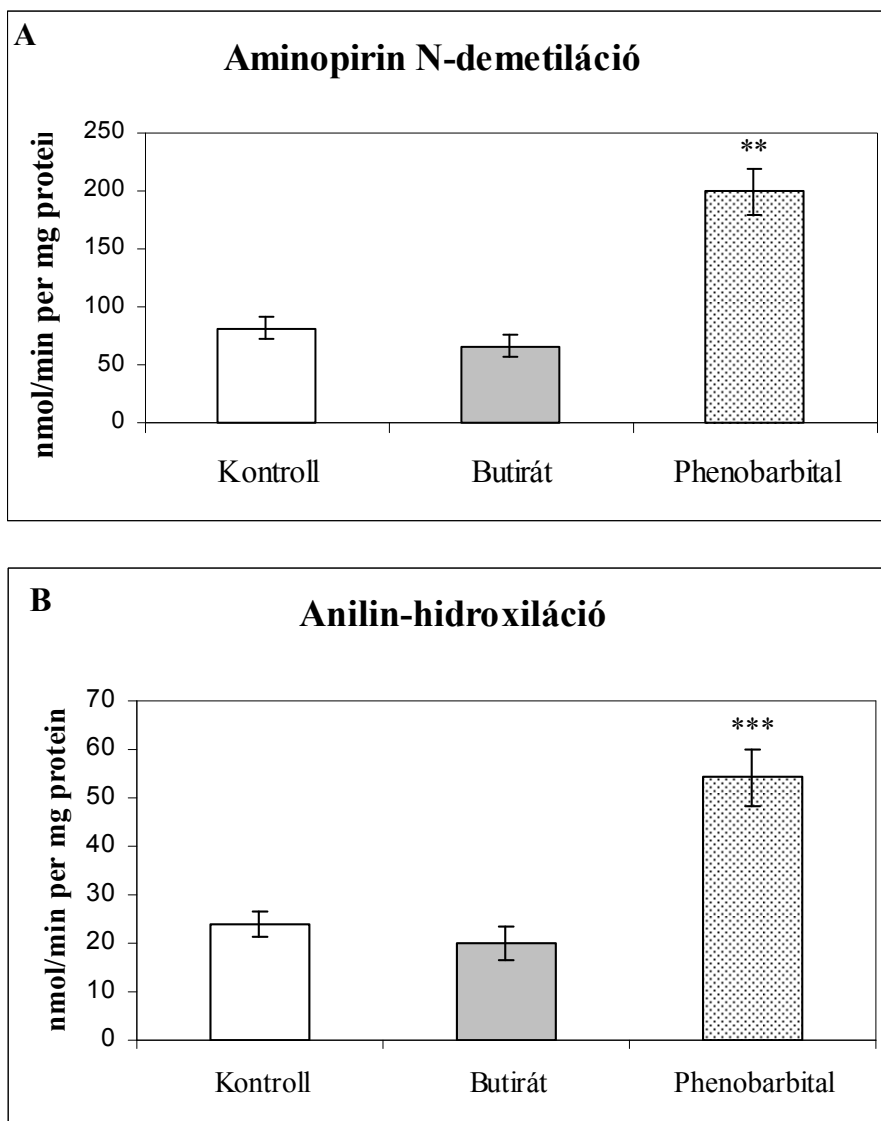
Az adatok eloszlását hisztogram segítségével vizsgáltuk, majd egyutas ANOVA-val értékeltük őket. A kontroll csoporttól való eltérést szignifikánsnak értelmeztük, ha $p < 0,05$, illetve nem szignifikáns trendnek $p < 0,1$ érték esetén.

Eredmények

1. kísérlet:

Az aminopirin-N-demetilációs tesztek során az erre specifikus CYP2H/CYP3A alcsaládok átlagos demetilációs aktivitásának vizsgálata során nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a kontroll és a butirátos takarmánnyal etetett csoportok között ($t=-0,868$; $p=0,396$), ahogyan a $V_{\max}$ ($t=0,576$; $p=0,571$) és a K_M ($t=1,136$; $p=0,269$) értékeik esetében sem. A PB kezelés azonban hiteles pozitív kontrollnak bizonyult, az értékek a várt eredményeket tükrözték, szignifikánsan emelkedtek az átlagos aktivitás ($t=5,552$; $p<0,001$), a $V_{\max}$ ($t=4,323$; $p<0,001$) és csökkentek a K_M ($t=3,612$; $p=0,002$) értékek (**7.A ábra és 2. táblázat**).

Az anilin-hidroxilációs kísérlet is hasonló eredményeket hozott a CYP2H alcsalád esetén: a kontrollhoz képest nem volt szignifikáns különbség az átlagos enzimaktivitás ($t=-0,662$; $p=0,515$), sem a $V_{\max}$ ($t=-0,828$; $p=0,417$) vagy a K_M ($t=-0,834$; $p=0,413$) esetén. A PB kezelés azonban ez esetben is szignifikánsan növelte az átlagos enzimaktivitást ($t=5,002$; $p<0,001$) és a $V_{\max}$ -ot ($t=2,404$; $p=0,025$), a K_M értékek pedig csökkenő tendenciát mutattak ($t=-1,906$; $p=0,070$) (**7.B ábra és 2. táblázat**).



