



Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Kar
Élettani és Biokémiai Tanszék

Gyulladáscsökkentő anyagok hatékonyságának vizsgálata
sertés eredetű hepatikus *in vitro* modelleken

Készítette: Hatala Patrícia IV. évfolyam
Témavezetők: Dr. Máti Gábor, tanszéki munkatárs
Dr. Neogrády Zsuzsanna, egyetemi
docens

Budapest, 2014

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	3
Bevezetés és irodalmi áttekintés	4
A máj funkciója, felépítése.....	4
A gyulladás biokémiája.....	6
A máj szerepe a gyulladásos válaszreakcióban.....	7
A gyulladás csökkentésének hagyományos és alternatív lehetőségei.....	9
Az in vitro és in vivo modellek összehasonlítása, primer májsejttenyészetek készítése	11
Célkitűzés.....	14
Anyag és módszer	15
1. modell	15
Kísérleti állatok	15
Vegyszerek.....	15
Előkészületek, műtét	15
Májsejttenyészet készítése.....	17
A Kupffer-sejtek arányának meghatározása primer májsejttenyészetben immunhisztokémiai módszer segítségével.....	19
Sejtmentes baktériumfelülűsző előállítása	20
Kezelés és mintavétel	20
A tápfolyadék IL-6 és IL-8 koncentrációjának meghatározása ELISA módszer segítségével	21
2. modell	22
A Kupffer-sejtek izolálása és a ko-kultúra kialakítása.....	22
A Kupffer-sejtek arányának meghatározása immunhisztokémiai módszer segítségével.....	23
Statisztika.....	23
Eredmények.....	24
1. modell	24
A Kupffer-sejtek arányának meghatározása primer májsejttenyészetben immunhisztokémiai módszer segítségével.....	24
A tápfolyadék IL-6 koncentrációjának meghatározása ELISA módszer segítségével	25
A tápfolyadék IL-8 koncentrációjának meghatározása ELISA módszer segítségével	26
2. modell	27
A Kupffer-sejtek arányának meghatározása immunhisztokémiai módszer segítségével.....	27
Megbeszélés	29
Összefoglalás.....	32
Summary	33
Köszönetnyilvánítás	35
Irodalomjegyzék.....	36

Rövidítések jegyzéke

BSA = bovine serum albumin

CYP enzimek = citokróm P450 enzimcsalád

DAPI = 4',6-diaminido-2-phenylindol

EDTA = etilén-diamin-tetraecetsav

ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay

FBS = fetal bovine serum

FITC = fluoreszcin-izotiocianát

GALT = gut-associated lymphoid tissue

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

IFN = interferon

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

IL = interleukin

LPS = lipopoliszacharid

Lp2142 = Lactobacillus plantarum 2142

MHC II = major histocompatibility complex II.

NF- κ B = nuclear factor- κ B

NK sejtek = natural killer sejtek

NSAID = nonsteroidal anti-inflammatory drug (Nem szteroid gyulladáscsökkentő)

P = tévedési valószínűség

PAMP = pathogen-associated molecular pattern

TLR = toll-like receptor

TNF = tumor necrosis factor

Bevezetés és irodalmi áttekintés

A máj funkciója, felépítése

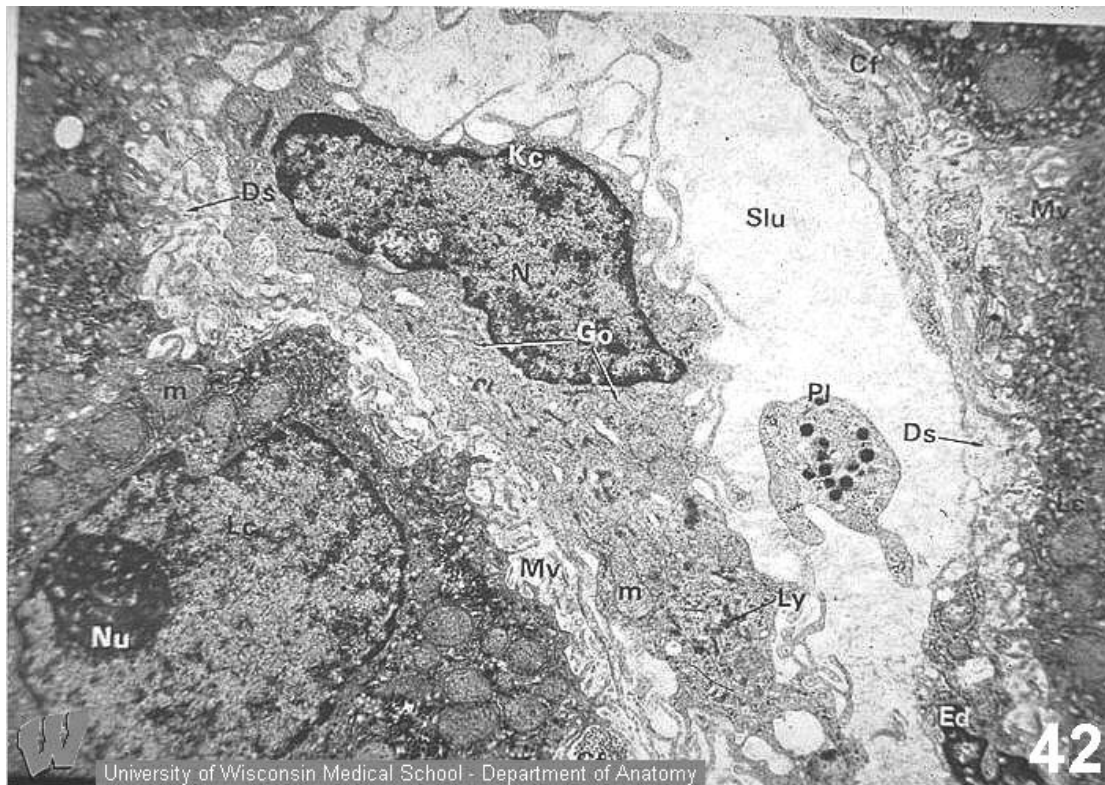
A máj szervezetünk egyik legsokrétűbb funkcióval rendelkező szerve. A bélből felszívódott anyagok útjának első állomása, amelyek ide a *vena portae* útján érkeznek, és valamilyen feldolgozás, átalakítás után a keletkező termékek a szisztémás keringésbe jutnak. Kiemelkedő feladata a környezetből felvett vagy endogén úton keletkezett mérgező, káros, illetve testidegen anyagok méregtelenítése és kiválasztása. Szerteágazó funkciói közé tartozik a plazmafehérjék szintézise, ilyenek például az albumin, fibrinogén, plazminogén, transferrin, nem immunogén alfa és béta globulinok. További feladata az epesav-szintézis, illetve az epe szekréciója és egyes szabályozó molekulák képzése, átalakítása is, így a májban zajlik az eritropoietin, az IGF-1, az IGF-2 (insulin-like growth factor-1, -2) és az angiotenzinogén szintézise. Fontos továbbá, hogy a máj, mint az intermediér anyagcsere egyik legfontosabb szerve részt vesz a felszívódott szénhidrátok glikogénként való tárolásában, szükség esetén a glükóz mobilizálásában, a glükoneogenezisben, valamint a lipid- és aminosav-anyagcserében. Funkciói közé tartozik emellett a folsav, a B₁₂-vitamin, az A-vitamin, a vas és a réz tárolása is (Robbins, 2009).

