



Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Kar
Élettani és Biokémiai Tanszék

**Bakteriális lipopoliszacharidok által kiváltott gyulladás
vizsgálata sertés primer májsejttenyészen**

Készítette: Lipták Antónia

Témavezetők: Dr. Mátis Gábor

Kulcsár Anna

Budapest
2013

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
A máj funkciója és felépítése, a májsejt izoláció	5
A természetes immunitás és a gyulladás	8
A gyulladás biokémiája és hatása a sejtek citokróm P450 expressziójára	9
A CYP enzimaktivitást gátló faktorok és a csökkent enzimműködés feltételezett előnyei .	11
CÉLKITŰZÉS.....	14
ANYAG ÉS MÓDSZER.....	15
Kísérleti állatok	15
Vegyszerek.....	15
Előkészületek	15
Májsejtek izolálása és tenyésztése.....	16
Kezelés és mintavétel	18
Szendvics ELISA	19
Kvantitatív real-time PCR.....	21
Statisztika	24
EREDMÉNYEK	25
MEGBESZÉLÉS.....	28
ÖSSZEFOGLALÁS.....	32
SUMMARY	34
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	36
IRODALOMJEGYZÉK.....	37

Rövidítések jegyzéke

CycA = cyclophilin-A

CYP = citokróm P450 enzimcsalád

DNS = deoxiribonukleinsav

EDTA = etilén-diamin-tetraecetsav

EGTA = etilén-glikol-tetraecetsav

EET = epoxieicozatetraénsav

ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FBS = fetal bovine serum

HEPES = N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid

HPRT = hipoxantin-foszforibozil-transzferáz

HRP = horseradish peroxidase

IFN = interferon

IGF-1,2 = insulin-like growth factor-1,2

IL = interleukin

LPS = lipopoliszacharid

NF- κ B = nuclear factor- κ B

NOS2 = nitrogén-monoxid szintáz 2

P = tévedési valószínűség

PAMP = pathogen-associated molecular pattern

PGE₂ = prostaglandin-E2

PGF₂ = prostaglandin-F2

PGI₂ = prostaglandin-I2

qRT-PCR = quantitative real-time polymerase chain reaction

RNS = ribonukleinsav

TLR = toll-like receptor

TNF = tumor necrosis factor

TXA₂ = tromboxan-A2

Bevezetés és irodalmi áttekintés

Az emberiséget évszázadok óta foglalkoztatja, hogy mi is történik pontosan az élő szervezeteken belül. A szünni nem akaró kíváncsiságnak köszönhetően végzett mélyreható kutatások eredményeképpen mára már temérdek folyamat mechanizmusa tisztázott elejétől a végéig, ám még mindig akadnak felfedezésre váró területek is. A napjainkban is zajló vizsgálatok eredményei olykor alátámasztják eddigi elképzeléseinket, de előfordul, hogy gyökeresen megváltoztatják azokat, ezzel átírva mindazt, amit esetleg az orvosi tankönyvekben eddig tényként olvashattunk. Ennek köszönhetően diagnosztikai eljárások, sebészi módszerek, valamint egyes gyógyszerek terápiás alkalmazása módosulhat lényegesen, biztonságosabbá és hatékonyabbá téve azokat.

Az intakt, élő szervezeteken alkalmazott vizsgáló eljárásokat *in vivo* módszereknek nevezzük. Ezzel szemben bizonyos részek (szervek, szövetek, sejtek) elkülönített, a szervezeten kívül végzett vizsgálatára is lehetőségünk van egy *ex vivo*, *in vitro* (azaz üvegedényben) végzett kísérlet során. Utóbbi előnye az *in vivo* vizsgálatokhoz képest főként abban rejlik, hogy egy *in vitro* modell segítségével módunk nyílik a szervezet biokémiai kölcsönhatások sokaságából álló, végtelenül összetett rendszerét leegyszerűsítve, kizárólag az általunk kiválasztott szövet-, vagy sejttípus működését vizsgálni egy adott reakcióban. Az előbbiekből kiindulva tehát, *in vitro* rendszerekkel való kísérletezés során fel tudjuk deríteni, hogy bizonyos külső hatásra adott válasz az adott sejt-, vagy szövettípus közvetlen reakciója-e, továbbá hogy a vizsgált szerv sejtei önmagukban, a szervezet utasítása nélkül, milyen anyagokat hasznosítanak, illetve adnak le környezetükbe. Az eredményekkel pedig fontos információkhoz juthatunk a vizsgált szerv, szövet, sejt önálló működését, anyagcsere-folyamatait illetően. Az újonnan szerzett ismeretek segítségével pedig a további kísérleteket célzottan tervezhetjük meg és végezhetjük el, ráadásul pontosabban is értelmezhetjük őket.

Mindezen túl, az *in vitro* és *in vivo* végzett kísérletek összehasonlítása során nem hagyhatóak figyelmen kívül az állatvédelmi szempontok sem. Minden állatokon végzett kísérlet esetében ragaszkodni kell az ún. „3R koncepcióhoz”, mely szerint elsődleges a refinement, reduction és replacement kifejezések által képviselt irányelvek követése. Azaz fontos az állatbarát kivitelezés, az esetlegesen szenvedést okozó lépések minimalizálása, továbbá lehetőség szerint az élő állaton végzett kutatások *in vitro* körülmények között történő végrehajtása.

Az *in vitro* kísérletek hátránya, hogy a legtöbb esetben az ily módon nyert eredmények nem vonatkoztathatóak közvetlenül a teljes élő szervezetben lejátszódó folyamatokra, mivel a sejtek *in vitro* működése jelentősen el is térhet az *in vivo* tapasztaltaktól. A biológiai és biomedicinális kutatások végső célja viszont természetesen az *in vivo* működés felderítése, így nélkülözhetetlen az *in vitro* adatok *in vivo* érvényességének, relevanciájának meghatározása (Kovács and László, 2012).

Régóta és már sokak által kutatott terület a természetes immunitás, annak mechanizmusa, valamint vele együtt a gyulladásos válasz kialakulásának folyamata és következményei is. Eddig a legtöbb kísérlet a májat, mint az intermedier anyagcsere központi szervét célozta, de jelentős eredmények születtek az agy, a vese és a bélrendszer sejtjeinek gyulladásos folyamatokban betöltött szerepét illetően is (Oswald, 2006; Sewer et al., 1997; Giarca Del Busto Cano et al., 1997).

A máj funkciója és felépítése, májsejt-izoláció

Funkcióját tekintve a máj az egyik legsokoldalúbb szerv. Legfontosabb szerepe anatómiai helyeződésével hozható kapcsolatba, mivel a *v.portae*-n keresztül a bélből felszívódott anyagok közvetlenül a hepatocytákba jutnak, és az itt zajló anyagcsere-folyamatokba lépve legtöbb esetben átalakulnak. Mindez különösen fontos a nem tápanyag jellegű testidegen anyagok, az úgynevezett xenobiotikumok expozíciója esetén, mivel különböző szövetek sejtjeiben akkumulálódva károsíthatják a szervezetet. E molekulák biotranszformációja főleg a májszövetben, a mikroszómális citokróm P450 (CYP) enzimcsalád révén megy végbe.

Ezen túl nélkülözhetetlen funkciói közé tartozik a plazmafehérjék szintézise és szekréciója a vérbe. Ilyenek többek között az albumin, a fibrinogén, egyes véralvadási faktorok, globulinok, komplementrendszer, plazminogén, transferrin, lipoproteinek fehérje komponense. Részt vesz különböző jelmolekulák (hormonok, mediátorok), mint például citokinek, eritropoietin, IGF-1, IGF-2, angiotenzinogén, calcitriol, trijód-tironin képzésében, átalakításában. Fontos továbbá, hogy a fent említett citokinek közreműködésével központi szerepet tölt be a gyulladásos folyamatok mediációjában is. Végül két további jól ismert funkciója az epesavak szintézise és szekréciója a bél lumene felé az intra-, és extrahepatikus epeutakon keresztül, valamint egyes vitaminok és fémek tárolása (pl.: A-vitamin, folsav, B12-vitamin, vas illetve réz) (Röhlich, 2006).

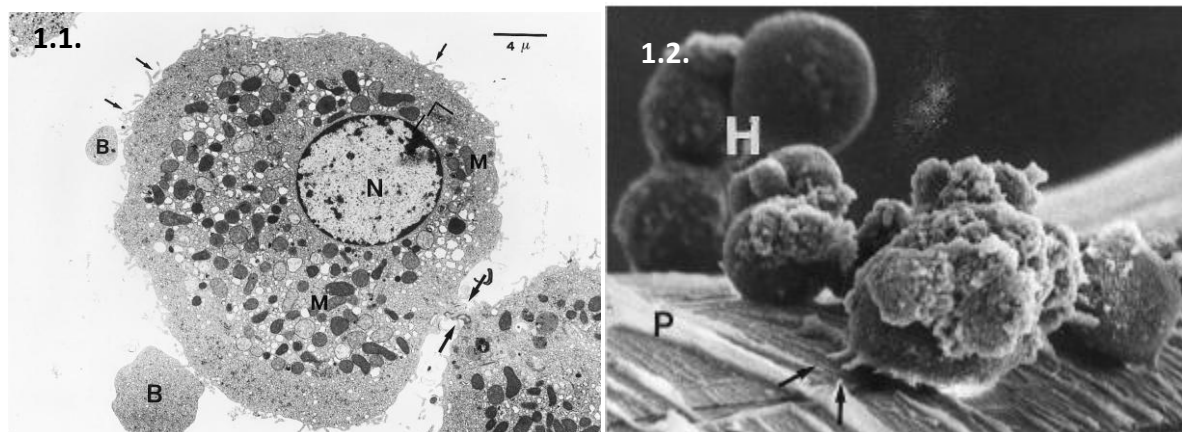
Az emlős máj körülbelül 78%-át a parenchymát képző májsejtek alkotják. Az úgynevezett nem-parenchymalis (a máj állományának 6%-át képző) sejtalkotók közé a vér-, és epeereket, sinusoidokat illetve a Disse-féle teret bélelő endothel sejteket, a phagocytá tulajdonságokkal rendelkező Kupffer-sejteket, a lipideket tároló Ito-sejteket, a Natural Killer típusú fehérvérsejteket, valamint a „pit” sejteket sorolhatjuk. Utóbbiak a sinusoidok lumenében lehorgonyzott, máj asszociált lymphocyták, melyek szoros kapcsolatban vannak az endothel-, valamint a Kupffer-sejtekkel. Valószínűleg főleg a fibrogenezist stimuláló faktorok termelésében lehet szerepük (Friedman, 2004a,b). A fennmaradó 16%-ot a Disse-féle tér, a sinusoidok és az epeutak lumene teszi ki (Blouin et al., 1977). A parenchymát összefüggő, finom kollagén- és elasztikus rostok hálózatából létrejövő kötőszövetes állomány szövi át. Ez utóbbi a főként elasztinból, proteoglikánokból, valamint adhéziós molekulákból (laminin és fibronectin) álló extracelluláris mátrixba ágyazott.

Az interstitium a glikoproteinekkal, Ca^{2+} -ionokkal, továbbá a májszövetben előforduló sejtek felületi receptoraival együttműködve fontos szerepet tölt be a sejtek alakjának, polaritásának és funkciójának megőrzésében. Mindezen, a máj morfológiájával és funkciójával kapcsolatos ismeret nélkülözhetetlen az *in vitro* vizsgálati modellek készítéséhez szükséges hepatocytá-izoláció módszerének részletes kidolgozásához (Puviani et al., 1998).