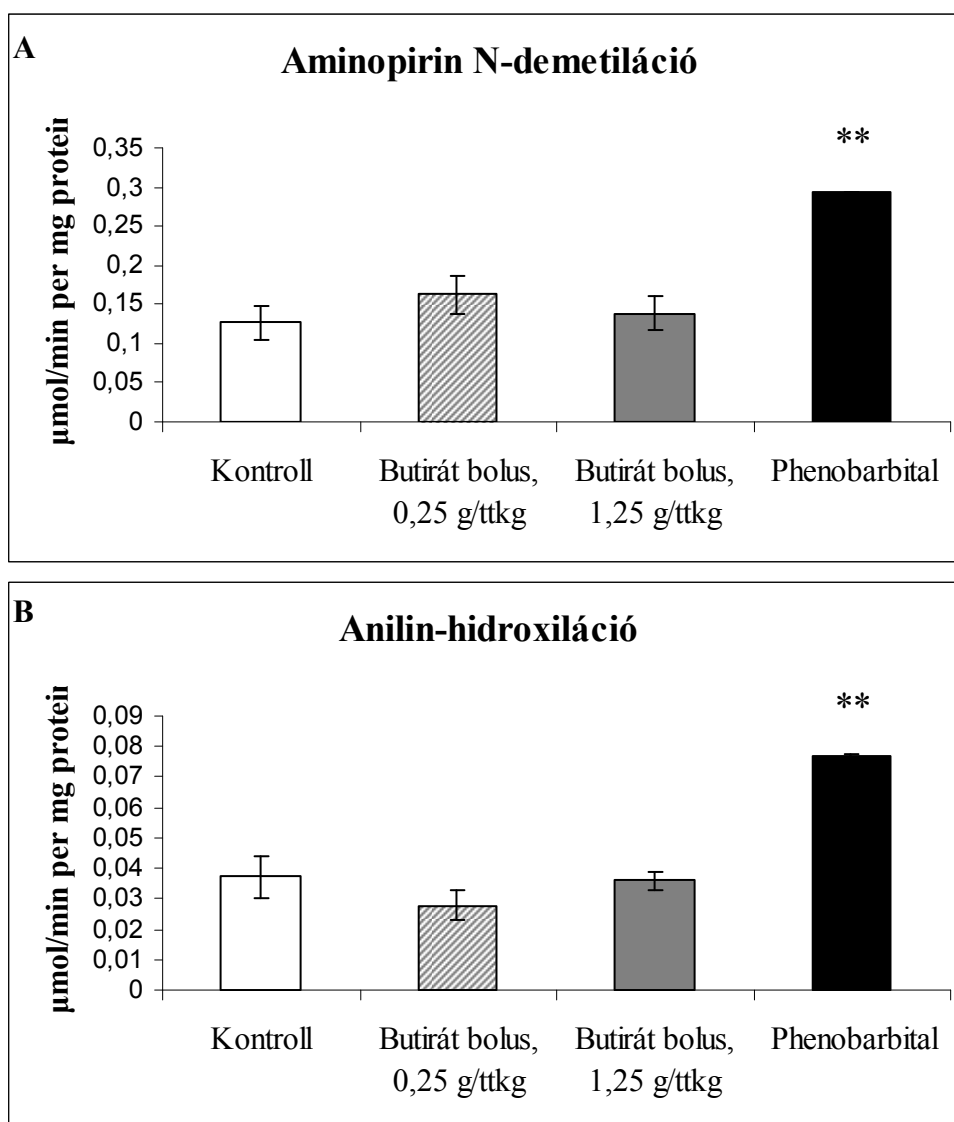
7. ábra. A. Az aminopirin-N-demetilációs próba során átlagosan keletkezett formaldehid mennyisége (nmol/perc/mg mikroszomális fehérje), amely megmutatja a máj mikroszomális CYP2H/CYP3A alcsaládok izoenzimeinek átlagos specifikus aktivitását. **B.** Az anilin-hidroxilációs próba során keletkezett 4-aminofenol mennyisége (nmol/perc/mg mikroszomális fehérje), megmutatja a CYP2H izoenzimek átlagos specifikus aktivitását. Az egyes oszlopok a kontroll vagy butirátot tartalmazó (1,5 g/takarmány-kg) takarmánnyal etetett, illetve phenobarbitalos kezelésben részesült brojlercsirkék adatait mutatják. Az adatok a kapott eredmények átlagai $\pm$ standard hiba alakban szerepelnek, a csoportok létszáma $n=10$ egyed volt. **Szigorú különbség ($p<0,01$), ***Szigorú különbség ($p<0,001$)

2. kísérlet:

Az aminopirin-N-demetilációs próba elvégzése után egyik butirátos bolussal kezelt csoportban sem találtunk szignifikáns eltérést a fent említett enzimkinetikai paraméterek értékeinek nagy részénél a kontrollcsoportéhoz képest a CYP2H és CYP3A enzimek esetében (átlagos enzimaktivitás: alap dózis $t=1,331$; $p=0,196$; emelt dózis $t=0,638$; $p=0,523$; $V_{\max}$: alap dózis $t=0,923$; $p=0,368$; emelt dózis $t=0,113$; $p=0,911$; K_M alap dózis $t=0,374$; $p=0,713$). A K_M értéke az emelt dózis esetén azonban csökkenő tendenciát mutatott ($t=-1,758$; $p=0,095$). Az előzőekhez hasonlóan pozitív kontrollként alkalmazott PB szignifikáns növekedést okozott az átlagos enzimaktivitás ($t=3,303$; $p=0,003$) és a $V_{\max}$ ($t=2,917$; $p=0,009$) értékénél is, ugyanakkor a K_M értékét nem csökkentette ($t=-0,156$; $p=0,878$) **(8.A ábra és 3. táblázat)**.

Ezen eredményekhez hasonlóan az anilin-hidroxilációs kísérlet során sem figyelhettük meg a butirátos bolusok módosító hatását a CYP2H alosaládra. Nem volt szignifikáns különbség sem az átlagos enzimaktivitás (alap dózis $t=-1,293$; $p=0,211$, emelt dózis $t=-0,194$; $p=0,848$), sem a $V_{\max}$ (alap dózis $t=0,391$; $p=0,700$, emelt dózis $t=0,475$; $p=0,640$), sem a K_M (alap dózis $t=0,948$; $p=0,354$, emelt dózis $t=0,620$; $p=0,542$) eredményeiben. A PB ebben az esetben is szignifikánsan növelte az átlagos reakciósebességet ($t=3,657$; $p=0,002$), de nem hatott a $V_{\max}$ ($t=1,143$; $p=0,267$) és a K_M ($t=-0,310$; $p=0,760$) értékére sem **(8.B ábra és 3. táblázat)**.

Összegezve tehát megállapíthatjuk, hogy a takarmányba kevert butirát nem volt hatással a májban általunk vizsgált mikroszomális CYP enzimek aktivitásának paramétereire, azonban az ismert CYP enziminduktor (PB) minden esetben az enzimaktivitás várt emelkedését okozta.



8. ábra. A. Az aminopirin-N-demetilációs próba során átlagosan keletkezett formaldehid mennyisége ($\mu\text{mol/perc/mg}$ mikroszomális fehérje), amely megmutatja a máj mikroszomális CYP2H/CYP3A alcsaládokba tartozó izoenzimeinek átlagos specifikus aktivitását. **B.** Az anilin-hidroxilációs próba során keletkezett 4-aminofenol mennyisége ($\mu\text{mol/perc/mg}$ mikroszomális fehérje), megmutatja a CYP2H izoenzimek átlagos specifikus aktivitását. A kísérletben felhasznált csirkék egyik csoportja ($n=10$) alap dózissal, $0,25 \text{ g/ttkg}$, másik csoportja ($n=9$) emelt dózissal, $1,25 \text{ g/ttkg}$ butirátot tartalmazó *per os* boluskezelésben részesült, harmadik csoportjukat ($n=6$) intacoelomális phenobarbital injekcióval kezeltük (80 mg/ttkg). Az ezen állatok máj mikroszoma frakcióját felhasználva kapott enzimaktivitási értékeket vetettük össze a negyedik, kontroll csoportéval ($n=9$). Az eredményeket átlag $\pm$ standard hiba alakban tüntettük fel. **Szignifikáns különbség ($p<0,01$)

2. táblázat. A takarmánykiegészítőként alkalmazott butirát hatásai a citokróm P450 enzimekre brojlercsirkében¹

Enzim-működés	Felelős CYP	Kinetikai paraméter	Kontroll csoport	Butiráttal kezelt csoport ²	Phenobarbitallal kezelt csoport ³
Aminopirin-N-demetiláció	CYP2H/3A	$V_{\max}$ ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$)	$0,116 \pm 0,018$	$0,144 \pm 0,049$	$0,380 \pm 0,057^{**}$
		K_M (mM)	$0,574 \pm 0,184$	$0,869 \pm 0,210$	$1,734 \pm 0,117^*$
Anilin-hidroxiláció	CYP2H	$V_{\max}$ ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$)	$0,090 \pm 0,013$	$0,072 \pm 0,016$	$0,144 \pm 0,016^*$
		K_M (mM)	$8,282 \pm 2,246$	$6,531 \pm 1,288$	$4,165 \pm 0,391^{\sim}$

¹Az eredmények a csoportok átlagértékei $\pm$ standard hiba; a csoportok egyedszáma n=10.