A máj szerkezetét alkotó sejttípusokat parenchymalis és nem parenchymalis sejtekre oszthatjuk, előbbiekhöz a *hepatocyták* tartoznak, melyek a szerv állományának jelentős részét, csaknem 80%-át teszik ki, utóbbi csoportot pedig a *Kupffer-sejtek*, a vér- és epeereket, sinusoidokat, illetve a *Disse-féle* teret bélelő endothel sejtek, az *Ito-sejtek* és különböző fehérvérsejtek alkotják (Röhlich, 2006).

A máj felületét kívülről egy finom kollagén- és elasztikus rostokból álló, Glisson-toknak nevezett kötőszövetes tok borítja, mely a májkapunál befordul a máj állományába és sokszorosán elágazik a májlebenykeket körülveve. Az interstitiumnak fontos szerepe van a sejtek alakjának és polaritásának megőrzésében, ezt a glikoproteinek, Ca²⁺ ionok és a sejtek felületi receptorainak együttműködése teszi lehetővé (Puviani et al., 1998). A sejtek vérellátásáért az úgynevezett májsinusok felelősek, melyek kapilláriszerű, tágult véredények, lumenüket endothellel bélelt szabálytalan intercelluláris nyílások szakítják meg. A nyílások között, a lumenbe nyúlva találhatók a szabálytalan alakú, fagocitózisra képes monocytá eredetű fehérvérsejtek, a *Kupffer-sejtek* (**1. ábra**), melyek a mononuclearis phagocytarendszer tagjai. Fontos szerepet töltenek be a szervezetbe került fertőző anyagok, például baktériumok eliminálásában, a bekebelezett antigének bemutatásában, mint antigénprezentáló sejtek, így a szervezet védekezőrendszerének nélkülözhetetlen elemei (Kolios et al. 2006). A

lentebb bővebben kifejtett gyulladásos reakcióban kiemelt jelentőségű citokineket termelnek, melyek a májban található citokróm P450 (CYP) enzimekre szuppressziós hatást gyakorolnak (Sunman et al., 2004). A CYP enzimek több szervben, például a vesében, a tüdőben és a bélcsatornában is megtalálhatók, de a májban működnek legnagyobb aktivitással. Fő feladatuk a májba került testidegen, káros anyagok – leggyakrabban redoxireakciókkal történő – átalakítása, ezáltal előkészítve azokat a későbbi konjugációra, majd eliminálásra (Pásztigere et al., 2014; Gálfi et al., 2010).

Szintén a fehérvérsejtek közé tartoznak a lymphocyta típusú, úgynevezett „pit sejtek”, melyeknek feltehetően az *Ito-sejtekkel* együtt jelentős szerepük van a fibrinogenezisben. A „pit sejtek” a fibrintermelést stimuláló faktort állítanak elő, az *Ito-sejtek* pedig közvetlenül fibrintermelőként vesznek részt a folyamatban (Friedman, 2004a,b).



1. ábra: Elektronmikroszkópos felvétel Kupffer-sejtről

Jelölések: **Kc**= Kupffer-sejt, **Pl**= thrombocyta, **Ds**= Disse-féle tér, **Ed**= endothel sejt, **N**= sejtmag, **Nu**= nucleolus, **Cf**= kollagén szál, **Ly**= lysosoma, **m**= mitochondrium, **Go**= Golgi-apparátus

(Forrás: <http://histologyatlas.wisc.edu/slides/183/original>)

A gyulladás biokémiája

A gyulladás folyamata szoros kapcsolatban van az immunrendszer működésével, ezért a gyulladás mechanizmusainak megértéséhez elengedhetetlen az immunrendszer működésének áttekintése. Immunrendszerünknek két alapvető eleme van, ezek a természetes (öröklött) és az adaptív (szerzett) immunitás. Immunválaszt válthat ki minden, a szervezetbe került testidegen anyag, például a kórokozó Gram negatív baktériumok sejtfalát alkotó lipopoliszacharid (LPS) típusú endotoxinok, de akár a szervátültetés és a vérátömlesztés is. A kórokozóknak az immunválasz kiváltásához első lépésként át kell jutnia a szervezet védelmét szolgáló barrier szervek valamelyikén. Ilyen például a bőr, illetve a bélcsatornát bélelő epithel réteg (Gewirtz et al., 2002). Mindennapi életünk során számtalan ilyen – immunválaszt kiváltani képes – anyaggal kerül kapcsolatba a szervezet, melyek legnagyobbbrészt a bélcsatornán keresztül kerülnek a vérpályába, és ennek következményeként védekező rendszerünk aktiválódik (Neutra et al., 1996; Salmi et al., 1996). Mivel a véráramba felszívódott anyagok első lépésként a májba kerülnek, nem meglepő, hogy ez a szerv kulcsszerepet tölt be a szervezet védekező folyamataiban.