Emlős májsejt-szuszpenzió kinyerésére kétféle eljárás is létezik. Lehetőségünk van a parenchyma mechanikus úton történő elkülönítésére (Schneider and Potter, 1943), de a leggyakrabban alkalmazott módszer a májsejtek enzimatisz emésztéssel történő izolálása. Utóbbi kivitelezhető a szerv kollagenáz oldatba való merítésével (Fry, 1981; Howard et Pesch, 1968), de létezik egy korszerűbb eljárás is, mely során az előbb említett emésztőenzimet perfúziós rendszer segítségével a máj érhalózatán átáramoltatva alkalmazzuk, ily módon elérve a kívánt hatást a szerv teljes egészén (Berry and Friend, 1969; Seglen, 1976). Ezeket az eljárásokat elsőként patkányok felhasználásával dolgozták ki. Az áttörést a Seglen által 1976-ban létrehozott „két-lépéses módszer” jelentette, mely az előbbiek kismértékű, ám annál jelentősebb módosításával jött létre. Ennek lényege pedig, hogy a megfelelő sejtizoláció érdekében először a szerv Ca^{2+} -tartalmát el kell távolítani, például különböző fém-ionokkal kelátképző vegyületek alkalmazásával (EGTA, EDTA), a sejtek közötti desmosomális kapcsolatok megszüntetése céljából, ám a későbbiekben szükség van az elvont ionok pótlására. A kollagenázzal történő emésztés ugyanis hatékonyabb Ca^{2+} jelenlétében, mivel az fokozza az enzim aktivitását és gyorsítja a sejtszétválás folyamatát (Seglen, 1972).

Ez a módszer tette lehetővé az eljárás egyéb állatfajokon történő alkalmazását is. Így nyúl (Walpole et al., 1990), kutyán (Kasai and Mito, 1993) végrehajtott kísérletek mellett az egyébként kötőszövetes állományban rendkívül gazdag, ezáltal nehezen disszociálható sertés máj felhasználásával is készültek intakt hepatocytá sejtizolátumok (Rozga et al., 1993; Puviani et al., 1998). Mindezen felül Mito és Kusano munkájának köszönhetően ma már lehetőség van emberi májból subsegmentectomiával egészen kisméretű szervfragmentum kinyerésére, és az előbbiekhöz hasonló feldolgozására (Mito and Kusano, 1993). Ennek jelentősége főleg a human medicinában kimagasló, mivel az eljárás alkalmazásával végzett májsejt-transzplantációs kísérletek új kapukat nyithatnak meg az akut és krónikus májbetegségek, valamint az öröklött vagy szerzett (máj eredetű) anyagcsere-betegségek gyógyításában (Puviani et al., 1998).

Az izolált hepatocyták (**1. ábra**) még órákig megőrzik életképességüket, metabolikus aktivitásukat, valamint különböző hormonokra, mediátorokra való érzékenységet, ezzel lehetőséget teremtve működésük és szerkezetük részletes vizsgálatára. Mindezen tulajdonságuk még tovább fenntartható, hogyha azokat tenyésztőedényekre lerakva sejt kultúrákat hozunk létre (Puviani et al., 1998).



1. ábra 1.1.: Izolált sertés májsejt transzmissziós elektronmikroszkópos képe, *N= sejtmag, B= exkréciós vakuólum, M= mitokondrium* (forrás: Puviani et. al, 1998); **1.2.:** Izolált patkány májsejt pásztázó elektronmikroszkópos képe, *H= májsejt, P= I-es típusú kollagénnel bevont műanyag háló, nyilak= a sejt felületén megfigyelhető citoplazmanyúlványok, melyek segítségével a hepatocytá a műanyag háló felületéhez rögzül* (forrás: Puviani et. al, 1998)

A természetes immunitás és a gyulladás

Régóta és már sokak által kutatott terület a természetes immunitás, annak mechanizmusa, valamint vele együtt a gyulladásos válasz kialakulásának folyamata és következményei is.

A természetes immunválasz során a szervezetbe került exogén anyagokat vagy az immunsejtek által idegenként regisztrált tumorsejteket nem specifikus, de azonnal reagálni képes celluláris (mint például makrofágok, granulocyták, NK sejtek) és humorális elemek (például komplement faktorok, hő-sokk fehérjék, citokinek, hisztamin) távolítják el. Ezzel a rendszerrel szoros kölcsönhatásban működik az adaptív vagy más néven szerzett immunreakció, melynek célja az immunválasz irányítása (serkentés, gátlás), antigénspecifikus célzott védekezés és az immunmemória kialakítása. Elemei a T- és B-lymphocyták, illetve az utóbbi által termelt, már a kórokozóra specifikus antitestek.

A különféle idegen antigének, mint például a táplálékból származó proteinek, toxinok, a természetes bélflórát alkotó baktériumok vagy egyes kórokozók leggyakrabban a bélrendszeren keresztül jutnak be a szervezetbe (Chen et al., 2000; Neutra et al., 1996; Salmi et al., 1996). Ennek megakadályozása érdekében a gastrointestinalis traktus (a gyomortól a vastagbélíg) üregének teljes egészét egységes epithelsejt-réteg béleli, barriert képezve a lumenális környezet és a szervezet intact milieu-je között (Gewirtz et al., 2002). Ez a bélhámsejtek működésén alapuló védelmi vonal több fő összetevőből épül fel. Így beszélhetünk az epithel által képzett fizikai barrierről, a Goblet-sejtek termelte mucin réteg defenzív funkciójáról, a bélhám által szekretált védő peptidekről, illetve különféle kemokinekről és citokinekről, mint a szervezetet a bél felől érkező exogén, sok esetben káros anyagoktól óvó elemekről (Oswald, 2005). Előfordul, hogy bizonyos okból, például enteropatogén baktériumtörzsek bélbe jutása és elszaporodása miatt, ez a több komponenses rendszer valamely ponton sérül, utat nyitva az antigén természetű molekulák számára, például különböző bakteriális eredetű exotoxinok vagy Gram-negatív baktériumok sejtfalából származó lipopoliszacharidok (LPS). Ennek következtében a természetes immunválasz azonnal aktiválódik, majd egy gyulladásos reakció veszi kezdetét, mely a folyamat során termelődött mediátoroknak (citokinek, hisztamin, prosztaglandinok stb.) a vérpályába kerülésével, már az egész szervezetet érinti (Ogle et al., 1997). Elsők között a bélrendszerrel a *v. portae* által közvetlenül kapcsolatban álló máj kényszerül válaszreakcióra.

A fent említett okokból a témakört tanulmányozó kutatók figyelme sok esetben a bélhámsejtekre, illetve a hepatocytákra irányul, ennek értelmében a legtöbb feldolgozott adat is e két sejtípust illetően áll rendelkezésünkre.

Az immunválasz részeként létrejövő gyulladásos reakció *in vitro* tanulmányozásának egyik klasszikus gyakorlata a sejttenyészetek bakteriális eredetű LPS-el történő kezelését követő vizsgálata (Morgan, 2001).

A gyulladás biokémiája és hatása a sejtek citokróm P450 expressziójára

A gyulladás különböző kórokokra visszavezethető immunológiai reakciók eredménye, melynek klasszikus tünetei a kipirultság, melegség, duzzanat, fájdalom és esetleges működés kiesés. Mindezt a folyamat során felszabadult gyulladásos termékek eredményezik, melyeknek kiinduló vegyülete a minden sejt membránjában foszfolipidekkel észterifikálódva foszfatidil-kolinként (lecitin), illetve foszfatidil-etanolaminként (kefalin) megtalálható arachidonsav. Utóbbi felszabadulásához foszfolipáz A2 szükséges, mely akkor aktiválódik, ha valamely sejt a kórokozóhoz, vagy a belőle esetlegesen felszabadult LPS-hez kapcsolódva, az ún. Toll-like receptorának, (transzmembrán fehérje, TLR) segítségével felismeri annak idegen elemekre jellemző molekuláris mintázatát (pathogen associated molecular patterns=PAMP). Ezen anyagok közé tartozik például a Gram-negatív baktériumok LPS-e, a gombák mannánja vagy egyes patogén vírusok kettős szálú RNS-e. Kísérletekkel már kimutatták, hogy LPS hatására különböző szövetek sejtjeinek TLR expressziója illetve a meglévő receptorok aktivitása fokozódik (Burkey et al., 2007; Arce et al., 2010; Hanson et al., 2011). Az idegen anyag receptorhoz való kötődésével pedig egy intracelluláris jelátviteli mechanizmus aktiválódik, melynek eredményeként fokozódik a gyulladásos citokinek expressziója, így a tumor nekrosis faktor-alfa (TNF-alfa), interleukinok (IL), interferonok (IFN) termelődése. Ezek lesznek azok a mediátor anyagok, melyek többek között a már fent tárgyalt foszfolipáz-A2 aktiválódásáért felelősek, ezzel bizonyítva szerepük fontosságát a gyulladásos reakció kialakulásában. Bár fontos megjegyezni, hogy az előbb említett IL-okat gyulladásos folyamatokban betöltött szerepük alapján két külön csoportba sorolhatjuk. Ezek alapján beszélhetünk gyulladásos citokinekről, mint például az IL-6 és az IL-8, valamint gyulladásgátló hatású molekulákról, mint az IL-10.

Az észterkötések hasítását követően felszabadult arachidonsav sorsa különböző aszerint, hogy milyen enzim gyakorol rá további hatást. Egy lipoxigenáz katalizálta folyamat során leukotriének, ciklooxygenáz által pedig prosztaglandinok (pl.: PGE2, PGF2),

prosztaciklinek (pl.: PGI₂) és tromboxánok (pl.: TXA₂), továbbá citokróm-tartalmú epoxigenáz enzimek közreműködésével epoxieikozatetraénsav származékok (EET-k, szerepükről az alábbiakban még olvashatunk) jönnek létre a már említett kiindulási vegyületből (Gálfi et al., 2010).

Ezen komponensek közül főként a prosztaglandinok állnak a gyulladásos reakció szolgálatába azáltal, hogy különböző fehérvérsejteket aktiválnak, hatásukra az érintett szövet erei kitágulnak, valamint bizonyos koncentrációban a test maghőmérsékletét is emelik (láz), ezzel biztosítva a kórokozó gyors és hatékony eliminálásához szükséges körülményeket az immunrendszer sejtes és humorális elemei számára. Optimális esetben a reakció eléri célját és ennek az összetett rendszernek köszönhetően a szervezet megszabadul a folyamatot kiváltó patogéntől. Amennyiben ez nem történik meg, a gyulladásos termékek hosszú távon komoly károsodásokat idézhetnek elő az érintett szövetben (fibrosis, végleges funkciócsökkenés vagy -kiesés). Az ártalmas hatások már az akut fázis reakció során, a folyamat kezdetén is megfigyelhetők, ha az érintett sejteket anyagcseréjük szintjén vizsgáljuk. Ezen az alapon sokat kutatott terület az intracellulárisan, a mikroszómákban található citokróm P 450 (CYP) enzimcsalád működése.

A szervezetet állandóan terhelik olyan molekulák (testidegen anyagok, xenobiotikumok), melyek a sejtekben akkumulálódva károsak lehetnek. A CYP enzimek legfőbb feladata az ún. I. fázisú reakciók katalizálása, azaz ezen molekulák egy leggyakrabban redoxireakcióban történő bontása, hidroxilezése, dealkilálása vagy hidrolízise, ezáltal a későbbi konjugációra (II. fázisú reakcióra) történő előkészítése. A lényeg tehát, hogy az I. fázisú reakcióban keletkező termék rendelkezzen olyan poláris sajátosságú csoporttal, mely a biotranszformáció következő, konjugációs lépésének célpontjául szolgálhat. A CYP-enzimcsoport működése legnagyobb aktivitással a májban figyelhető meg, de fellelhetők még egyéb szövetekben is, például a bélfalban, vesékben, tüdőben, petefészekben, herékben, mellékvesékben (Gálfi et al., 2010). A CYP monooxigenázokat biokémiai sajátosságaik, illetve aminosav-szekvenciájuk homológiája alapján családokba, azon belül alcsaládokba sorolhatjuk. Ez a rendszerezés megmutatkozik az egyes enzimek elnevezésében, így a családot arab számmal, az alcsaládot betűvel és az adott enzimet egy újabb arab szám feltüntetésével jelöljük. Így például az emlősök májában legnagyobb arányban található típus a CYP3A alcsaláddhoz tartozik, illetve az emberben leggyakrabban előforduló izoenzimet CYP3A4 (Morgan, 2000) betű-szám kombinációval különböztetjük meg a többitől.

Ezen enzimekkel kapcsolatos kutatások akár állatorvosi, akár orvosi viszonylatban is főleg azért jelentősek, mert ezek felelősek az alkalmazott gyógyszerek metabolikus

aktivációjáért vagy inaktivációjáért a szervezetben (Morgan, 1997). Másképpen megfogalmazva, módosítják azok hatását, ezzel pedig minden esetben számolnunk kell (például a dózis beállításánál) a kívánt hatás elérése és a nem kívánt mellékhatások elkerülése érdekében.