²1,5g/takarmány-kg nátrium-butiráttal kezelve

³A 19-21. napokon napi egyszer intracoelomalisán 80 mg/ttkg phenobarbitallal kezelve

*Szigifikáns különbség ($p<0,05$), **Szigifikáns különbség ($p<0,01$), $\sim$ Szigifikáns közeli trend ($p<0,1$)

3. táblázat. A bolusban adott butirát hatásai a citokróm P450 enzimekre brojlercsirkében¹

Enzim-működés	Felelős CYP	Kinetikai paraméter	Kontroll csoport	Butiráttal kezelt csoport 0,25 g/ttkg ²	Butiráttal kezelt csoport 1,25 g/ttkg ²	Phenobarbitallal kezelt csoport ³
Aminopirin-N-demetiláció	CYP2H/3A	$V_{\max}$ ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$)	$0,224 \pm 0,064$	$0,210 \pm 0,035$	$0,166 \pm 0,031$	$0,381 \pm 0,014^{**}$
		K_M (mM)	$1,071 \pm 0,238$	$1,203 \pm 0,329$	$0,567 \pm 0,147$	$1,023 \pm 0,138$
Anilin-hidroxiláció	CYP2H	$V_{\max}$ ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$)	$0,111 \pm 0,021$	$0,151 \pm 0,042$	$0,131 \pm 0,025$	$0,185 \pm 0,014$
		K_M (mM)	$5,272 \pm 0,479$	$12,247 \pm 4,363$	$7,856 \pm 2,550$	$3,270 \pm 0,447$

¹Az eredmények a csoportok átlagértékei $\pm$ standard hiba (létszámok: kontroll: n=9; alap dózisú butiráttal kezelt: n=9; phenobarbitallal kezelt: n=6)

²A bolusokkal *per os* alap dózisú, 0,25 g/ttkg; illetve emelt dózisú, 1,25 g/ttkg nátrium-butirátot kaptak naponta

³A 20.-24. napokon napi egyszer intracoelomalisán 80 mg/ttkg phenobarbitallal kezelve

**Szigifikáns különbség ($p<0,01$)

Megbeszélés

A kromatinállományban bekövetkező szerkezeti változások befolyásolhatják különböző gének expresszióját, így módosíthatják különböző CYP gének expresszióját is. Így a hiszton-acetiláció jelentős mértékben módosítja a CYP2 család számos tagjának expresszióját (Baer-Dubowska *et al.*, 2011). Tanszéki kutatócsoportunk korábbi eredményei alapján, mely szerint a takarmányba kevert butirát fokozta a májsejtek H2A hisztonfehérjéjének acetilációját, feltételeztük, hogy a takarmánykiegészítőként adott butirát hatással lehet a hepatikus mikroszomális CYP enzimek aktivitására.

Várakozásainkkal ellentétben azonban az etetés során felvett butirát nem változtatta meg szignifikánsan az általunk vizsgált, brojlercsirkében legjelentősebb CYP alcsaládok (CYP2H, CYP3A) aktivitását, sem pedig kinetikai paramétereit. Ez nem zárja ki az esetleges mRNS-szintű változások lehetőségét, az *in vitro* irodalmi adatokhoz hasonlóan (Fekete, 2009). Ennek tisztázására további PCR-vizsgálatok szükségesek.

Nagyon kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre a xenobiotikumok CYP enzimekre gyakorolt hatásáról csirkében. Például a fluorokinolonok csoportjába tartozó marbofloxacin a CYP1A alcsalád, míg az enrofloxacin a CYP1A és a CYP3A alcsaládok expresszióját csökkentette brojlerben (Zhang *et al.*, 2011).

A PB génexpressziós szinten hatva bizonyítottan fokozza a CYP enzimek aktivitását (Paolini *et al.*, 1997; Davidson *et al.*, 2001), ezért modellünk helyességének igazolására pozitív kontrollként PB-t alkalmaztunk a csirkék kezelésére. Az irodalmi adatokkal összhangban a PB saját kísérletünkben is indukálta a CYP2H és a CYP3A alcsaládokba tartozó izoenzimeket.

Második kísérletünkben a butirátot 12 órás éheztetés után, begyszondán keresztül, bolusban adtuk be az állatoknak. Így a felszívódás mértéke jelentősen nőtt, hiszen az üres gyomor pH-jának alacsony szintje és a takarmányrészek abszorpciót lassító hatásának kiesése mind a butirát felszívódását segítették elő. Ezen kísérlet során kétféle dózist alkalmaztunk: egy alap (0,25 g/ttkg) és egy emelt (1,25 g/ttkg) nátrium-butirát koncentrációt. Az alap dózissal beadott mennyiség megközelítőleg megfelelt az etetési kísérletben naponta felvett butirátmennyiségnek, míg az emelt dózis alkalmazásával egy extrém magas koncentráció hatásaira voltunk kíváncsiak.

A tanszéki kutatócsoport korábbi kísérletei során azt tapasztalta, hogy a bolusban alkalmazott butirát dózistól függetlenül hiperacetilálta a H2A hisztont, míg dózistól függően a H3 és a H4 hisztonokat.

Eredményeink szerint a butirát ilyen applikációban sem befolyásolta a vizsgált CYP-enzimek aktivitását, viszont PB kezelést követően ebben az esetben is szignifikáns enzimindukciót tapasztaltunk.