Miután a kórokozó bejutott a vérpályába, elsőként a természetes immunitás folyamatai indulnak meg. Arra a kérdésre, hogy mi alapján ismerik fel az immunsejtek ezeket az anyagokat, a válasz a kórokozókra jellemző molekuláris mintázatban (pathogen-associated molecular patterns = PAMP) rejlik. A felismerő mechanizmust az immunsejtek felszínén lévő Toll-like receptorok (TLR) segítik, melyek különböző PAMP mintázatokat ismernek fel. Ilyen például az LPS, a gombákban jelen levő mannán és a különböző vírusokban található idegen nukleinsavak (pl. duplaszálú RNS). Az idegen anyag és a TLR kapcsolódása különböző jelátviteli utakat indít be, és ezzel az immunválaszt aktiválja. LPS hatására nem csak ez az aktiváció figyelhető meg, hanem a TLR-expresszió is fokozódik (Burkey et al., 2007; Arce et al., 2010; Hanson et al., 2011).

A természetes immunitás sejtjei – granulocyták, Natural Killer sejtek (= NK sejtek), hízósejtek és antigénprezentáló sejtek (makrofágok, dendritikus sejtek) – többféle feladatot látnak el annak érdekében, hogy a kórokozókat sikeresen eliminálják. Számos esetben elegendő a kórok megszüntetéséhez az öröklött immunválasz működése, azonban ha szükséges, az adaptív immunrendszer is aktiválódik. A kórok megszüntetését szolgálja különböző citotoxikus fehérjék szekréciója, illetve a fagocitózis, melynek eredményeként az antigének a major histocompatibility complex II-vel (MHC-II) együtt a makrofágok felszínére kerülnek, ezzel képessé válnak az adaptív immunválasz aktiválására. A természetes immunitás sejtjei számos citokint is termelnek, mellyel az immunválaszt szabályozni képesek.

Az adaptív immunválasz sejtjei celluláris (T-lymphocyták) és humorális (B-lymphocyták) immunválasz kialakítására képesek, specifikusan az adott kórok ellen hatnak, és memóriával rendelkeznek (Robbins, 2009).

A fent leírt immunfolyamatok során kialakult mediátorok és az immunsejtek együttesen gyulladást hoznak létre, melynek jellemzően öt tünete alakul ki: kipirultság, melegség, duzzanat, fájdalom és működéskiesés. Ezeknek a megjelenéséért legfőbbképpen az arachidonsavból képződő, eikozanoid típusú gyulladásos mediátorok felelősek. Az arachidonsav a szervezetben elsősorban a sejtmembránok foszfolipid molekuláiban (foszfatidil-kolin – lecitin, foszfatidil-etanolamin – kefalin) foglal helyet. Ahhoz, hogy a foszfolipidekből arachidonsav szabaduljon fel, a foszfolipáz-A2 enzim működése szükséges. Ennek aktiválásában a szervezetbe került idegen anyag, például az LPS és a TLR kapcsolódása által mediált citokintermelés kulcsfontosságú szerepet játszik. Ilyen citokinek például a tumor nekrosis faktor-alfa (TNF-alfa), az interferonok (IFN) és az interleukinok (IL), ez utóbbiak közül is a három legfontosabb az IL-1, IL-6 és az IL-8. Ezeken kívül említésre méltó az IL-10, ugyanis ez gyulladáscsökkentő citokinként vesz részt a folyamatban. A felsorolt fehérjék hatására a foszfolipáz-A2 aktiválásával létrejövő szabad arachidonsav további átalakulásokon mehet keresztül. A létrejövő gyulladásos termékek minősége attól függ, hogy az átalakító mechanizmusban milyen enzimek vesznek részt, ez alapján négyféle átalakító út létezik. Nem enzimatisz átalakulás során izoprosztánok, lipoxigenázok által katalizált reakcióban lipoxinek és leukotriének, ciklooxygenázok által katalizált reakcióúton prosztaglandinok, prosztaciklinek és tromboxán, és végül a CYP epoxigenázok által katalizált útvonalon epoxi-eikozatetraénsav keletkezik (Gálfi et al., 2010).

A felsorolt vegyületek felelősek a gyulladás tüneteinek kialakulásáért, hatásukra kialakulhat vasodilatatio, fokozott vascularis permeabilitás, ezzel elősegítve a kemotaxist és leukocytá aktivációt és megteremtve az immunsejtek működésének megfelelő környezetet. Ezen kívül a gyulladásra jellemző láz, fájdalom és szövetkárosodás kialakulásában is szerepet játszanak.

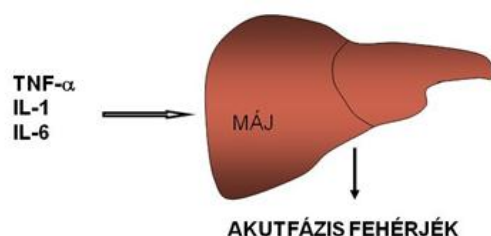
A gyulladás élettani esetben egy önmagát korlátozó, heveny folyamat, ám előfordulhat, hogy nem sikerül eliminálni a kiváltó okot, így a gyulladás idültté válik, az érintett szövetben fibrózis, funkciócsökkenés, esetleg funkcióvesztés következik be.