Mindezeken túl szintén figyelembe veendő bizonyított tény, hogy minden fertőzés és a következményes gyulladásos folyamat hatással van a különböző CYP enzimek expressziójára, illetve aktivitására (Morgan, 1997). Ennek a jelenségnek az okai és következményei még a mai napig sem ismertek teljes egészében. Bizonyos részleteket már sikerült megfejteni, ám a kapott eredményekkel csak újabb megválaszolandó kérdések kerültek napvilágra.

Az már több mint 30 éve tisztázott, hogy a szervezet immunválaszának aktivációját a legtöbb esetben CYP enzim szupresszió követi (Morgan, 1997; Sewer et al., 1997). Ma már az a fő kérdés, hogy ez miért következik be. Morgan és kutatócsoportja 1989-ben feltételezte, hogy mindez nem egy adaptív, homeosztatikus válasz része, hanem csupán annak a következménye, hogy ilyenkor a májsejtek transzkripció mechanizmusait az úgynevezett akut fázis proteinek termelése köti le a CYP-expressziót háttérbe szorítva (Morgan, 1989). Az egyes CYP enzimek szabályozása többféle mechanizmuson keresztül valósul meg, amelyeket különböző citokinek eltérő módon befolyásolhatnak (Morgan, 1997). További kísérletek alapján pedig világossá vált, hogy a már említett okokból bekövetkező CYP enzim szupresszió ténylegesen része egy a szervezet homeosztázisát a gyulladásos mediátorok káros hatásától megóvni igyekvő rendszernek (Muntane-Relet et al., 1995).

A CYP enzimaktivitást gátló faktorok és a csökkent enzimműködés feltételezett előnyei

Bizonyított, hogy a gyulladásos folyamat során felszabaduló citokinek szelektív módon hatnak a CYP expresszióra (Muntane-Relet et al., 1995; Morgan, 1997), bár több májsejttenyészetben végzett kutatás eredményei alapján elmondható az is, hogy ugyanazon citokróm szupresszióját többféle citokin is képes előidézni. Tehát a legfőbb kérdés tulajdonképpen az, hogy mely citokinek mely CYP enzimek expressziójának modulálásában játszanak szerepet (Morgan, 2000).

Warren és munkatársai által végzett kutatás célja az endogén TNF-alfa CYP expresszióra gyakorolt hatásának megállapítása volt. A CYP1A, CYP2B és CYP3A alcsaládok enzimeinek aktivitása bakteriális infekció (a kísérletben LPS stimulus) hatására, a TNF-alfától függetlenül csökkent. Ezzel szemben a CYP2D9, valamint a CYP2E1 működés a

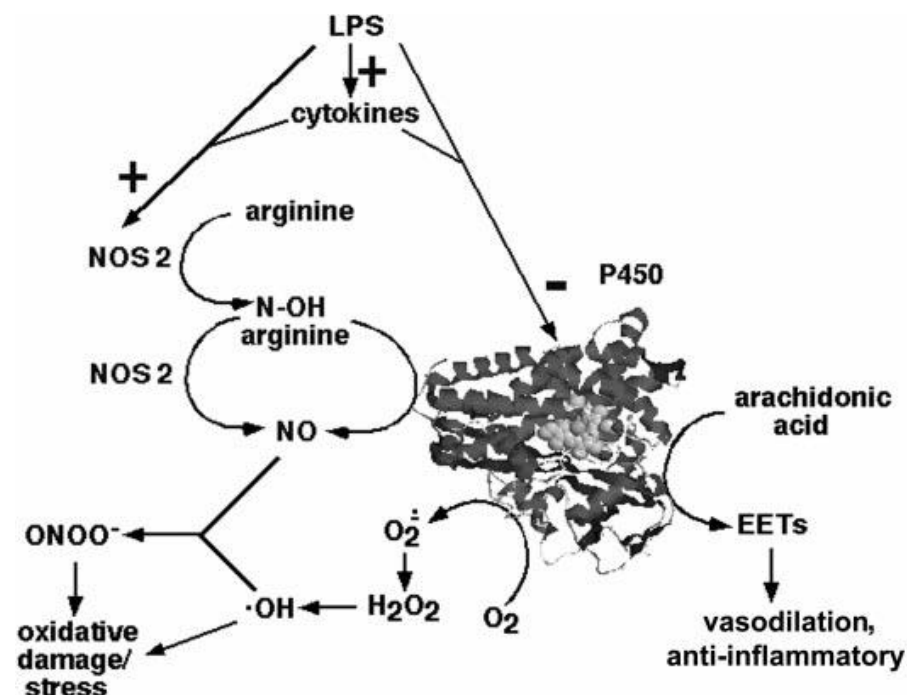
stimulus után magasabb intenzitást mutatott az említett citokin receptorával genetikai alapon nem rendelkező egerekben, mint a kontroll állatokban (Warren et al., 1999).

Egy évvel később Siewert egy hasonló kísérlet során az IL-6 szerepét vizsgálta. Választása azért erre a citokinre esett, mert ez a gyulladásos reakció egyik legjelentősebb mediátora azáltal, hogy a folyamat kezdetén az akut-fázis protein génexpresszióját fokozza a májsejtekben. Az eredmények szerint a turpentin (különböző fenyőfélék gyantájának lepárlásával nyert, főleg monoterpéneket tartalmazó folyadék) indukált immunválasz során a CYP1A2, a CYP2A5 és a CYP3A1 redukció nem valósult meg az IL-6 génhányos állatokban. Tehát ez az interleukin nélkülözhetetlen komponense a CYP szupresszióknak (Siewert et al., 2000).

Megfigyelték, hogy a citokineken kívül különböző hormonok is hatást gyakorolhatnak a tárgyalt mikroszómális enzimekre. Így például egyes glükokortikoidok (Morgan, 1997), a glukagon (Sidhu and Omiecinski, 1995), a növekedési hormon (Shapiro et al., 1995) és a tesztoszteron (Kojima et al., 2010). Utóbbival, sertéseken végzett kutatások során megállapították, hogy ez a tipikusan hím nemi hormon regulálni képes a hepatikus CYP1A1 és CYP1A2 enzimek génexpresszióját, nemek szerinti különbségeket létrehozva működésükben.

Segítséget adhat a gyulladás alkalmával kialakuló CYP enzim szupresszió okainak megértéséhez, ha megtaláljuk az enzimsalád katalizálta reakciók közül azokat, melyek végtermékei valamilyen okból károsak lehetnek a sejtekre, szövetekre és így módon az egész szervezetre nézve vagy azokat, melyek a természetes immunválasz egyes részfolyamatainak megvalósulására hátrányosan hatnak. Mindehhez segítséget nyújt a **2. ábra**.

A képen is jól látható, hogy ezek az enzimek működésük során reaktív oxigén vegyületek, mint szuperoxid anion gyök és hidrogén-peroxid, felszabadulását eredményezik (White et Coon, 1980). Az utóbbiból fém jelenlétében kialakuló hidroxil-gyök pedig reagálhat, a CYP enzimek mellett nitrogén-monoxid szintáz (NOS2) által katalizált folyamatból (Harbrecht et al., 1997) származó nitrogén-monoxid molekulákkal, létrehozva a nagyon reaktív peroxinitritet (Morgan, 2000).



2. ábra. A CYP enzimek gyulladásos folyamatok során feltételezett funkciói
(forrás: Morgan, 2000)

A másik megfigyelhető, ebből a szempontból kiemelendő CYP-funkció, hogy képesek a gyulladásos válasz során, a sejtmembránból felszabaduló arachidonsavból úgynevezett epoxi-eikozatetraénsav (EET) származékok szintézisére (Campbell, 2000). Az EET-k a fertőzést követő immunreakciót kontrollálják, továbbá értágító sajátosságuk is ismert. A gyulladásellenes tulajdonságukra bizonyíték, hogy gátolják a TNF-alfa indukált vascularis sejt adhéziós molekula-1 expresszióját, valamint a nukleáris faktor- κB (NF- κB) elnevezésű transzkripciós faktor működését (Node et al., 1999).

A már előbbieken tárgyalt mediátorok CYP enzimekre gyakorolt szupresszív hatásának köszönhetően tehát mind az önmaguk által termelt, mind pedig az infekció következtében felszabaduló citokinek hatására létrejövő reaktív oxigén gyökök mennyisége redukálódik. Mindeközben az EET molekulák mennyiségének csökkenésével biztosított a gyulladásos folyamat fennmaradása.

Célkitűzés

A májban zajló különféle gyulladásos és metabolikus folyamatok vizsgálatára, az alapvető molekuláris mechanizmusok tisztázására – a hagyományos *in vivo* állatkísérleteket részlegesen kiváltva – kitűnő modellként szolgálnak a primer májsejttenyészetek. Munkánk során célul tűztük ki a számos kórkép során felszabaduló bakteriális lipopoliszacharidok (LPS) májra kifejtett hatásainak vizsgálatát egy általunk létrehozott sertés primer májsejttenyészetben, mint *in vitro* rendszeren. A sejttenyészet jellemzésére, valamint a májsejtek életképességének és metabolikus aktivitásának ellenőrzésére azok albumintermelésének mérése szolgált. Az LPS hatására beinduló hepatikus gyulladásos folyamatokat az egyik legfontosabb gyulladásos mediátor, az interleukin-8 (IL-8) koncentrációjának tápfolyadékából történő meghatározásával vizsgáltuk.

A gyulladásos, szeptikus folyamatok alapvetően befolyásolják a hepatocyták mikroszomális citokróm P450 (CYP) enzimjeinek expresszióját, illetve aktivitását, melynek különösen fontos szerepe van a szervezetet terhelő xenobiotikumok biotranszformációjában. Így a gyógyszer-metabolizmusban legnagyobb jelentőséggel bíró CYP izoenzimek génexpressziójának meghatározásával az LPS hatására a máj detoxifikáló rendszerében bekövetkező változásokat is nyomon kívántuk követni.

Kutatásunk eredményei alapján igazolni kívántuk, hogy az általunk kialakított sertés primer májsejttenyészet megfelelő modell a különféle gyulladásos folyamatok tanulmányozásához. Fontos továbbá, hogy a szerzett tapasztalatok felhasználásával a májsejttenyészet a jövőben egy bél-máj ko-kultúra rendszer kialakításához is jó alapként szolgálhat.

Anyag és módszer

Kísérleti állatok

A sejttizoláláshoz 15 kg tömegű, magyar nagyfehér fajtájú ártány sertéseket használtunk. Az állatokat a Dunahy Kft. faddi sertéstelepéről szereztük be, és a kísérlet megkezdéséig a SZIE-ÁOTK Élettani és Biokémiai Tanszékének állatházában helyeztük el a hatályos állatvédelmi jogszabályoknak megfelelően.

Vegyszerek

Minden vegyszert, reagenst a Sigma-Aldrich Kft.-től szereztünk be (München, Németország), a kivételeket a szövegben külön jelöltük.

Előkészületek

A sejttenyészet készítésének lépéseit Puviani és Meng által már korábban kidolgozott módszer alapján terveztük meg (Puviani et al., 1998; Meng et al., 2010). A kísérlet megkezdése előtt elkészítettük a máj perfúziójához szükséges puffereket, valamint azokat a tápoldatokat, amelyek a későbbiekben a hepatocyták tenyésztéséhez nélkülözhetetlenek (tápfoliadék I., tápfoliadék II.). A különböző oldatok összetételét az **1.táblázat** mutatja.

A máj perfúziójához szükséges csöveket először 70%-os etanollal, majd steril desztillált vízzel átmossuk. Ezután következett azok – előzőleg Carbogennel (95% O₂ és 5% CO₂) átbuborékolgatott – perfúziós oldattal történő feltöltése. Az EDTA-tartalmú puffert jégbe hűtve tároltuk, az EDTA-mentes oldatot 44°C beállított vízfürdőbe helyeztük, hogy felhasználásakor a máj szöveti állományába érve épp 37°C legyen. A mosófolyadék állandó áramlási sebességét a perfúziós pumpa 100 ml/perc sebességre történő állításával biztosítottuk. Mindezek után előkészítettük a műtétéhez szükséges steril eszközöket. A kiválasztott malactól a takarmányt az izolálást megelőzően 12 órán keresztül megvontuk.