Ismert, hogy a H3 hiszton acetiláltsági fokának megváltozása hatással van a CYP3A alcsalád expressziójára egérben (Li *et al.*, 2009). Ezzel szemben bár a bolusban adott butirát hiperacetilálta a H3 hisztont (Mátis *et al.*, 2012b), nem okozott változást sem a CYP2H, sem a CYP3A alcsalád aktivitásában csirkék esetén, vagyis az első kísérlettel összhangban, sem a butirát beadásának módja, sem az alkalmazott dózis nem befolyásolta a butirát CYP-enzimekre gyakorolt hatását.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a *per os* felvett butirát az általunk alkalmazott koncentrációkban és módokon nem befolyásolta a máj mikroszomális CYP2H és CYP3A alcsaládok aktivitását. Így feltételezhető, hogy a gyomor-béltraktusból felszívódó butirát nem módosítja a szervezetbe kerülő xenobiotikumok metabolizmusát, tehát nem lép farmakoepigenetikus interakcióba a vele egy időben alkalmazott gyógyszerekkel, mely megerősíti a butirát takarmánykiegészítőként való további alkalmazásának biztonságosságát.

Speciális takarmányozási viszonyok között azonban esetlegesen feltételezhető, hogy a gastrointestinalis rendszerből felszívódó butirát hatással van a máj méregtelenítő rendszerére, így a CYP-ekre is. Sugatani *et al.* (2012) kísérletei során nagy zsírtartalmú táppal takarmányoztak patkányokat, amelyekben így májelzsírosodás és hyperlipidaemia alakult ki. Ez előbbi okán a CYP1A1/2 és CYP2E1 enzimek expressziója csökkent. Ezután takarmánykiegészítőként inulint alkalmaztak, amely a bakteriális butirátszintézis prekursora. A kezelés hatására a fent említett enzimek expressziója visszaállt a fiziológiás értékre.

Vizsgálati módszereink csak a CYP-enzimek aktivitásának vizsgálatára szorítkoznak, ezért nem zárható ki a butirát CYP-enzimek génjeire gyakorolt transzkripciós szintű befolyásoló hatása. Ezen kívül további, kevésbé fontos CYP-ek is előfordulnak csirkében, a butirát ezekre gyakorolt epigenetikus hatásának lehetőségét sem vethetjük el.

Összefoglalás

A takarmánykiegészítőként felvett vagy az anaerob mikrobiális fermentáció során keletkező butirát sokrétűen befolyásolhatja a különféle sejttípusok működését, epigenetikus hatásai közé tartozik a hiszton-deacetiláz (HDAC) gátlása. A HDAC aktivitás csökkentése révén a butirát hiszton-hiperacetilációt idézhet elő *in vitro* és *in vivo* egyaránt, amely közvetlenül befolyásolhatja az egyes génekről történő transzkripciót, így *in vitro* eredmények alapján a tenyésztett májsejtek mikroszomális citokróm P450 (CYP) enzimjeinek génexpresszióját is. E hatás révén a butirát megváltoztathatja a máj méregtelenítő kapacitását, illetve hatással lehet különböző xenobiotikumok biotranszformációjára. Mindezek alapján feltételeztük, hogy a butirát *in vivo* is befolyásolhatja a különböző CYP enzimek aktivitását.

Hipotézisünk bizonyítására két kísérletet is végeztünk, mindegyiket Ross 308 törzsből származó napos brojlersirkéken. Először a takarmánykiegészítőként kifejtett hatások kerültek megfigyelésre 21 napos etetési kísérlet során, melyben az 1,5 g/takarmány-kg nátrium-butirátot tartalmazó tápot fogyasztó csoport adatait vetettük össze a butirátkiegészítésben nem részesült kontrollcsoport eredményeivel. A második kísérletben a csirkéket életük 20-24. napján kezeltük, éjszakai koplaltatás után, nyelőcsőszondán keresztül különböző nátrium-butirát koncentrációjú bolusokkal (0; 0,25; 1,25 g/ttkg). Pozitív kontrollként mindkét kísérletben *intracoelomalis* phenobarbital (PB) kezelésben részesült (a bolusok beadásával azonos napokon, 80 mg/ttkg dózisban) állatok szolgáltak.

Mindkét kísérlet esetén az állatok levágását követően fiziológias sóoldattal vértelenítettük a májat, majd differenciáló centrifugálással izoláltuk a mikroszóma frakciót. A csirkében legjelentősebb mikroszomális CYP alcsaládok (CYP2H és CYP3A) aktivitását ezután specifikus enzimkinetikai tesztekkel, aminopirin-N-demetilációs, illetve anilin-hidroxilációs próbákkal mértük, és meghatároztuk a K_M , valamint a V_{max} értékeket.

Eredményeink alapján a butirát sem takarmányba keverve, sem különböző koncentrációjú bolusban adva nem fejtett ki hatást az általunk vizsgált CYP enzimek aktivitására. A PB viszont mindkét esetben szignifikánsan fokozta a máj mikroszomális aminopirin-N-demetilációs és anilin-hidroxilációs aktivitását.