A más szerepe a gyulladásos válaszreakcióban

Különböző bakteriális fertőzések során a Gram negatív baktériumok sejtfalából felszabaduló LPS hatására a bélfal barrier funkciója sérül, áteresztővé válik, így az LPS a

vérpályába kerül, melynek következtében a *vena portae*-n keresztül a májba jut. A portális keringéssel a májba jutó baktériumok és termékeik eliminálásában a sinusoidalis résben található szöveti makrofágoknak, a már említett *Kupffer-sejteknek* kulcsszerepe van (Jacob et al., 1977). Az LPS kapcsolódik a *Kupffer-sejt* TLR-4 receptoraihoz, ennek hatására a makrofág elkezd az LPS bekebelezését, ezzel mérsékelve az LPS által a májsejtekre kifejtett káros hatásokat a gyulladás kezdeti szakaszában (Gehring et al., 2006). Később azonban a *Kupffer-sejtek* által termelt gyulladásos mediátorok, így például a TNF- α vagy az IL-6 fontos szerepet tölthetnek be a hepatocyták károsodásában (Van Bossuyt and Wisse, 1988; Naito et al., 2004). Az említett gyulladásos mediátorok nélkülözhetetlenek a szisztémás gyulladásos válasz kialakulásában, hiszen a szisztémás keringésbe jutva a szervezet egészében további gyulladásos folyamatokat indítanak be (Carrico, 1993). A gyulladás kezdeti szakaszában lezajló sokrétű élettani változásokat összefoglaló néven akut fázis reakciónak nevezzük.

A fent leírtakon kívül a gyulladásos mediátorok a májsejtekben is jelentős változásokat indítanak el. Az akut fázis reakció során a gyulladásos citokinek hatására a májsejtek fehérjeszintetizáló tevékenysége megváltozik, az ún. akut fázis fehérjék (pl. komplement fehérjék, alvadási fehérjék, **2. ábra**) szintézise kerül előtérbe. Ennek következtében az ún. negatív akut fázis fehérjék (melyek nem vesznek részt a gyulladásos



Komplementfehérjék:
C3, C5 és C1 inhibitor (6-8 X)

Alvadási fehérjék:
Fibrinogen (2-4 x)
von Willebrand faktor

Proteináz gátlók:
plazminogén aktivátor inhibitor I
 α 2-antiplazmin

Fémion-kötő fehérjék:
haptoglobin, cöruloplasmin (1.5-2 x)

Negatív akut fázis fehérjék:
albumin, transzferin (0.4-0.5 X)

Nagymértékű változással járó AFP-k:
Szérum amyloid A (100-1000 X)
C-reaktív fehérje
Szérum amyloid P komponens (SAP)

2. ábra: Akut fázis fehérjék szintézise
(Forrás: Balajthy et al., 2011)

válaszreakcióban, pl. albumin) szintézisének intenzitása jelentősen lecsökken, így a vérben lévő plazmafehérjék aránya számottevően megváltozik. Az akut fázis fehérjék csökkentik a szövetsérülés mértékét, fontos szerepük van a sérült szövetek regenerálásában, részt vesznek a gyulladásos védekezési mechanizmusokban. Az akut fázis

reakció során a központi idegrendszer megnöveli a mellékvesekéreg glükokortikoid-szintézisét, ami pedig a májsejtekben fokozza az IL-1 és TNF- α mediált akut fázis fehérjék szintézisét. Ezzel egy időben egy negatív visszacsatolási mechanizmust létrehozva a glükokortikoidok a makrofágokban, így a *Kupffer-sejtekben* is lecsökkentik egyes gyulladásos citokinek, például az IL-1 szintézisét (Balajthy et al., 2011).

A gyulladás csökkentésének hagyományos és alternatív lehetőségei

A gyulladásos folyamat kialakulását több ponton mérsékelhetjük, megakadályozhatjuk. A legtöbbször használt gyulladáscsökkentő szerek közé tartozik a nem szteroid gyulladáscsökkentők (=NSAID) csoportja, melyek a ciklooxygenáz út gátlásával csökkentik a képződő prosztaglandinok és prosztaciklinek mennyiségét, ezáltal korlátozva a gyulladás tüneteit, például a lázat és a fájdalmat. Másik fontos vegyületcsoport a glükokortikoidok csoportja, melyek mérséklék különböző citokinek, például az IL-1, IL-2, IL-6 és a TNF- α felszabadulását, gátolják a foszfolipáz-A2 aktiválódását, ezzel megakadályozva az arachidonsav szabaddá válását a membránból és korlátozva a különböző arachidonsav metabolitok kialakulását (Gálfi et al., 2010). A már említett hatóanyagok mellett szintén alkalmazott szerek a citokin-inhibitorok, tromboxán-antagonisták és a leukotrién-gátlók.

A fent említett gyógyszerek gyakran és széles körben alkalmazott szerek, ám mellékhatásaik (például a NSAID-ok esetében a gyomor-béltraktust károsító hatás), az esetleges hosszú élelmezés-egészségügyi várakozási idők, illetve a gyógyszermentes, egészséges hús előállításának világszerte fokozódó igénye miatt egyre inkább előtérbe kerül különböző alternatív gyulladáscsökkentő szerek hatékonyságának vizsgálata és alkalmazása. Ilyen például a dolgozatom egyik témáját adó probiotikus baktériumok jótékony hatásának, illetve az Élettani és Biokémiai Tanszék által sokat vizsgált (nátrium-)n-butirát (továbbiakban butirát) gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata.