A máj aszeptikus kiemelését az állatok 2,5 mg/ttkg xylazin (CP-Xylazin 2% inj. AUV) és 25 mg/ttkg ketamin (CP-Ketamin 10% inj. AUV) kombinációval történő altatása előzte meg. A szerv kivétele utáni azonnali eutanáziát pentobarbital-injekcióval (Euthasol 40% inj. AUV) biztosítottuk 200 mg/ttkg dózisban.

EDTA-tartalmú puffer	EDTA-mentes puffer
✓ 143 mmol/l NaCl ✓ 6,7 mmol/l KCl ✓ 1 g/l EDTA ✓ desztillált víz ✓ 10 mmol/l HEPES (hozzáadás az autoklávozás után)	✓ 143 mmol/l NaCl ✓ 6,7 mmol/l KCl ✓ - ✓ desztillált víz ✓ 10 mmol/l HEPES (hozzáadás az autoklávozás után)
Emésztő puffer	
✓ 67 mmol/l NaCl ✓ 6,7 mmol/l KCl ✓ 4,8 mmol/l CaCl₂ ✓ autoklávozni ✓ 100 mmol/l HEPES ✓ pH beállítása 7,6-re ✓ 1 g/L kollagenáz IV. típus (hozzáadás közvetlenül a felhasználás előtt!)	
Tápfolyadék I.	Tápfolyadék II.
✓ William's medium E (Sigma) ✓ 15 mmol/l HEPES ✓ 0,2 NE/ml inzulin ✓ 2 mmol/l L-glutamin ✓ 10000 IU/ml penicillin ✓ 10 mg/ml sztreptomycin ✓ 10% Fetal Bovine Serum (FBS)	✓ William's medium E (Sigma) ✓ 15 mmol/l HEPES ✓ 0,2 NE/ml inzulin ✓ 2 mmol/l L-glutamin ✓ 10000 IU/ml penicillin ✓ 10 mg/ml sztreptomycin ✓ -

1. táblázat. A kísérlet során felhasznált oldatok összetétele

Májsejtek izolálása és tenyésztése

Az altatás után az állatot hanyattfekvésben rögzítettük, a hasi tájékot borotváltuk, majd 70%-os etanollal fertőtlenítettük. Medián laparotómia elvégzése után a már megnyitott hasüregben a belek és egyéb zsigerek félretolása után fertünk hozzá a májhoz, melyet a *lig. triangulare*, a *lig. falciforme hepatis*, a *lig. hepatogastricum*, a *lig. hepatoduodenale*, a *lig. hepatorenale* és a *v. cava caudalis* átvágása után emelhettünk ki a hasüregből.

A következőkben a steril alufólia fölött leválasztott hátulsó lebeny részletet (*processus caudatus*) steril tölcsérben lévő steril szűrőre helyeztük, mely alatt kezdetben nem steril edénybe gyűjtöttük az elfolyó mosófolyadékot. Az infúziós szerelékét a metszéslapon lévő nagyobb erekbe illesztettük felváltva, így biztosítva az egész lebeny teljes vértelenedését. Az izolált szervrészleten először 300 ml jéghideg EDTA-tartalmú puffert áramoltattunk át. A lépés célja, hogy az oldatban található EDTA, mint kelátképző anyag, a kalcium ionok megkötésével elősegítse a májsejtek közötti összeköttetések felbomlását. Ezt követte a 300

ml, előmelegített EDTA-mentes puffer használata. Az előbb említett elegy utolsó 100 ml-ét 100 ml emésztőpufferrel egészítettük ki. Az így kapott oldat első 50 ml-ének átáramoltatása után a máj alatt található gyűjtőedényt sterilre cseréltük és a fennmaradó 150 ml-t recirkuláltattuk addig, amíg a hepatocyták szétválását jelző márványszerű rajzolat meg nem jelent a lebeny felületén (**3. ábra**). Ez körülbelül 10 percet vett igénybe.



3. ábra. A hepatocyták szétválását jelző márványszerű rajzolat megjelent a máj felületén

A szervrészletet ezután egy steril üvegedényben jégbe hűtve steril fülke alá szállítottuk. Itt a Glisson-tok csipesszel történő felhasítása után, a szabaddá váló májsejteket a tápfolyadék I-be helyeztük. Az így kapott sejtsuszpenzió még sejtaggregátumokat és kötőszöveti részeket is tartalmazhatott, ezek eliminálásához szűrőként egy speciális 100 μm pórus méretű nylon filtert (Millipore, Volketswil, Svájc) használtunk. A művelet végrehajtásával a szűrlet közvetlenül egy 50 ml-es műanyag centrifugacsőbe került, melyet a tápfolyadék I-gyel kiegészítve 40 ml-re töltöttünk fel. A sejtsuszpenziót három alkalommal centrifugáltuk (50 g, 2 perc, 4 fok), egy-egy alkalom után a felülúszót elöntöttük, majd az üledéket 15 ml tápfolyadék I-ben műanyag pipetta segítségével reszuszpendáltuk, és az előzőekkel megegyező módon a centrifugacső tartalmát 40 ml-re egészítettük ki.

A hepatocyták tenyésztőedényekbe történő lerakása előtt meg kellett határoznunk a sejtek életképességét, valamint az összes sejtszámot. Erre a célra tripánkétet használtunk,

amely csak az elpusztult sejtek membránján képes átjutni, így megfestve azokat. Mindehhez 200 µl tripankéket adtunk előzőleg ötszöröse higított sejtszuszpenzió azonos mennyiségéhez, és a kapott elegyet Bürker-kamrában, fénymikroszkóp alá helyezve vizsgáltuk. Amennyiben az életképesség elérte a 90%-ot, a szuszpenziót a kísérlet folytatására alkalmasnak minősítettük. Továbbá a hepatocyták száma alapján meghatároztuk a szükséges hígítást, mely szerint végül a szuszpenzió koncentrációja a sejtek lerakásakor $4 \cdot 10^5$ sejt/ml lett.

A májsejtek tenyésztéséhez TC felületű, 6 lyukú (1,5 ml sejtszuszpenzió/lyuk) tenyésztőedényeket (Greiner Bio-One, Mosonmagyaróvár) használtunk. Ezek mindegyikét előzőleg kollagénnel vontuk be, hogy a hepatocyták letapadását biztosítsuk. A tenyésztőedények ily módon történő előkészítésének folyamata a következő: a kollagént (Sigma) 0,1 M ecetsavban oldottuk fel úgy, hogy 1 mg/ml koncentrációjú törzsoldatot kaptunk. Mivel a kollagén rosszul oldódik és érzékeny szerkezetű fehérje, úgy végeztük el az oldatkészítést, hogy 2-3 órán keresztül mágneses keverőn folyamatosan kevertetve duzzasztottuk. Az így nyert törzsoldatot 0,1 M ecetsavban tízszeresére hígítottuk, a kész munkaoldatot tenyésztőedényekbe pipettáztuk (1 ml/lyuk), majd egy éjszakán keresztül UV-fényben, steril fülke alatt beszáritottuk.

Ezt követően megkezdjük a májsejtek tenyésztését az inkubátor által biztosított hőmérséklet (37°C), relatív pára- (100%) és CO₂ tartalom (5%) mellett. Az első tápfolyadék-cserére 4 órás inkubációs időt követően került sor. A tenyészetek a lerakástól számított 24 óra elteltével konfluenssé váltak, amit fénymikroszkópos vizsgálattal ellenőriztünk.

Kezelés és mintavétel

24 óra inkubáció után eltávolítottuk a használt médiumot, és az egyes kezelési csoportoknak megfelelően különböző összetételű, Salmonella Typhimurium baktériumból izolált LPS-t tartalmazó kezelőoldatokra cseréltük (**2. táblázat**). Ez utóbbit 1 óra inkubáció után minden csoport esetében egységesen tápfolyadék II.-re cseréltük.

Kezelési csoportok	Kezelőoldat
Kontroll csoport	Tápfolyadék II.
LPS 1-csoport	Tápfolyadék II. + 1 µg/ml LPS
LPS 10-csoport	Tápfolyadék II. + 10 µg/ml LPS

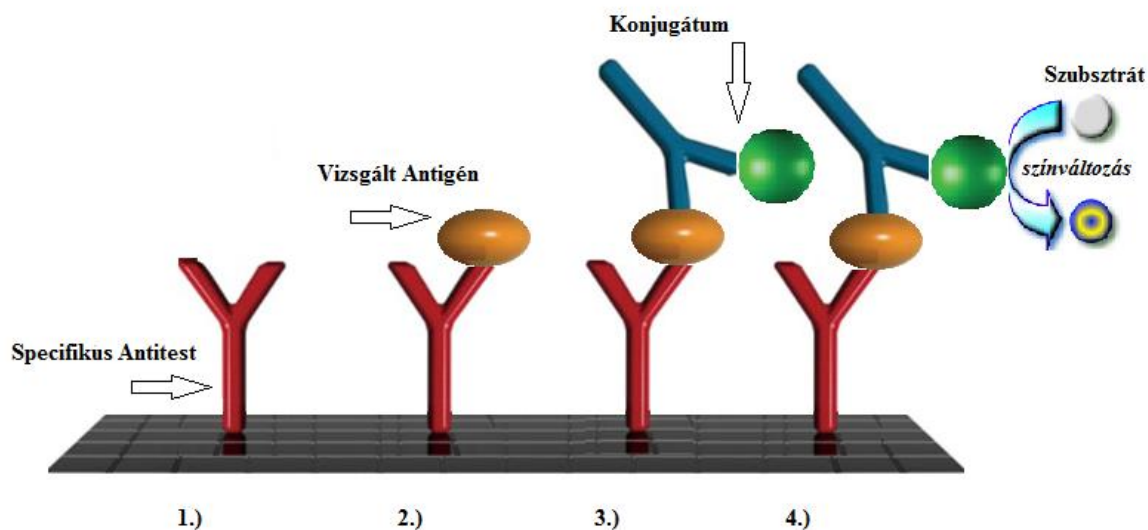
2. táblázat. Az egyes kezelő oldatok összetétele kezelési csoportonként

A mintavétel a kezelőoldatok lecserélése után 24 órával következett. A folyamat első lépéseként lyukanként külön Eppendorf csövekbe pipettáztuk a tápoldatot, majd TRI Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) segítségével lizáltuk a letapadt májsejteket. A mintákat további vizsgálatokig -80°C-on tároltuk. Ennek során meghatároztuk a tápfolyadék albumin és IL-8 tartalmát szendvics ELISA segítségével, valamint qRT-PCR használatával vizsgáltuk a hepatocyták mikroszómális citokróm P450 (CYP) enzimeinek génexpresszióját. Az említett vizsgáló módszerek a továbbiakban kerülnek részletes ismertetésre.

Szendvics ELISA

Ez a módszer az egyik leggyakrabban használt szerológiai próbák egyike. Mint a többi ELISA-eljárás, adott antigén kimutatására és mennyiségi meghatározására alkalmas (léteznek ellenanyag detektálására alkalmas változatok is).

Lényege egy szilárd fázison lejátszódó antigén-ellenanyag reakció, mely az antitesthez kapcsolt enzim és a hozzáadott szubsztrát segítségével követhető nyomon. Az eredmény egy színreakció, mely szabad szemmel és fotométerrel is értékelhető. A kapott szín intenzitása a rendszerben megkötött, enzimmal jelölt ellenanyag (=konjugátum) mennyiségével arányos. Az általunk választott módszer, a hasonlóan antigén kimutatására alkalmas, direkt-ELISA eljárásnál jóval érzékenyebb. Ennek oka, hogy e próba során kétféle ellenanyagot is alkalmaznak, melyek közös tulajdonsága, hogy a keresett antigént egyaránt kötni képesek. Az egyik típus ezen kívül a lemezhez (szilárd fázis) is kapcsolódik, a másik pedig a konjugátum részeként vesz részt a reakcióban (**4. ábra**).



4. ábra. A szendvics ELISA sematikus ábrázolása (szerkesztve az alábbi forrás alapján: <http://www.antikoerper-online.de/images/news/Sandwich%20ELISA.JPG.png>)

Az általunk végzett eljárás során speciális, anti-sertés albuminnal bevont 96 lyukú lemezeket alkalmaztunk (**4. ábra/1.**). A már említett antigénnek, a tápoldatok albumin, illetve IL-8 tartalma felelt meg. Albumin kimutatásához „porcine-specific albumin ELISA Kitet” (Alpha Diagnostic International, San Antonio, USA); IL-8 esetében pedig „porcine-specific IL-8 ELISA Kitet” (Invitrogen) használtunk. A próba elvégzésének lépéseit a továbbiakban részletezem.