Következtetesként levonható tehát, hogy a *per os* adott butirát nem befolyásolja az általunk vizsgált CYP alcsaládok működését, így feltehetően nem okoz interakciót különböző gyógyszerekkel való együttes alkalmazása során.

Summary

Butyrate, dietary supplemented and also produced by the anaerobic bacterial fermentation has variable influences on the function of different cell types. As an epigenetically active molecule, butyrate can inhibit the histone deacetylase enzyme, causing histone hyperacetylation *in vitro* and also *in vivo*. It may modify the transcription of certain genes, such as those of hepatic microsomal cytochrome P450 (CYP) enzymes of primary cultured hepatocytes. Alterations of CYP expression have an effect on the detoxification capacity of the liver, influencing also the biotransformation of xenobiotics. On the basis of these data we can hypothesise that butyrate may also have an impact on the activity of different CYP enzymes *in vivo*.

Two experimental animal studies were carried out with broiler chickens of the Ross 308 strain in the early post-hatch period. In the first trial, animals were fed with starter diet without or with sodium butyrate (1.5 g/kg feed) for 24 days. In our second experiment, broilers were treated once daily with orally administered bolus of butyrate following overnight starvation with two different doses (0.25 or 1.25 g/kg body weight per day) for five days (days 20-24). As a positive control, in order to validate the model, a group of chicks was treated by intracoelomal phenobarbital injection (80 mg/kg body weight) in both experiments.

After slaughtering the animals on day 24, both studies were conducted on the same way. Livers were exsanguinated by chilled physiological saline solution and microsomal fractions were separated by differential centrifugation. The activity of CYP2H and CYP3A subfamilies, the most important enzymes involved in biotransformation in chicken, was detected by aminopyrine N-demethylation and aniline-hydroxylation assays from the microsomal suspensions, K_M and V_{max} values were also determined.

According to our results, butyrate did not cause any changes in the drug-metabolising activity of hepatic microsomal CYP2H and CYP3A enzymes, neither as a nutritional supplement nor in bolus. However, phenobarbital significantly increased the microsomal aminopyrine N-demethylation and aniline-hydroxylation activity of the liver.

We can conclude that the orally applied butyrate did not influence the activity of the examined CYP enzymes. These data indicate that the supplementation of the diet with butyrate probably may not have any pharmacokinetic interactions with simultaneously applied xenobiotics.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom a tudományos diákköri dolgozatom létrejöttéhez elengedhetetlen közreműködéséért, kitartó lelkesítéséért és fáradhatatlan segítségnyújtásáért témavezetőmnek, Dr. Mátis Gábornak. Dr. Neogrady Zsuzsanna tanárnőnek, az Élettani és Biokémiai Tanszék Biokémiai Osztály vezetőjének hálásan köszönöm a kísérletek elvégzésében nyújtott segítségét, állandó támogatását és munkánk folyamatos koordinálását.

Köszönöm Prof. Dr. Frenyó V. László tanszékvezető egyetemi tanár úrnak a lehetőséget, hogy bekapcsolódhattam a tanszéki kutatómunkába. Köszönöm az Élettani és Biokémiai Tanszék többi munkatársának is a közreműködését, külön köszönettel tartozom Kulcsár Annának a statisztikai elemzések elkészítésében, Kulcsárné dr. Petrilla Jankának, Benedek Tündének és Annus Katának pedig a mintavételezések során nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért, Lajtai Antalnénak és Seprődi Júliának pedig a kísérletek előkészítésében, illetve adminisztrációjában való részvételéért.

A Gyógyszertani és Méregtani Tanszékről köszönetemet fejezem ki Dr. Csikó György docens úrnak, hogy folyamatos szakmai segítséget nyújtott munkánkhoz.

Ezen kívül a mikroszóma frakciók preparálása során nélkülözhetetlen segítséget kaptunk Dr. Wagner Zsolttól és Fejes Évától, a Semmelweis Egyetem Gyógyszerésztudományi Kar Gyógyszerhatástani Intézet munkatársaitól. Köszönet illeti Dr. Fébel Hedviget, a herceghalmi Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet főigazgató-helyettesét a takarmányok butiráttartalmának gázkromatográfiás ellenőrzéséért.

Anyagi támogatásról a tanszéki kereten felül a **4.2.2.B-10/1-2010-0011** számú, „*A tehetséggondozás és kutatóképzés komplex rendszerének fejlesztése a Szent István Egyetemen*” című **TÁMOP**, valamint a **15962. sz. NKB pályázat** volt segítségünkre, amelyek révén a kísérleteinkhez használt eszközök és vegyszerek jelentős részét vásároltuk.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak türelmüket és támogatásukat, hiszen enélkül a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Irodalomjegyzék