A butirát a szénhidrátok anaerob mikrobiális fermentációja során keletkező illó zsírsavak (ecetsav, propionsav, vajsav) egyikének, a vajsavnak egyértékű anionja. Az illó zsírsavak a kérődzők bendőjében és a monogastrius állatok vastagbéljében képződnek, és a vastagbélben jelentős mennyiségben (80-120 mmol/l béltartalom) fordulnak elő (Bergman, 1990; Kristensen et al., 1995). Számos és széleskörben vizsgált funkciót látnak el a szervezetben, például a bendő- és bélhámsejtek energiaszükségletük jelentős részét ezen illó zsírsavak oxidációjából fedezik. Ebben a folyamatban legintenzívebben a butirát vesz részt, ezzel elsődleges energiaforrást biztosítva a *colonocyta*k számára (Velázquez et al., 1997). A bélhámsejtek által nem hasznosított butirát a *vena portae*-n keresztül a májba jut, ahol a *hepatocyta*kba kerül, itt bekapcsolódhat például a béta-oxidációba, a ketogenezisbe, vagy egyes fajok esetében részt vehet a hosszú szénláncú zsírsavak szintézisében, ezzel befolyásolva a máj anabolikus és katabolikus anyagcsere-folyamatait. A butirát – epigenetikusan aktív molekulaként – hathat egyes gének expressziójára a DNS metiláltsági fokának és a hisztonfehérjék acetilációs állapotának módosításával (Doyle, 2010; Mátis et al., 2013). Sokrétű aktivitásának következménye a sejtek differenciációját fokozó, illetve a

bélhámsejtekre kifejtett proliferatív hatása: ismert, hogy butirátetetés hatására patkányban az epithelsejtek száma és abszorpciós képessége is növekedést mutat (Sakata, 1986).

A takarmány butirátkiegészítésének hatására javult a brojlercsirkék takarmányértékesítése, nőtt az állatok súlygyarapodása és a bélbolyhok hossza (Hu and Guo, 2007). Növendék sertésben szintén érvényesült ez a pozitív hatás a súlygyarapodásban, a takarmányértékesítésben és a bélmorfológia alakulásában egyaránt (Gálfi és Bokori, 1990). Monogastrius állatokban exogén butirátbevitel nélkül az endogén úton keletkezett butirátnak csak kis mennyisége kerül a szisztémás keringésbe (Guilloteau et al., 2010). A takarmány-kiegészítőként adott butirát azonban az egész szervezetre széleskörű hatást gyakorolhat, többek közt a szénhidrát- és lipidanyagcsere effektoraként, amely hatását elsősorban a sejtek inzulinérzékenységének és az inzulin jelpályának a befolyásolásával fejt ki (Gao et al., 2009; Mátis et al., 2014). Kísérletesen megfigyelték, hogy takarmány-kiegészítőként adagolt butirát hatására a bélfal barrier funkciója javult a *tight junction* fehérjék szintézisének fokozódása miatt (Bordin et al., 2004), továbbá a butirát hozzájárul a GALT (=gut associated lymphoid tissue) megfelelő fejlődéséhez is (Friedmann et al., 2005).

A butirát további pozitív tulajdonsága a bélben lévő patogén baktériumokra, például *Escherichia coli*, *Clostridium* és *Salmonella* fajokra kifejtett szelektív antibakteriális hatás a normál bélflóra károsítása nélkül (Ricke, 2003; Fernandez-Rubio et al., 2008).

Arra a kérdésre, hogy a vastagbélben lévő nem patogén baktériumok anyagcseretermékei miért nem indítanak el immunreakciót, a válasz szintén az illó zsírsavak, elsősorban a butirát mediátor szerepében keresendő. Kísérletekből kiderül ugyanis, hogy a szimbiota baktériumok által termelt butirát a bélfal *lamina propria* rétegében lévő *intestinalis makrofágok* gyulladásos citokin-, így IL-6-termelését a TLR-úttól függetlenül, hiszton-hiperacetiláló hatásának köszönhetően szupresszálja (Chang et al., 2013). Segain és munkatársai *in vitro* vizsgálták a butirát gyulladáscsökkentő hatását. Kísérleteiket bélbiopátumból izolált *lamina propria* és perifériás vér mononukleáris sejtekből álló tenyészetben végezték, és azt találták, hogy az LPS által indukált TNF- α és más gyulladásos citokinek expressziója lecsökkent butirátkezelés hatására (Segain et al., 2000).

A fent leírt jótékony hatások tették lehetővé, hogy a butirát takarmány-kiegészítőként való alkalmazása széles körben elterjedté váljon, különösen azt követően, hogy az antibiotikumok hozamfokozási célból történő felhasználását 2006-ban betiltották az Európai Unióban. Mindemellett megindult más, hozamfokozó szerként és a bélflóra egyensúlyának javítására használható anyagok hatásainak kutatása, így a különböző probiotikumok, például *Lactobacillus* fajok vizsgálata.

Probiotikumnak nevezzük azokat az élőcsírás készítményeket, melyeket a bélflóra normál állapotának fenntartására *per os* juttatunk a szervezetbe. Jótékony hatásukat a patogén baktériumok kiszorításával, biofilmképzéssel, így a bélfal védelmével, valamint egyes probiotikumok tejsavtermeléssel érik el. A tejsavtermelés jótékony hatása abban rejlik, hogy a bélbeli tejsavkoncentráció növekedésével a béltartalom pH-ja csökken, és ezzel az alacsonyabb pH-jú környezettel szemben a patogén csírák sokkal kevésbé ellenállóak, mint a probiotikus, illetve szimbionta baktériumok (Holzapfel et al., 2002). Ezen baktériumtörzsek pozitív hatását napjainkban egyre több haszonállattartó telep használja ki probiotikumok takarmány-kiegészítőként történő alkalmazásával. A leggyakrabban alkalmazott probiotikus baktériumkultúrák, melyek a normál bélflóra részét is képezik, a következők: *Lactobacillus spp.*, köztük *Lactobacillus plantarum* és *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Enterococcus faecium*. A probiotikumok előnyös hatásai leginkább a javuló súlygyarapodásban, illetve a hasmenéses bélfertőzések visszaszorulásában mutatkoznak meg, ám hatásmechanizmusuk pontos feltárására egyelőre még nem került sor.