Az eljárás során minden egyes reagenst szobahőmérsékleten alkalmaztunk. Először a vizsgálandó minta (tápfolyadék) és a mosófolyadék megfelelő koncentrációra történő hígítását végeztük el. Az utóbbi oldat funkciója, az egyes lépések között a reakcióba már nem lépő, a rendszerben feleslegben maradt reagensek eltávolítása, megakadályozva ezzel a hamis, valótlannul magas koncentráció-értékek jelentkezését a mérés során. A következő lépésben 100 µl hígított mintát pipettáztunk az előre meghatározott lyukakba (**4. ábra/2.**). A viszonyítási alapul szolgáló standardeből (sertés szérum, melynek albumin koncentrációja hígítással vagy tisztított sertés albumin hozzáadásával előre beállított: 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml) és a pozitív kontrollból (kezeletlen sertés szérum, melynek albumin koncentrációja: 33 ng/ml) ugyanekkora mennyiségeket mértünk az üresen maradt helyekre. Az alkalmazott inkubációs idő mindegyik esetben 60 perc volt. Ezután a mosás következett, melyet a gyártó előírása szerint négyszer ismételtünk meg a pontos eredmény érdekében.

Száritás után minden lyukba 100 µl adagoltunk a közvetlenül a használat előtt 100x-ra hígított anti-sértés albumin-HRP-nek (HRP=horseradish peroxidase) nevezett reagensből, melynek a reakcióban szerepet játszó komponensét peroxidázzal konjugált anti-sértés albumin alkotta (4. ábra/3.). Az inkubáció ebben az esetben 30 percig tartott, és a kromogén szubsztát lyukakba mérése követte (100 µl/lyuk) (4. ábra/4.). Utóbbi reakcióelegy tetrametil-benzidint és hidrogén-peroxidot tartalmazott. Alkalmazásakor – a negatív kontroll kivételével – kék színreakciót tapasztaltunk (inkubációs idő: 15 perc). Záró lépésként az enzim katalizálta folyamatok leállítása érdekében gátlóoldatot adtunk minden reakcióelegyhez, melynek következtében azok színe sárgára változott. Ezután az egyes lyukakban található elegyek abszorbanciáját ELISA leolvasó segítségével meghatároztuk (415 nm), melyből a standard sor segítségével számítással meghatároztuk a koncentrációt.

A próbát az előzőekhez hasonlóan végeztük el a tápfolyadék IL-8 tartalmának vizsgálata esetén is. Különbség csak az alkalmazott anyagok minőségében figyelhető meg, hiszen itt a lemez IL-8 specifikus antitestekkel lett előzőleg bevonva, és a használt konjugátum anti-sértés-IL-8-HRP volt.

Kvantitatív real-time PCR

Ezzel a módszerrel meghatározott génszakaszok vagy a róluk íródott RNS molekulák mutathatók ki, munkánk során a májsejtek CYP enzimjeinek génexpresszióját vizsgáltuk a segítségével. Az eljárás lényege, hogy az eredetileg kis mennyiségben jelenlevő célmolekulák megsokszorozása után, azok fluoreszcens detektálással kimutathatóvá válnak.

Első lépésben az általunk vizsgálni kívánt RNS-tartalom kivonását végeztük el. Ez részben megtörtént, amikor TRI Reagent segítségével leoldottuk a sejteket a tenyésztőedények felületéről. Ez a speciális oldat fenolt és guanidin-izotiocianátot tartalmaz, a sejtet, valamint a sejtalkotókat roncsolja, de az RNS-t védi. A mintákhoz kloroformot adtunk, és a kapott elegy 5 perces, 4°C-on történő inkubációja után centrifugáltuk azokat (1200g, 15 perc, 4°C). Ennek eredményeként a centrifugacsövek tartalma 3 rétegre különült el: alsó, hidrofób színes fázisra, mely fenolt és kloroformot tartalmazott; intermedier fázisra, valamint felső, színtelen, hidrofíl fázisra. Ez utóbbiban található az izolálandó RNS, így pipettor segítségével ezt elkülönítettük az alsóbb rétegektől, majd a következő lépésben izopropil-alkoholt adtunk hozzá, melynek hatására az elegy ribonukleinsav tartalma kicsapódott. A metódust 1 órás inkubáció követte -80°C-on, majd a mintákat centrifugáltuk (1200g, 10 perc, 4°C). Ez utóbbi eredményeképpen az RNS fehér pelletként jelent meg a csövek alján.

A következőkben a már izolált RNS tisztítása volt a feladatunk. Ehhez -20°C -os, 75%-os etanolt használtunk, és a reakcióelegyet ismét centrifugáltuk, ezúttal 7500g-n, 5 percig, 4°C -on. Ezután szárítottuk, majd 50 μl RNáz-mentes vízben feloldottuk az izolátumokat. A mintánk esetleges exogén eredetű, vagy a hepatocytákból származó saját DNS-szennyeződését Amplification Grade DNase I (Sigma-Aldrich, Steinheim, Németország) emésztőpuffer segítségével eltávolítottuk. A reagensben lévő DNáz gátlását speciális leállító oldat hozzáadásával végeztük el, majd 70°C -os, 10 perces hőkezeléssel denaturáltuk is a már inaktivált enzimet.

Az izolált RNS mennyiségét és tisztaságát (A_{260}/A_{280} és A_{260}/A_{230} arány) NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (Thermo Scientific, Wilmington, USA) határoztuk meg. Ez a lépés fontos, mert a minta a vizsgált nukleinsav (A_{260}) mellett tartalmazhat szénhidrátokat, szerves oldószereket (A_{230}), valamint különféle fehérjéket (A_{280}), melyek jelenléte az eredményeket torzíthatja. Mivel a polimeráz láncreakció során DNS dependens DNS polimeráz enzimet alkalmaztunk, ezért a vizsgálandó RNS-t először át kellett írunk a polimeráz enzimmal kompatibilis ún. cDNS-é. Ezt RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St. Leon-Roth, Németország) segítségével hajtottuk végre.

A kvantitatív real-time PCR vizsgálatokat az iQ SYBR Green Supermix kit (BioRad, Hercules, CA, USA) felhasználásával végeztük el; a reakciókat a MiniOpticon System (BioRad) nevű készüléken futtattuk le.

A vizsgált célgének a következők voltak: CYP1A1, CYP1A2 és CYP3A29. Referencia génként hipoxantin-foszforibozil transzferázt (HPRT) és cyclophilin-A-t (CycA) használtunk. A PCR-ekben templátként szolgáló cDNS-ből, alkalmazása előtt ötszörös hígításokat készítettünk. A PCR reakcióhoz szükséges elegy tartalma mintánként: 2,5 μl cDNS, 0,2 μmol a megfelelő primerekből, valamint 1x iQ SYBR Green Supermix (végtérfogat 25 μl). A különböző primer párok szekvenciája a **3. táblázatban** található.

Vizsgált gén	Primer szekvencia
CYP1A1	F 5'-CAGAGCTGCTTAGCCTTATCAACC-3' R 5'-CTGGATGCTGGGATTTGTCACCAG-3'
CYP1A2	F 5'- GTGAGGAGATGTTTCAGCATCGTGAAG-3' R 5'- CTTCTGTATCTCAGGATATGTCACA-3'
CYP3A29	F 5'- TTCGTGCTTCACAGAGAGACCC-3' R 5'-TACTAGGTGGGGGTGGATGG-3'
HPRT	F 5'-GGACTTGAATCATGTTTGTG-3' R 5'-CAGATGTTTCCAAACTCAAC-3'
CycA	F 5'-GCGTCTCCTTCGAGCTGTT-3' R 5'-CCATTATGGCGTGTGAAGTC-3'

3. táblázat. A kísérletben vizsgált gének primer párjainak szekvenciája (*F=forward primer*, *R=reverse primer*)

A PCR a következő hőprofil szerint folyt:

- denaturációs lépés: 3 perc 95°C
- 40 ciklus (20 sec 95°C, 30 sec 60°C, 30 sec 72°C)

Minden egyes ciklus végére beiktattunk egy 10 sec hosszú leolvasási lépést, mely során a készülék meghatározta valamennyi minta fluoreszcenciáját. Ennek lehetőségét az teremtette meg, hogy az előzőleg alkalmazott SYBR Green festék a kettős szálú DNS molekulához kötött és megfelelő hullámhosszú (520 nm) gerjesztő fény hatására fluoreszkált.

A reakció specificitását olvadáspont analízis segítségével ellenőriztük. A vizsgálat alapja, hogy a keletkezett PCR termék olvadáspontját annak C-G bázispár-aránya, valamint a hossza befolyásolja, így adott típusú DNS-hez mindig kizárólag egy, a szerkezeti sajátosságaiból következő olvadáspont érték tartozik. Tehát, ha az analízis során egy olvadáspontot kapunk eredményül, az azt jelenti, hogy kizárólag egy termék képződhetett a PCR reakcióban.

A specificitás mellett a hatékonyság is ellenőrizendő paraméter. Ez utóbbi a legtöbb esetben nem 100%-os, ami azt jelenti, hogy a templát DNS megkettőződése egyes ciklusokban nem teljes. Megállapításához szükség van az úgynevezett Ct értékek meghatározására minden cél- és referencia gén esetében. Ez tulajdonképpen azt a ciklusszámot jelöli, melynél a fluoreszcens jel exponenciális növekedést mutat. Ebben a tartományban lesz a legnagyobb a PCR hatékonysága, ugyanis itt a templát mennyisége minden ciklusban biztosan megkétszereződik. A kapott Ct értékeket a kiindulási cDNS mennyiségének ($\log_{10}$) függvényében ábrázolva a pontok egy egyenesre esnek. Az egyenes meredekségének ismeretében a PCR-ek hatékonyságát a következő képlet segítségével számoltuk ki: $E=10^{(-1/m)}-1$, ahol E a PCR hatékonysága, m pedig az egyenes meredeksége. A Ct-érték fordítottan arányos a kezdeti templát cDNS számának logaritmusával. Minél nagyobb mennyiségű cDNS van a mintában, annál hamarabb detektálható a keletkezett termék, és csökken a Ct érték. Ez alapján a Ct érték segítségével a szoftver meghatározza a relatív génexpresszió értékét.

Statisztika

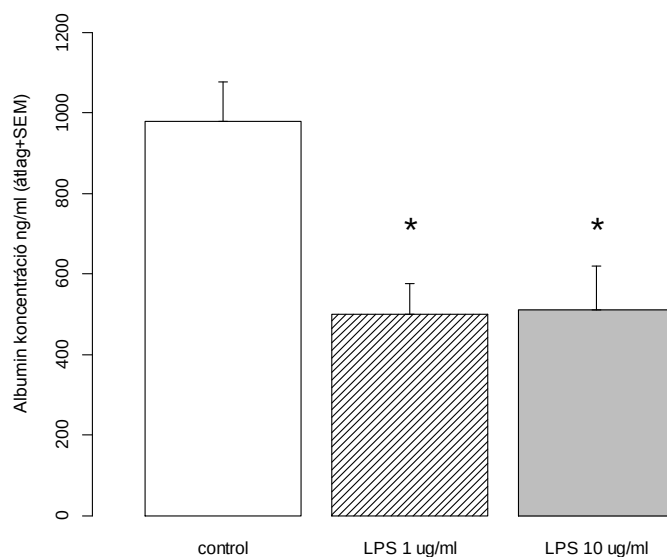
A vizsgált célgének relatív génexpresszió szintjét a Relative Expression Software Tool (REST) 2009 (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) segítségével határoztuk meg. Az egyéb adatok feldolgozását az R-program 2.14.0 verziójának használatával végeztük el. Az átlagok közti különbséget, normál eloszlású alapsokaság esetén „egy-utas” vagy „két-utas” ANOVA segítségével becsültük meg. A kezelt és kezeletlen (=kontroll) csoportok összehasonlításához post-hoc tesztekkel végeztünk (Dunnett-teszt). Szignifikáns különbséget $P<0,05$, trendszerű változást pedig $0,05<P<0,10$ eredmény esetén állapítottunk meg. Minden eredményt átlag $\pm$ standard hiba alakban fejeztünk ki.