- ALBORES, A., CEBRIAN, M. E., CONNELLY, J. C., BACH, P. H. AND BRIDGES, J. W. (1992): Effects of arsenite on hepatic mixed -function oxidase activity in rats. *Xenobiotica*, 22, 591-597.
- ANNUS, K. (2010): A nátrium-n-butirát felvételének és metabolizmusának vizsgálata patkány primer májsejttenyészetén. TDK dolgozat, SzIE ÁOTK, Budapest
- BAER-DUBOWSKA, W., MAJCHRZAK-CELINSKA, A. AND CICHOCKI, M. (2011): Pharmacoeugenetics: a new approach to predicting individual drug responses and targeting new drugs. *Pharmacological Reports*, 63, 293-304.
- BERGMAN, F. N. (1990): Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews*, 70, 567-590.
- BORDIN, M., D'ATRI, F., GUILLEMOT, L. AND CITI, S. (2004): Histone deacetylase inhibitors up-regulate the expression of tight junction proteins. *Molecular Cancer Research*, 2, 692-701.
- BORNEUF, E., HÉRAULT, F., CHICAULT, C., CARRÉ, W., ASSAGF, S., MONNIER, A., MOLTIER, S., LAGARRIGUE, S., DOUAIRE, M., MASSER, J. AND DIOT, C. (2006): Microarray analysis of differential gene expression in the liver of lean and fat chickens. *Gene* 372, 162-170.
- CANDIDO, E. P. M., REEVES, R. AND DAVIE, J. R. (1978): Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell* 14:105-113.
- CSORDÁS, A. (1996): Butyrate, aspirin and colorectal cancer. *European Journal of Cancer Prevention*, 5, 221–231.
- DANNENBERG, L. O. AND EDENBERG, H. J. (2006): Epigenetics of gene expression in human hepatoma cells: expression profiling the response to inhibition of DNA methylation and histone deacetylation. *BioMed Central Genomics*, 7:181.
- DAVIDSON, B. P., DOGRA, S. C. AND MAY, B. K. (2001): The 411 antigluocorticoid RU486 inhibits phenobarbital induction of the chicken CYP2H1 gene in primary hepatocytes. *Molecular Pharmacology*, 60, 274-281.

- DOYLE, J. (2010): A review of Histone Deacetylase inhibitors and their application in veterinary medicine. Szakdolgozat, SzIE ÁOTK, Budapest
- FEKETE, T. (2009): A nátrium-n-butirát hatása a CYP 450 enzimek génexpressziójára csirkékből izolált primer májsejteken. TDK dolgozat, SzIE ÁOTK, Budapest
- FERNÁNDEZ-RUBIO, C., ORDÓÑEZ, C., ABAD- GONZÁLEZ, J., GARCIA- GALLEGO, A., PILAR HONRUBIA, M., JOSE MALLO, J. AND BALANA-FOUCE, R. (2008): Butyric acid based feed additives help protect broiler chickens from Salmonella enteritidis infection. *Poultry Science*, 88, 943-948.
- FRIEDMAN, A. AND BAR-SHIRA, E. (2005): Effect of nutrition on development of immune competence in chickens gut associated lymphoid system. pp. 234-242 in *Proc. 15th Eur. Symp. on Poultry Nutrition*. WPSA, Balatonfüred, Hungary.
- GÄBEL, G., MARTENS, H., SUENDERMAN, M. AND GÁLFI, P. (1987). The effect of feeding either roughage or concentrate diets on sodium, chloride and magnesium absorption from the temporarily isolated and washed reticulo-rumen of sheep. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*, 72, 146–150.
- GÁLFI, P., NEOGRÁDY, S. AND KUTAS, F. (1981): Culture of epithelial cells from bovine ruminal mucosa. *Veterinary Research Communication*, 4, 295–300.
- GÁLFI, P. AND NEOGRÁDY, S. (1996): Short chain fatty acids (acidifiers) as probiotics in diets for piglets. *G Piva. Proceedings of the 4th International Feed Production Conference*. Piacenza, Olaszország, 1996.02.22-1996.02.23.
- GÁLFI, P. AND NEOGRÁDY, S. (2001): The pH-dependent inhibitory action of n-butyrate on gastrointestinal epithelial cell division. *Food Research International*, 34, 581-586.
- GAO, Z. J., YIN, J., ZHANG, R. E. WARD, R. J. MARTIN, M. LEFEVRE, W. T. CEFALU, AND YE, J. (2009): Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes*, 58, 1509-1517.
- GARCIA-AGÚNDEZ, J. A., LUENGO, A. AND BENITEZ, J. (1990): Aminopyrine N demethylase activity in human liver microsome. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 48, 490-495.
- GUILLOTEAU, P., MARTIN, L., EECKHAUT, V., DUCATELLE, R., ZABIELSKI, R. AND VAN IMMERSEEL, F. (2010): From gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutrition Research Reviews*, 23, 366-384.