Számos kutatás irányul a probiotikumok gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálatára. Megfigyelték, hogy egyes *Lactobacillus* fajok csökkentették a különböző gyulladásos citokinek (pl. IFN- γ) termelődését az emésztőcső hámsejtjeinek génexpressziós szintű befolyásolásával (Bäuerl et al., 2012).

Az in vitro és in vivo modellek összehasonlítása, primer májsejttenyészetek készítése

Az élő szervezeten végzett vizsgálatokat *in vivo* vizsgálatoknak nevezzük, melyeknek nagy előnye, hogy az adott kísérlet hatásait, esetleg nem várt mellékhatásait a működő szervezet egészének válaszreakcióit vizsgálva követhetjük nyomon. Hátrányuk viszont, hogy az állatvédelmi szempontok figyelembevételével meglehetősen leszűkül a végezhető kísérletek köre, illetve, hogy egyes mechanizmusok vizsgálata nehezen kivitelezhető, hiszen a szervezet egészében számtalan folyamat kölcsönös egymásra hatása érvényesül. Ezen problémák kiküszöbölésére szolgálnak az *in vitro* vizsgálatok, melyek során egy szerv- vagy szövetrészlet, illetve izolált vagy tenyésztett sejtek szervezeten kívüli vizsgálatára nyílik lehetőség. Ez a módszer lehetővé teszi, hogy egy-egy mechanizmust a szervezet többi anyagcsere-folyamatától elkülönítve vizsgáljunk, így kiderítve, hogy egy külső hatásra adott reakció a szerv vagy szövet független, önálló működésének eredménye-e. Teljes mértékben mégsem válthatja ki az *in vivo* vizsgálatokat, hiszen az *in vitro* kísérletek célja legtöbbször, hogy az adott eredményt az élő szervezet működésének befolyásolására használjuk, ám ehhez bizonyítani szükséges annak extrapolálhatóságát *in vivo* vizsgálatokkal is.

A máj *in vitro* vizsgálatának egyik módja a primer májsejttenyészetek készítése. Mivel a *hepatocyták* izolálásuk után még hosszú ideig életképesek maradnak, és metabolikus aktivitásuk, illetve a különböző anyagcseretermékekre és hormonokra adott reakcióképességük is fennmarad, általában napokig, de minimum 48 órán keresztül tenyésztjük őket, így lehetőség nyílik működésük részletes vizsgálatára. Ezeknek a vizsgálatoknak első lépése a sejtek izolálása, majd tenyésztőedényre való lerakása (Puviani et al., 1998).

A májsejtek kinyerése a szervből történhet a parenchyma mechanikus úton történő eltávolításával (Schneider and Potter, 1943), illetve a ma már legtöbbször alkalmazott eljárással, a májsejtek enzimmel történő emésztésével. Utóbbi szintén kétféleképpen történhet: egyrészt az egész szerv kollagenáztartalmú oldatba merítésével (Fry, 1981; Howard and Pesch, 1968), másrészt az először patkányokon kidolgozott eljárással, miszerint az izolált máj nagy erein keresztül kollagenáztartalmú oldatot áramoltatunk át (Berry and Friend, 1969; Seglen, 1976). Utóbbi eljárás eredményesebb, ha a kollagenázos emésztés előtt kelátképző anyagot, például EDTA-tartalmú oldatot cirkuláltatunk a rendszerben. A lépés célja, hogy a Ca^{2+} ionokat elvonjuk a szervből, ezáltal fellazítva a sejtek közti desmosomalis kapcsolatot. Ügyelnünk kell azonban, hogy a Ca^{2+} ionokat utólag pótoljuk, ugyanis a kollagenázos emésztés így hatékonyabbá válik (Seglen, 1972). Ezzel a módszerrel lehetőség nyílt más állatfajokból történő *hepatocyták* izolálására is, így nyúlból (Walpole et al., 1990), kutyából (Kasai and Mito, 1993), és végül sertésből is (Rozga et al., 1993; Puviani et al., 1998).

A szervből izolált és sejttenyésztő edényre lerakott sejtekből megfelelő körülmények között rövid időn belül összefüggő sejttenyészet jön létre, ezt a tenyészetet primer májsejttenyészetnek nevezzük. Ez a modell a leggyakrabban alkalmazott a máj működésének *in vitro* vizsgálatára. A *hepatocytákat* tenyésztethetjük egyszerű egyrétegű tenyészetként, illetve úgynevezett szendvics kultúraként, amikor a sejtek két kollagén réteg között helyezkednek el. A primer májsejttenyészet előnye a különféle sejtvonalakokkal szemben, hogy az állatból frissen izolált és tenyésztett sejtek nagyfokú hasonlóságot mutatnak az *in vivo* körülményekhez, ezáltal az így kapott eredmények jobban extrapolálhatóak az *in vivo* viszonyokra. A tenyészetbe kerülő nem parenchymalis sejtek (pl. Kupffer-sejtek, Ito-sejtek) szintén hozzájárulnak az intakt májra jellemző folyamatok mind jobb modellezéséhez.