Eredmények

Szendvics ELISA

A tápfolyadék albumintartalma

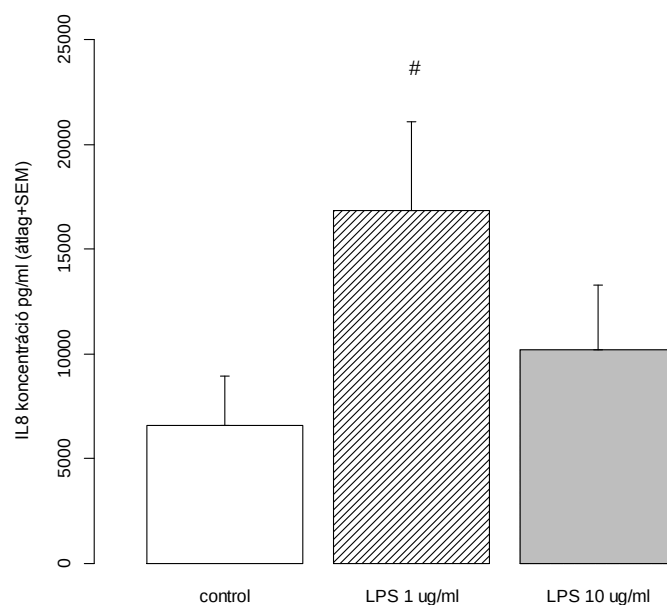
A tápfolyadékból történő albuminkoncentráció-meghatározás eredményei alapján a májsejtek által termelt albumin mennyisége mindkét alkalmazott LPS kezelés hatására szignifikánsan csökkent. (1 $\mu\text{g/ml}$ $P=0,038$; 10 $\mu\text{g/ml}$ $P=0,041$) Ennek ellenére mind a kontroll, mind a kezelt hepatocyták albumintermelése a vizsgálati modellnek megfelelő vitalitású tenyészeteket mutatott (5. ábra).



5. ábra. A tápfolyadékok albumintartalma (*jelentése: $P=0,01-0,05$)

A tápfolyadék IL-8 tartalma

A hepatocyták IL-8 termelése az alacsonyabb dózisú LPS-stimulus hatására trendszerűen emelkedett ($P=0,073$), a magasabb LPS-dózis esetében azonban nem tapasztaltunk szignifikáns változást ($P=0,637$) (6. ábra).



6. ábra. A tápfolyadékok IL-8 koncentrációja (#jelentése: $P=0,05-0,1$)

Kvantitatív real-time PCR

CYP1A1 génexpresszió

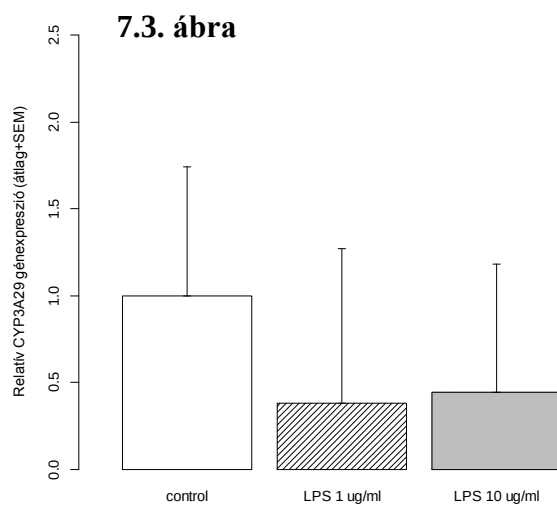
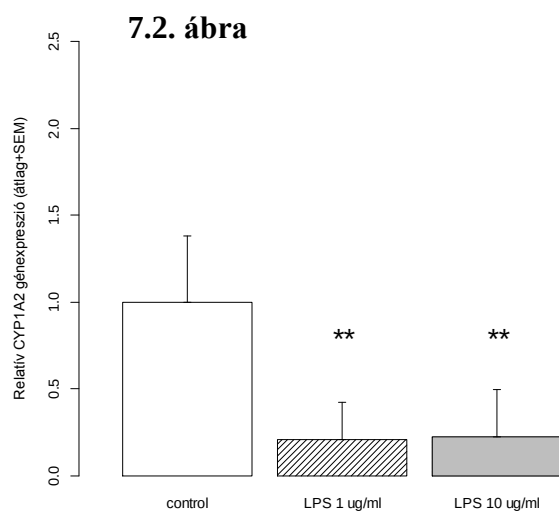
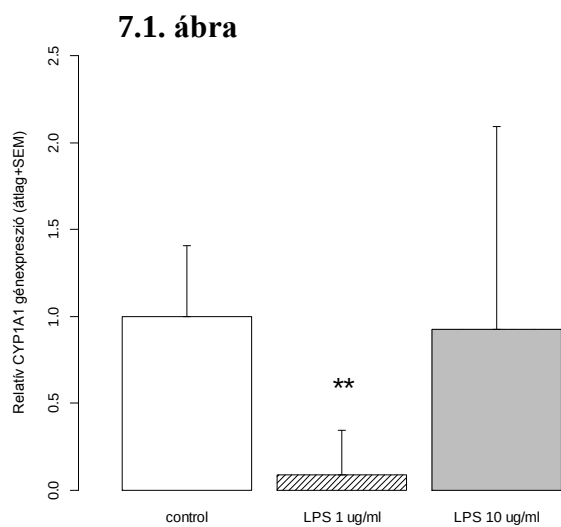
A kvantitatív real-time PCR eredményei alapján a CYP1A1 génexpresszió szignifikáns csökkenést mutatott az 1 µg/ml-es LPS kezelés hatására ($P=0,009$), míg ez a hatás a nagyobb koncentrációban alkalmazott LPS-stimulust követően nem jelentkezett ($P=0,811$) (7.1. ábra).

CYP1A2 génexpresszió

E CYP enzim esetében mindkét alkalmazott LPS koncentráció hatására szignifikáns génexpresszió-csökkenést tapasztaltunk (1 µg/ml esetén $P=0,046$; 10 µg/ml esetén $P=0,021$) (7.2. ábra)

CYP3A29 génexpresszió

A CYP3A29 enzimet kódoló RNS mennyisége mindkét LPS kezelés hatására csökkenő tendenciát mutatott, ám ez a változás egyik esetben sem volt szignifikáns (1 µg/ml esetén $P=0,278$; 10 µg/ml esetén $P=0,172$) (7.3. ábra)



7. ábra. A májsejtek relatív CYP1A1 (7.1.), CYP1A2 (7.2.) és CYP3A29 (7.3.) génexpressziója LPS kezelés hatására (** jelentése: $P=0,01-0,001$)

Megbeszélés

A szervezetet folyamatosan terhelő exogén és endogén eredetű káros anyagokkal szemben számos hatékony védekező rendszer alakult ki. Ezek között említhetjük a gyulladás folyamatát, melynek célja optimális esetben a kórok eliminálása és a regeneráció. Minden gyulladásos reakció során, a kiváltó októl függetlenül, hasonló folyamatok zajlanak le. Az érintett sejtekből mediátor molekulák sokasága szabadul fel, melyek parakrin módon hatást gyakorolnak a környező, majd a vérpályába jutva a kiindulási ponttól egészen távoli sejtek működésére is. Az immunválasz részeként létrejövő gyulladásos reakció *in vitro* tanulmányozásának egyik fontos módja a különféle sejtenyészetek bakteriális eredetű lipopoliszachariddal (LPS) történő kezelést követő vizsgálata (Morgan, 2001), így a kutató csapatunk által végzett kísérlet során is ezt a módszert alkalmaztuk. Azok a mikroorganizmusok, melyek sejtfala LPS-t tartalmaz, fiziológiás esetben is megtalálhatók a belekben, így az általuk keltett stimulus gyakorlatilag folyamatosan éri az *intestinalis epithelt* és az immunsejteket, állandó készenléti állapotban tartva azokat. Ez a mechanizmus a bélbeli patogénnel szembeni védekezés fontos része. Probléma akkor jelentkezik, ha valamiért a már említett mikroorganizmusok túlzott mértékben elszaporodnak, például fertőzés vagy hosszantartó antibiotikus kezelés hatására. Ebben az esetben a lokálisan nagyobb mennyiségben termelt gyulladásos citokinek, mint a Tumor Necrosis Faktor-alfa (TNF-alfa), interleukinok (IL), interferonok (IFN) hatására a bélhámsejtek közötti *zonula occludens* (tight junction) kapcsolatok gyengülnek, majd helyenként meg is szakadnak. Ezt követően a baktériumok sejtfalából felszabaduló LPS, valamint az epithel által termelt citokinek a vérkeringésbe jutva, a *v. portae* közvetítésével, elsőként a máj állományába érve, az itt található sejtekre fejtenek ki hatást.

A kérdés az, hogy egy-egy gyulladásos reakció termékei milyen mértékben és minőségben képesek befolyásolni az érintett sejtek (vizsgálatunk esetében: hepatocyták) működését. Korábbi kutatásokhoz hasonlóan, mi is erre kerestük a választ az általunk végzett kísérlet eredményeinek elemzésével.

Elsőként a levett tápfolyadék albumintartalmát határoztuk meg a tenyészetek életképességének valamint a metabolikus aktivitásának jellemzése céljából. A kezelt minták koncentrációja a kontrollcsoportokéhoz képest szignifikánsan csökkent, ez a változás megfelel a korábbi kutatások során, mások által mért értékeknek (Behnia et al., 2000). A

csökkenés ellenére mind a kontroll, mind a kezelt hepatocyták albumintermelése a vizsgálati modellnek megfelelő vitalitású tenyészeteket mutatott.

A gyulladásos folyamatok jellemzése céljából, különböző stresszhatásnak kitett (például Salmonella Typhimuriumból származó LPS, H₂O₂) tenyészetek Interleukin-8 (IL-8) termelésének változásait korábban is kutatták, ám ezeket a vizsgálatokat főként különféle bélhámsejt vonalakon végezték el (Arce et al., 2010; Paszti-Gere et al., 2012; Angrisano et al., 2010). A korábban tapasztaltakat alátámasztják az általunk, hepatocytákon végrehajtott kísérlet eredményei, mivel a kisebb LPS dózis (1 µg/ml) alkalmazása esetén, a tápfolyadék IL-8-tartalma a kontrollhoz képest trendszerű emelkedést mutatott. Tehát bakteriális stimulus hatására májsejtekben, a bélhámsejtekhez hasonlóan, egy *in vitro* körülmények között generált gyulladásos reakció vette kezdetét. Érdekes, hogy az ennek megfelelően várt markáns IL-emelkedés helyett csak trendszerű növekedést tapasztaltunk, illetve a 10 µg/ml LPS-kezelés esetén nem kaptunk különbséget. Ezen eltérés hátterében feltételezhetően többek között az áll, hogy a bélhám által termelt citokinek hiányában, kizárólag az LPS direkt hatását vizsgálva, nem olyan kifejezett az emelkedés, hiszen a felszívódott és a májba jutó LPS, valamint a bél által termelt citokinek egyaránt szükségesek a megfelelő IL-válasz kiváltásához (Pászti-Gere et al., 2013).

A következő lépésben a hepatocyták citokróm P450 (CYP) enzimjeinek génexpresszióját határoztuk meg qRT-PCR segítségével. Vizsgálataink a CYP1A1, CYP1A2 és CYP3A29 monooxygenázokra terjedtek ki. Választásunk azért esett épp ezekre az izoenzimekre, mert a különböző testidegen anyagok (xenobiotikumok) lebontásában leggyakrabban a CYP1, CYP2 és CYP3 családba tartozó mikroszómális detoxifikáló enzimek vesznek részt (Jacobs et al., 2000; Baader et al., 2002).