- ISHIBASHI, T., DRYHURST, D., ROSE, K. L., SHABANOWITZ, J., HUNT, D. F. AND AUSIO, J. (2009): Acetylation of vertebrate H2A.Z and its effect on the structure of the nucleosome. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 48, 5007–5017.
- KAUFMAN, W., HAGEMEISTER, H. AND DIRKSEN, H. (1979). Adaptation to changes in dietary composition, level and frequency of feeding. *Y. Ruckebush, & P. Thivend (Eds.), Digestive physiology and metabolism in ruminants, Proc. of the 5th International Symposium on Ruminant Physiology* (pp. 587–602.) Clermont-Ferrand.
- KIEN, C. L., PELTIER, C. P., MANDAL, S., DAVIE, J. R. AND BLAUWIEKEL, R. (2008): Effects of the in vivo supply of butyrate on histone acetylation of cecum in piglets. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 32, 51-56.
- KRISTENSEN, N. B., HANSEN, O. AND CLAUSEN, T. (1995): Measurement of the total concentration of functional Na⁺, K⁺-pumps in rumen epithelium. *Acta Physiologica Scandinavica*, 155, 67-76.
- LI, Y., CUI, Y., HART, S. N., KLASSEN, C. D. AND ZHONG, X. B. (2009): Dynamic patterns of histone methylation are associated with oncogenic expression of the CYP3A4 genes during mouse liver maturation. *Molecular Pharmacology*, 75, 1171–1179.
- MÁTIS, G., NEOGRÁDY, S., CSIKÓ, G., GÁLFI, P., FÉBEL, H., JEMNITZ, K., VERES, Z., KENÉZ, Á., KULCSÁR, A. AND HUBER, K. (2012A): Effects of dietary butyrate supplementation on hepatic histone acetylation and enzymes of biotransformation in broiler chicken (*közlésre benyújtva, elbírálás alatt*)
- MÁTIS, G., NEOGRÁDY, S., CSIKÓ, G., KULCSÁR, A., KENÉZ, Á. AND HUBER, K. (2012B): Effects of orally applied butyrate bolus on histone acetylation and cytochrome P450 enzyme activity in the liver of chicken – a randomized controlled trial (*közlésre benyújtva, elbírálás alatt*)
- NASH, T. (1953): The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochemical Journal*, 55, 416-421.
- PAOLINI, M., POZZETTI, L., SAPONE, A., BIAGI, G. L. AND CANTELLI-FORTI, G. (1997): Development of basal and induced testosterone hydroxylase activity in the chicken embryo in ovo. *British Journal of Pharmacology*, 122, 344-350.

- RICKE, S. C. (2003): Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobiols. *Poultry Science*, 82, 632-639.
- RIGGS, M. G., WHITTAKER, R. G., NEUMAN, J. R. AND INGRAM, V. M. (1977): Modified Histones in HeLa and Friend Erythroleukemia Cells Treated with *n*-Butyrate. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 42, 815-818.
- RUSSELL, J. B. (1992):. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: Anion accumulation versus uncoupling. *Journal of Applied Bacteriology*, 73, 363–370.
- SEGAIN, J. P., RAINGEARD DE LA BLÉTIÈRE, D., BOURREILLE, A., LERAY V., GERVOIS, N., ROSALES, C., FERRIER, L., BONNET, C., BLOTTIÈRE, H. M. AND GALMICHE, J.P. (2000): Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*, 47, 397-403.
- SUGATANI, J., SADAMITSU, S., WADA, T., YAMAZAKI, Y., IKARI, A. AND MIWA, M. (2012): Effects of dietary inulin, statin, and their co-treatment on hyperlipidemia, hepatic steatosis and changes in drug-metabolizing enzymes in rats fed a high-fat and high-sucrose diet. *Nutrition and Metabolism*, 9:23.
- TAFAZOLI, S. AND O'BRIEN, P. J. (2005): Peroxidases: a role in the metabolism and side effects of drugs. *Drug Discovery Today*, 10, 617-625.
- VAN DER HOEVEN, T. A. AND COON, M. J. (1974): Preparation and Properties of Partially Purified Cytochrome P-450 and Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Cytochrome P-450 Reductase from Rabbit Liver Microsomes. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 6302-6310.
- VAN IMMERSEEL, F., BOYEN, I., GANTOIS, L., TIMBERMONT, L., BOHEZ, L., PASMANS, F., HAESBROUCK F., AND DUCATELLE, R. (2005): Supplementation of coated butyric acid in the feed reduces colonization and shedding of Salmonella in poultry. *Poultry Science*, 84, 1851– 1856.
- VELÁZQUEZ, O. C., LEDERER, H. M. AND ROMBEAU, J. L (1997): Butyrate and the colonocyte. Production, absorption, metabolism, and therapeutic implications. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 427, 123-134.
- WARNECKE, T. AND GILL, P.T. (2005): Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications. *Microbial Cell Factories*, 4, 25.

- YOO, E. J., CHUNG, J. J., CHOE, S. S., KIM, K. H. AND KIM, J. B. (2006): Down-regulation of histone deacetylases stimulates adipocyte differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 6608-6615.
- ZHANG, W. H., JIANG, Y., ZHU, Q. F., GAO, F., DAI, S. F., CHEN, J. AND ZHOU, G. H. (2011): Sodium butyrate maintains growth performance by regulating the immune response in broiler chickens. *British Poultry Science*, 52, 292-301.