Különböző sejtek, szövetek és szervek részvételével zajló, összetettebb folyamatok *in vitro* vizsgálatára használhatóak az ún. ko-kultúrák, amelyek lényege, hogy különböző sejteket tenyésztünk együtt. Így a májsejteket tenyésztethetjük különböző extrahepatikus sejtfeleségekkel, például fibroblast sejtekkel, vagy aorta eredetű epithel sejtekkel is (Harimoto

et al., 2002). A ko-kultúrák lehetnek egyrétegűek, azaz „monolayer” tenyészetek, melyekben a sejttípusok egy rétegben egymás mellett helyezkednek el, ilyen például a mi kísérletünkben is használt hepatocytá – *Kupffer-sejt* egyrétegű ko-kultúra (Begue et al., 1984), amely kitűnően alkalmas különböző, akut és krónikus gyulladásos folyamatok modellezésére.

Léteznek továbbá kétrétegű, azaz „double-layered” ko-kultúrák, ilyenek például a következőkben leírt enterohepatikus ko-kultúra modellek. A bél és a máj működésbeli kapcsolatának *in vitro* vizsgálatára többféle ko-kultúrát is létrehoztak. Elsőként egy daganatosan transzformált sejtvonalakból álló tenyészet kialakítására került sor, melyben az egyik réteget HepG2 humán májsejt carcinoma sejtvonal alkotja, a másik réteget pedig Caco-2 daganatosan transzformált bélhámsejtekből álló 3D tenyészet (Brand et al., 2000; Choi et al., 2004; Castell-Auvi et al., 2010). A 3D tenyészet lényege, hogy a tenyésztőfelületen pórusok vannak, így a bélhámsejtenyészetnek egy basalis és egy apicalis felszín létehozva, jobban modellezve az *in vivo* körülményeket. A daganatosan transzformált sejtvonalak létrehozásához tumorsejteket használnak, melyeket többször klónoznak, így egy „őstől” származó sejtvonalak jönnek létre, melyek évekig megőrzik osztódó- és életképességüket. Hátrányuk a nem daganatos eredetű sejtenyészetekhez képest, hogy sokkal ellenállóbbak, valamint jelentős geno- és fenotípusos eltéréseket mutatnak az egészséges sejtekhez képest, így nem megfelelően tükrözik az *in vivo* viszonyokat. Ennek kiküszöbölése érdekében Karunk munkatársai egy olyan kétrétegű ko-kultúra modellt hoztak létre, melyben az egyik réteget sertés primer májsejtenyészet, a másik réteget pedig egy nem daganatosan transzformált bélhám sejtvonal, IPEC-J2 3D tenyészet alkotja (Pásztai-Gere et al., 2014).

Célkitűzés

Korábbi kutatások során igazolták, hogy a primer májsejttenyészet alkalmas modell az LPS által indukált gyulladásos folyamatok vizsgálatára. Mivel a vizsgált primer tenyészet a hepatocytaikon kívül egyéb sejteket, például *Kupffer-sejteket* is tartalmaz, melyeknek szintén fontos szerepük van a gyulladásos folyamatokban, illetve felelősek a gyulladásos mediátorok termeléséért, elengedhetetlen ezen sejtek jelenlétének figyelembe vétele a további kísérletek, így gyulladásgátló anyagok hatékonyságának vizsgálata során.

Munkánk folyamán két, sertés eredetű hepatikus *in vitro* modellen, a primer májsejttenyészet (1. modell) mellett hepatocytá – *Kupffer-sejt* egyrétegű ko-kultúrán (2. modell) kívántunk kísérleteket végezni.

1. modell

Első lépésként fontosnak tartottuk a tenyészet pontosabb jellemzése érdekében meghatározni a sertésmájából készített primer sejttenyészetben a sejtizolálás során a tenyészetbe kerülő *Kupffer-sejtek* arányát immunhisztokémiai módszer segítségével. A továbbiakban ezen *in vitro* modellen kívántuk vizsgálni a *Lactobacillus plantarum* 2142 (Lp2142) probiotikus baktériumtörzs sejtmentes felülűszója, illetve a butirát hatását LPS által indukált gyulladásban. A gyulladáscsökkentő hatást a tápfolyadék-felülűszókban jelen levő IL-6 és IL-8 koncentrációinak ELISA módszerrel történő meghatározásával követtük nyomon.

2. modell

A különböző típusú, akut és krónikus gyulladások pontosabb vizsgálatára célunk volt elsőként létrehozni sertésmájából egy olyan hepatocytá – *Kupffer-sejt* egyrétegű ko-kultúrát, ahol a két sejtípus arányát a modellezni kívánt gyulladás típusának megfelelően állítjuk be. A kívánt sejtarány meglétének igazolására immunhisztokémiai vizsgálatot alkalmaztunk.

Az így létrehozott ko-kultúra a jövőben jó alapként szolgálhat a gyulladásos folyamatok további, mélyreható vizsgálataihoz, illetve új típusú *in vitro* sejtmodellek létrehozásához. Későbbi céljaink közt szerepel az 1. modellen már alkalmazott anyagok gyulladásgátló hatásának vizsgálata az így létrehozott ko-kultúrán is.

Anyag és módszer

1. modell

Sertés primer májsejtenyészet

Kísérleti állatok

A kísérletekhez választás utáni, 14-15 kg testtömegű magyar nagyfehér fajtájú ártány malacokat használtunk fel, amelyeket a Dunahy Kft. faddi telepéről szereztünk be, és a SZIE-ÁOTK Élettani és Biokémiai Tanszék állatházában helyeztünk el a kísérletek kezdetéig. A malacokat az előírásoknak megfelelő, standard környezeti körülmények között tartottuk, és a Dunahy Kft.-től beszerzett konvencionális táppal takarmányoztuk, amely *ad libitum* az állatok rendelkezésére állt. A kísérlet előtt 12 órával megvontuk a takarmányt, hogy az altatás során esetlegesen fellépő hányást megelőzzük. Az állatkísérletet a hatályos állatvédelmi szabályoknak megfelelően, a szükséges állatvédelmi engedélyek birtokában végeztük.