	LPS 1 µg/ml	LPS 10 µg/ml
IL-8 koncentráció (a kontrollhoz képest)	trendszerű emelkedés	szignifikáns eltérés nem mutatható ki
CYP1A1 génexpresszió (a kontrollhoz képest)	szignifikáns csökkenés	szignifikáns eltérés nem mutatható ki
CYP1A2 génexpresszió (a kontrollhoz képest)	szignifikáns csökkenés	szignifikáns csökkenés
CYP3A29 génexpresszió (a kontrollhoz képest)	szignifikáns eltérés nem mutatható ki	szignifikáns eltérés nem mutatható ki

4. táblázat. A májsejtek IL-8 produkciójának és CYP génexpressziójának kontrollhoz viszonyított változása LPS kezelés hatására

A fenti táblázatban (**4. táblázat**) is jól látható, hogy az alacsonyabb LPS dózis hatására a májsejtek CYP1A1 és CYP1A2 génexpressziója csökkent. Utóbbi CYP enzim esetében, ez a változás a nagyobb koncentrációban alkalmazott LPS-stimulust követően is jelentkezett, míg ugyanez a CYP1A1-ről már nem mondható el. A gyulladásos, szeptikus folyamatok CYP génexpresszióra gyakorolt hatásáról, eredményeink és a rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján elmondható, hogy ez a hatás általában szupresszív jellegű, ám sok egyéb tényező befolyásolja, ezért a különféle kísérletekben kapott eredmények sokszor ellentmondóak (Warren et al., 1999; Siewert et al., 2000). Kutatásunk során tehát igazoltuk, hogy egy antigén természetű anyaggal, az LPS-sel indukált gyulladásos reakció, a máj már említett CYP enzimeire szupresszív módon hat. Az viszont még kérdéses, hogy a gyulladást generáló exogén (vagy akár endogén) anyag koncentrációja hogyan befolyásolja a hatás minőségét, ugyanis bizonyos esetben a génexpresszió az alkalmazott LPS dózistól függetlenül (CYP1A2, CYP3A29), máskor azzal összhangban változott (CYP1A1).

További problémát vet fel az enzimszupresszió és a sejtek megnövekedett IL-8 szekréciójának kapcsolata. Irodalmi adatok alapján az IL-8, mint gyulladásos citokin módosíthatja a CYP-ek működését (Morgan, 2000), ám eredményeink ezt nem támasztják alá egyértelműen, ugyanis a CYP1A1 kivételével egyik enzim esetében sem figyelhető meg egyértelmű kapcsolat az IL-8 koncentráció emelkedése és a CYP génexpresszió változása között. Például a CYP1A2 esetében szignifikáns génexpresszió csökkenést tapasztaltunk az alacsonyabb és a nagyobb LPS dózis alkalmazásakor is, annak ellenére, hogy az IL-8 koncentráció csak a kisebb alkalmazott LPS koncentráció esetében mutatott eltérést a kontrollcsoporthoz viszonyítva. Ez a jelenség bonyolítja az interleukinok CYP-ekre gyakorolt hatásának megértését, ám bizonyítja, hogy a CYP-ek gyulladásos reakció során létrejövő szupressziója nem csupán a citokineknek köszönhető, hanem közvetlenül a gyulladást kiváltó antigéntermészetű molekulák jelenlétének is (Morgan, 2000). A CYP3A29 génexpressziót vizsgálva nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést (a kontroll-csoporthoz képest) egyik LPS kezelés esetében sem. Mivel ugyanezen CYP alcsalád enzimeivel, patkányokon végzett kutatások is hasonló eredményre vezettek (Sewer et al., 1997), valószínűsíthető, hogy a szóban forgó enzim működését sem a gyulladásos folyamat induktora, sem a mediátorai nem befolyásolják.

A CYP enzimek szerepe nélkülözhetetlen a szervezetet folyamatosan terhelő xenobiotikumok biotranszformációjában. Tehát mindazon folyamat, köztük egy a szervezetben kialakuló gyulladás, mely szupresszálja működésüket, jelentősen megváltoztatja a terápiás célból alkalmazott gyógyszerek, illetve különböző endogén szubsztátok

metabolizmusát is. Ezáltal az előbb említett szerek farmakokinetikai paramétereit megváltozhatnak, emelve az alkalmazott hatóanyag terápiás indexét, valamint csökkentve a terápia biztonságosságát. Tovább nehezíti a különböző, CYP enzimeken bomló szerek megfelelő dózisének beállítását, hogy bizonyos xenobiotikumok egyszerre több típusú CYP enzimmel képesek különböző jellegű interakcióba lépni. Például a phenytoin (antiepileptikum), a CYP2C9 által metabolizálódik, de a CYP3A4,5, 7 enzimek induktora is egyben. Így ha ezzel a hatóanyaggal párhuzamosan olyan szert alkalmazunk, mely utóbbi enzimek katalizálta reakció során bomlik (például a kalciumcsatorna-blokkoló verapamil, a központi idegrendszerre ható diazepam vagy a makrolid antibiotikumként használt erythromycin), a terápiás hatás nem a gyártó által megadott dózis alkalmazása esetén fog jelentkezni (Gálfi et al., 2010). Fontos továbbá, hogy többek között az előbbieken tárgyalt okokra visszavezethető enzimgátlás módosíthatja az élelmezés-egészségügyi várakozási idő hosszát is. Mindezek figyelembevétele azért különösen fontos, mert sok gyógyászati célból használt xenobiotikumot (gyulladáscsökkentők, antibiotikumok) olyan állaton alkalmaznak, melynek szervezetében a kórokat eliminálni igyekvő gyulladásos folyamatok épp aktívan zajlanak. Tehát a gyulladásos reakciók különböző CYP-ekre gyakorolt hatásának pontos ismerete nélkülözhetetlen az egyes gyógyszerek hatékonyságának, valamint toxicitásának meghatározásához, illetve figyelembe kell venni az élelmezés-egészségügyi várakozási idő megállapításánál is.

Vizsgálataink folytatásaként a Puviani és Meng módosított protokollja (Puviani et al., 1998; Meng et al., 2010) alapján létrehozott, működőképes, homogén primer májsejtenyészet alkalmas lehet az LPS mellett különféle gyulladásgátló anyagok sejtekre gyakorolt hatásainak vizsgálatára. Így a kapott eredmények gondos elemzésével, hasznos információkhoz juthatunk a szisztémás gyulladásos folyamatok kezelésére szolgáló hatóanyagok, így a hagyományos antimikrobiális és gyulladásgátló farmakonok alternatívájaként alkalmazható szerek hatékonyságát illetően. Mindezen felül a primer májsejtenyészet egy bél-máj kokultúra rendszer kialakításához is jó alapként szolgálhat.

Összefoglalás

Különféle stresszorok, így a Gram-negatív baktériumok sejtfalából felszabaduló lipopoliszacharidok (LPS) akut vagy krónikus gyulladás kialakulását okozhatják. Ilyenkor a stresszhatás alatt álló sejtek nagy mennyiségben termelnek gyulladásos mediátorokat, elsősorban citokineket, így az általunk is vizsgált interleukin-8-at (IL-8). A bélhámsejtek által termelt gyulladásos mediátorok és a felszívódó LPS a *v. portae*-n keresztül a májba jutnak, így a belekben helyileg jelentkező elváltozás szisztémás jellegű gyulladásná alakulhat.

Munkánk során épp ezért, a már említett baktérium eredetű LPS májra kifejtett hatásait kutattuk sertés primer májsejttenyészetben, mint *in vitro* rendszeren. A májsejtek életképességére azok albumintermelése, míg a gyulladásos folyamatokra a tápfolyadék IL-8-koncentrációja engedett következtetni. Továbbá vizsgáltuk a hepatocyták mikroszomális citokróm P450 (CYP) enzimjeinek génexpresszióját is, melyeknek fontos szerepük van a szervezetet terhelő xenobiotikumok biotranszformációjában.

A hepatocytákat 15 kg tömegű, magyar nagyfehér fajtájú, ártány sertésekből izoláltuk. A máj aseptikus kiemelését követően a *processus caudatus*-t leválasztottuk, majd az izolált lebenyt több lépcsőben (EDTA tartalmú-, majd EDTA-mentes, ill. kollagenázzal kiegészített pufferekkel) perfundáltuk, melynek eredményeként a májsejtek szabaddá váltak. Ezt követően a hepatocytákat FBS (foetal bovine serum) - tartalmú sejttenyésztő médiumban (Williams' Medium E) vettük fel. A sejteket előzőleg kollagénnel bevont, 6 lyukú lemezekben tenyésztettük ($6 \cdot 10^5$ sejt/lyuk), ahol 24 órás inkubációt követően konfluenssé váltak.

A továbbiakban a tenyészeteket *Salmonella typhimurium* eredetű LPS-sel (1 és 10 $\mu\text{g/ml}$) kezeltük 1 órán keresztül. Huszonnégy óra elteltével leszívtuk a tápfolyadékot és szendvics ELISA segítségével meghatároztuk a médium albumin és IL-8 tartalmát. Emellett a hepatocytákat TRI Reagent segítségével lizáltuk, és qRT-PCR segítségével vizsgáltuk a CYP enzimek génexpresszióját.

A kezelést követő 24 óra után az albuminkoncentráció mindkét alkalmazott LPS kezelés hatására szignifikánsan csökkent a kontroll csoporthoz viszonyítva. A hepatocyták IL-8 produkciója az alacsonyabb LPS dózis hatására trendszerű növekedést mutatott. A májsejtek CYP1A1 és CYP1A2 enzimeinek génexpressziója szignifikáns csökkenést mutatott az 1 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú LPS kezelés után, míg a CYP3A29 génexpresszió nem változott a kontroll csoporthoz képest. A CYP3A29 és a CYP1A1 esetében sem figyelhettünk meg

számottevő változást a magasabb LPS dózis alkalmazása után, a CYP1A2 génexpresszió viszont szignifikánsan csökkent ugyanezen kezelés hatására.

Kutatásunk eredményei igazolják, hogy az általunk alkalmazott sertés primer májsejttenyészet megfelelő modell a különféle gyulladásos folyamatok tanulmányozásához. Kimutattuk, hogy a bakteriális LPS szignifikánsan csökkenti egyes CYP enzimek génexpresszióját, ezen hatás azonban az alkalmazott LPS-koncentrációtól, illetve a vizsgált izoenzim típusától függően eltéréseket mutat. A jövőben ugyanezen modellen az LPS mellett különféle gyulladásgátló anyagok (probiotikus baktériumok és n-butirát) sejtekre gyakorolt hatásait is szeretnénk elemezni. A szerzett tapasztalatok felhasználásával pedig a májsejttenyészet egy bél-máj ko-kultúra rendszer kialakításához is jó alapként szolgálhat.

Summary

Stress factors, such as release of lipopolysaccharides (LPS) of Gram-negative bacteria can lead to formation of acute and chronic inflammation. In this case, the inflammatory mediators produced by the cells under stress, first of all cytokines – such as interleukin 8 (IL-8) – are produced in larger quantities. The inflammatory mediators produced by the enterocytes and the absorbed LPS can easily enter the liver through the portal vein, where they can induce the activation of a new inflammatory cascade. In this way, a local intestinal process can develop into a systemic inflammation.

In our work, therefore, we examined the effects of bacterial LPS on the liver in a culture of pig liver cells, which served as an *in vitro* system. We were able to determine the viability of the liver cells based on their albumin production, and the state of the inflammatory processes by the concentration of IL-8 in the culture medium. We also examined the gene expression of the microsomal cytochrome P450 (CYP) enzymes of the hepatocytes, which have an important role in the biotransformation of the xenobiotics.

For the cell isolation, 15-kg castrated male pigs of the Hungarian large white breed were used. After aseptical excision of the liver, the *processus caudatus* was removed. The isolated tissue was then perfused in multiple stages (using buffers first with, then without, EDTA, subsequently supplemented by collagenase), as a result of which the liver cells were dissociated. The hepatocytes were then resuspended in a cell culture medium (Williams' Medium E) containing FBS (foetal bovine serum) and were cultured using a collagen-coated, six-well plate (6×10^5 cells/well) for 24 hours, after which the cell cultures were confluent in every case.

The samples were then exposed to LPS extracted from the cell membrane of *Salmonella typhimurium*, with differing concentrations (1 és 10 µg/ml), for one hour. After 24 hours, the culture medium was removed, and the ELISA method was used to determine the medium's albumin and IL-8 content. The hepatocytes were also lysed using TRI Reagent, and qRT-PCR was used to examine the gene expression of CYP enzymes.

Albumin concentration corresponding to intact hepatocytes was significantly reduced 24 h after LPS treatment with either of the two concentrations of LPS. IL-8 production of hepatocytes tended to be increased by the lower dose of LPS treatment. CYP1A1 and CYP1A2 gene expression of hepatocytes was significantly decreased after exposure to 1 µg/ml LPS, but CYP3A29 was not altered. No significant difference could be found between

10 µg/ml LPS-stimulated and control cells concerning the expression of hepatic CYP1A1 and CYP3A29 genes, however, CYP1A2 was down-regulated after treatment with the applied higher LPS concentration.

Based on our results, the cell culture we applied is an appropriate model for the study of various inflammatory processes. It was found in the present study that gene expression of various CYP enzymes can be reduced by bacterial LPS, which is in agreement with literature data. However, this effect may vary depending on the applied LPS concentration and examined isoenzyme. In the future, this model is suitable to examine the effects of anti-inflammatory substances besides LPS, such as *Lactobacillus plantarum* and n-butyrate, on cells. Furthermore, the applied liver cell culture will serve as a good basis for the development of a novel enterohepatic co-culture model.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom a tudományos diákköri dolgozatom létrejöttéhez elengedhetetlen közreműködéséért, kitartó lelkesítéséért és fáradhatatlan segítségnyújtásáért témavezetőimnek, Dr. Mátis Gábornak és Kulcsár Annának. Dr. Neogrády Zsuzsanna tanárnőnek hálásan köszönöm a kísérletek elvégzésében nyújtott segítségét, állandó támogatását és munkánk folyamatos koordinálását.

A Gyógyszertani és Méregtani Tanszékről köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Gálfi Péter tanár úrnak, hogy folyamatos szakmai segítséget nyújtott munkánkhoz. Külön köszönettel tartozom Dr. Farkas Orsolyának és Palócz Orsolyának, akik segítségével kísérletünk eredményei nem születhettek volna meg, továbbá Dr. Csikó György egyetemi docens úrnak, hogy hasznos tanácsaival és támogatásával segítette munkánkat. A kísérletek elvégzésében nyújtott szíves segítségéért őszinte hálával tartozom Kulcsárné Dr. Petrilla Jankának.

Köszönöm Prof. Dr. Frenyó V. László tanszékvezető egyetemi tanár úrnak, hogy bekapcsolódhattam a tanszéki kutatómunkába, és az Élettani és Biokémiai Tanszék valamennyi munkatársának a közreműködését.

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 pályázat** volt segítségünkre.

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

Irodalomjegyzék

- ANGRISANO, T., PERO, R., PELUSO, S., KELLER, S., SACCHETTI, S., BRUNI, C. AND LEMBO, F. (2010): LPS-induced IL-8 activation in human intestinal epithelial cells is accompanied by specific histone H3 acetylation and methylation changes. *BMC microbiology*, 10, 172.
- ARCE, C., RAMIREZ-BOO, M., LUCENA, C. AND GARRIDO, J. J. (2010): 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*, 33, 161-174.
- BEHNIA, K., BHATIA, S., JASTROMB, N., BALIS, U., SULLIVAN, S., YARMUSH, M. AND TONER, M. (2000): Xenobiotic metabolism by cultured primary porcine hepatocytes. *Tissue engineering*, 6, 467-479.
- BERRY, M. N. AND FRIEND, D. S. (1969): High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells A biochemical and fine structural study. *The Journal of cell biology*, 43, 506-520.
- BLOUIN, A., BOLENDER, R. P. AND WEIBEL, E. R. (1977): Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *The Journal of cell biology*, 72, 441-455.
- BURKEY, T. E., SKJOLAAS, K. A., DRITZ, S. S. AND MINTON, J. E. (2007): Expression of Toll-like receptors, interleukin 8, macrophage migration inhibitory factor, and osteopontin in tissues from pigs challenged with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium or serovar Choleraesuis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 115, 309-319.
- CAMPBELL, W. B. (2000): New role for epoxyeicosatrienoic acids as anti-inflammatory mediators. *Trends in pharmacological sciences*, 21, 125-127.
- CENCI Č, A. AND LANGERHOLC, T. (2010): Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology—A review. *International journal of food microbiology*, 141, S4-S14.
- CHEN, Y., SONG, K., ECK, S. L. AND CHEN, Y. (2000): An intra-Peyer's patch gene transfer model for studying mucosal tolerance: distinct roles of B7 and IL-12 in mucosal T cell tolerance. *The Journal of Immunology*, 165, 3145-3153.
- FEHER, GY. (2006): A háziállatok funkcionális anatómiája II., Budapest: Mezőgazda, 103-109.

- FRIEDMAN, S. L. (2004b): Stellate cells: a moving target in hepatic fibrogenesis. *Hepatology*, 40, 1041-1043.
- FRIEDMAN, S.L. (2004a): Mechanism of disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nature Clin Practice Gastroenterol Hepatol*, 1, 98-105.
- FRY, J. R. (1981): [15] Preparation of mammalian hepatocytes. *Methods in enzymology*, 77, 130-137.
- GÁLFI, P., CSIKÓ, GY., JERZSELE, Á. (2010): Állatorvosi gyógyszerteran I., Budapest: Robbie-Vet Kft., 46-49; 202-221.
- GARCIA DEL BUSTO CANO, E. AND RENTON, K. W. (2003): Modulation of hepatic cytochrome P450 during *Listeria monocytogenes* infection of the brain. *Journal of pharmaceutical sciences*, 92, 1860-1868.
- GEWIRTZ, A.T., LIU, Y., SITARAMAN, S.V., MADARA, J.L. (2002): Intestinal epithelial pathobiology: past, present and future, *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol*, 16, 851–867.
- HANSON, P. J., MORAN, A. P. AND BUTLER, K. (2011): Paracellular permeability is increased by basal lipopolysaccharide in a primary culture of colonic epithelial cells; an effect prevented by an activator of Toll-like receptor-2. *Innate immunity*, 17, 269-282.
- HARBRECHT, B. G., DI SILVIO, M., CHOUGH, V., KIM, Y. M., SIMMONS, R. L. AND BILLIAR, T. R. (1997): Glutathione regulates nitric oxide synthase in cultured hepatocytes. *Annals of surgery*, 225, 76.
- HOWARD, R. B. AND PESH, L. A. (1968): Preparation and partial characterization of intact isolated parenchymal cells from rat liver. *Biol Chem*, 243, 3105–14.
- KASAI, S. AND MITO, M. (1993): Large-scale cryopreservation of isolated dog hepatocytes. *Cryobiology*, 30, 1-11.
- KOJIMA, M., SEKIMOTO, M. AND DEGAWA, M. (2010): Androgen-mediated down-regulation of CYP1A subfamily genes in the pig liver. *Journal of Endocrinology*, 207, 203-211.
- LÁSZLÓ, L., KOVÁCS, A., L. (2012): Szöveti és sejtbiológiai vizsgáló módszerek (2012), 5. fejezet. URL: <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/szovettan/ch05.html#d0e10547>, Letöltés időpontja: 2013.09.20.
- MENG, F. Y., CHEN, Z. S., HAN, M., HU, X. P., HE, X. X., LIU, Y. AND ZHOU, P. (2010): Porcine hepatocyte isolation and reversible immortalization mediated by retroviral transfer and site-specific recombination. *World journal of gastroenterology: WJG*, 16, 1660.

- MITO, M., KUSANO, M. (1993): Hepatocyte transplantation in man. *Cell Transplant*, 2, 65–74.
- MORGAN, E. T. (1989): Suppression of constitutive cytochrome P-450 gene expression in livers of rats undergoing an acute phase response to endotoxin. *Molecular pharmacology*, 36, 699-707.
- MORGAN, E. T. (1997): Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. *Drug metabolism reviews*, 29, 1129-1188.
- MORGAN, E. T. (2001): Regulation of cytochrome p450 by inflammatory mediators: why and how?. *Drug metabolism and disposition*, 29, 207-212.
- MUNTANÉ-RELAT, J., OURLIN, J. C., DOMERGUE, J. AND MAUREL, P. (1995): Differential effects of cytokines on the inducible expression of CYP1A1, CYP1A2, and CYP3A4 in human hepatocytes in primary culture. *Hepatology*, 22, 1143-1153.
- NEUTRA, M. R., PRINGAULT, E. AND KRAEHEHNBUEHL, J. P. (1996): Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annual review of immunology*, 14, 275-300.
- NODE, K., HUO, Y., RUAN, X., YANG, B., SPIECKER, M., LEY, K. AND LIAO, J. K. (1999): Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science*, 285, 1276-1279.
- OGLE, C. K., GUO, X., HASSELGREN, P. O., OGLE, J. D. AND ALEXANDER, J. W. (1997): The gut as a source of inflammatory cytokines after stimulation with endotoxin. *The European journal of surgery*, 163, 45-51.
- OSWALD, I. P. (2006): Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of the pig intestine. *Veterinary research*, 37, 359-368.
- PASZTI-GERE, E., CSIBRIK-NEMETH, E., SZEKER, K., CSIZINSZKY, R., JAKAB, C. AND GALFI, P. (2012): Acute oxidative stress affects IL-8 and TNF- α expression in IPEC-J2 porcine epithelial cells. *Inflammation*, 35, 994-1004.
- PASZTI-GERE, E., MATIS, G., FARKAS, O., KULCSAR, A., PALOCZ, O., CSIKO, G. AND GALFI, P. (2013): The Effects of Intestinal LPS Exposure on Inflammatory Responses in a Porcine Enterohepatic Co-culture System. *Inflammation*, 1-14.
- PUVIANI, A. C., OTTOLENGHI, C., TASSINARI, B., PAZZI, P. AND MORSIANI, E. (1998): An update on high-yield hepatocyte isolation methods and on the potential clinical use of isolated liver cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 121, 99-109.
- RÖHLICH, P. (2006): Szövevény. Budapest: Semmelweis Kiadó, 315-325.

- ROZGA, J., WILLIAMS, F., RO, M. S., NEUZIL, D. F., GIORGIO, T. D., BACKFISH, G. AND DEMETRIOU, A. A. (1993): Development of a bioartificial liver: Properties and function of a hollow-fiber module inoculated with liver cells. *Hepatology*, 17, 258-265.
- SALMI, M., ADAMS, D. AND JALKANEN, S. (1998): IV. Lymphocyte trafficking in the intestine and liver. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 274, G1-G6.
- SCHNEIDER, W. C. AND POTTER, V. R. (1943): Hepatocyte preparation by mechanical disruption. *J Biol Chem*, 149, 217.
- SEGLEN, P. O. (1972): Preparation of rat liver cells: I. Effect of Ca^{2+} on enzymatic dispersion of isolated, perfused liver. *Experimental cell research*, 74, 450-454.
- SEGLEN, P. O. (1976): Preparation of isolated rat liver cells. *Methods cell biol*, 13, 29-83.
- SEWER, M. B. AND MORGAN, E. T. (1998): Down-regulation of the expression of three major rat liver cytochrome P450S by endotoxin in vivo occurs independently of nitric oxide production. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 287, 352-358.
- SHAPIRO, B. H., AGRAWAL, A. K. AND PAMPORI, N. A. (1995): Gender differences in drug metabolism regulated by growth hormone. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 27, 9-20.
- SIDHU, J. S. AND OMIECINSKI, C. J. (1995): cAMP-associated inhibition of phenobarbital-inducible cytochrome P450 gene expression in primary rat hepatocyte cultures. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 12762-12773.
- SIEWERT, E., BORT, R., KLUGE, R., HEINRICH, P. C., CASTELL, J. AND JOVER, R. (2000): Hepatic cytochrome P450 down-regulation during aseptic inflammation in the mouse is interleukin 6 dependent. *Hepatology*, 32, 49-55.
- WALPOLE, H. E., LEE, W. M., WALLE, T., WALLE, U. K., WILSON, M. J. AND KENNEDY, J. W. (1990): Rabbit hepatocytes in primary culture: preparation, viability and use in studies of propranolol metabolism. *Hepatology*, 11, 394-400.
- WARREN, G.W., POLOYAC, S.M., GARY, D.S., MATTSON, M.P. AND BLOUIN, R.A. (1999): Hepatic cytochrome P-450 expression in tumor necrosis factor- α receptor (p55/p75) knockout mice after endotoxin administration. *J Pharmacol Exp Ther*, 288, 945-950.
- WHITE, R. E. AND COON, M. J. (1980): Oxygen activation by cytochrome P-450. *Annual review of biochemistry*, 49, 315-356.