Vegyszerek

A fejezetben leírt kísérletekhez használt vegyszereket a leírt kivételektől eltekintve a Sigma-Aldrich Kft.-től (München, Németország) rendeltük.

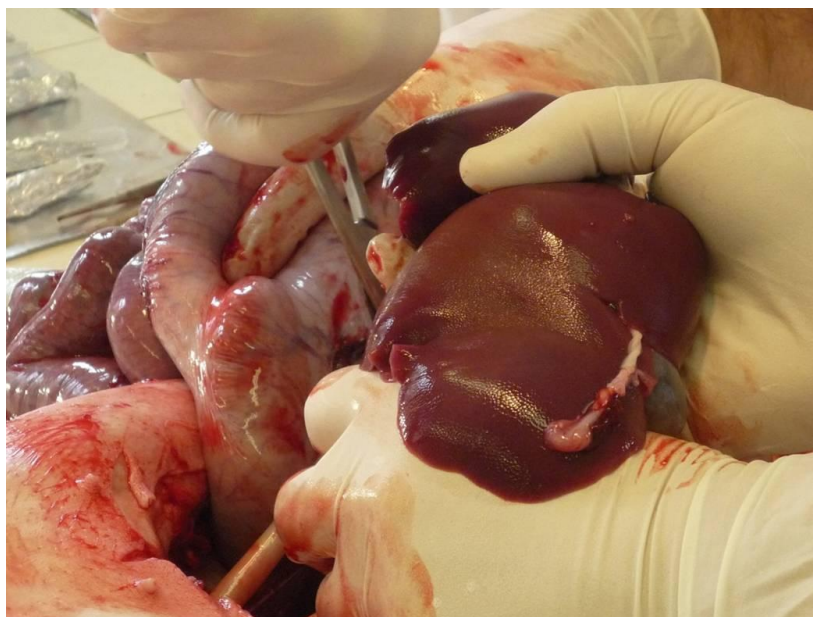
Előkészületek, műtét

Első lépésként a sejtenyészet létrehozásához nélkülözhetetlen pufferek és tápfolyadékok elkészítését (**1. táblázat**), ezek hőmérsékletének beállítását, valamint a megfelelő steril műanyag- és fémeszközök előkészítését végeztük el.

EDTA-tartalmú puffer • 143 mmol/l NaCl • 6,7 mmol/l KCl • 1 g/l EDTA • 10 mmol/l HEPES (autoklávozás után hozzáadva) • pH=7,4 beállítása	EDTA-mentes puffer • 143 mmol/l NaCl • 6,7 mmol/l KCl • 10 mmol/l HEPES (autoklávozás után hozzáadva) • pH=7,4 beállítása
A perfúzióhoz használt emésztő puffer • 67 mmol/l NaCl • 6,7 mmol/l KCl • 4,8 mmol/l CaCl₂ • 100 mmol/l HEPES (autoklávozás után hozzáadva) • pH=7,6 beállítása • 1 g/l kollagenáz IV. típus (közvetlenül a felhasználás előtt hozzáadva)	
Tápfolyadék • William's medium E • 15 mmol/l HEPES • 0,2 NE/ml inzulin • 2 mmol/l L-glutamin • 10000 IU/ml penicillin • 10 mg/ml streptomycin • 10% FBS	Szérumentes tápfolyadék • William's medium E • 15 mmol/l HEPES • 0,2 NE/ml inzulin • 2 mmol/l L-glutamin • 10000 IU/ml penicillin • 10 mg/ml streptomycin

1. táblázat: A kísérlet során felhasznált oldatok összetevői

A következő lépés a kísérleti állat műtetre való előkészítése volt. Az altatást 2 mg/ttkg xylazin és 15 mg/ttkg ketamin intramuscularis injekció beadásával végeztük. Miután a várt hatás kialakult (kb. 5-8 perc), az állatot hátfekvésben rögzítettük, a hasfal leborotválása és alkoholos fertőtlenítése után aszeptikus körülmények között medián laparotómiát hajtottunk végre. A belek félrehajtását követően a májat kivettük (**3. ábra**) és steril fóliára helyeztük, majd az állat eutanáziájára került sor 200 mg/ttkg pentobarbitál szívbe történő beadásával.



3. ábra: A belek félrehajtása és a máj kivétele
(saját fotó)

Májsejttenyészet készítése

A máj kivételét követően a májsejtek izolálását, majd tenyésztését a Pászt-Gere et al. (2014) által leírt módszer alapján végeztük el. Ennek első mozzanata az eltávolított sertésmáj *processus caudatus*ának lemetzése a szervről, és annak egy steril üvegtölcsérbe helyezett, szintén steril fémszűrőre helyezése. A máj *ex vivo* perfúzióját a metszéslapon található nagyereken keresztül végeztük, az átfolyó puffert elöntöttük. Kezdetben 500 ml jéghideg, a sejtek közti kapcsolat fellazulását elősegítő, kalciummegkötő EDTA-tartalmú, előzőleg Carbogennel (5% CO₂ és 95% O₂) oxigenált puffert használtunk kb. 100 ml/perc áramlási sebességgel. Ezt követően az EDTA-tartalmú puffer kimosása következett 600-700 ml, 37°C hőmérsékletű EDTA-mentes pufferrel, azonos áramlási sebességgel. A lépésre azért volt szükség, mert az emésztő pufferben található kollagenáz megfelelő működéséhez szükség van kalciumionok jelenlétére. A perfúziót 37°C hőmérsékletű, kollagenáztartalmú emésztő pufferrel folytattuk, kb. 100 ml/ perc áramlási sebességgel. Az összesen kb. 150 ml térfogatú emésztő puffer első 50 ml-ét az előzőleg összegyűlt pufferekkel együtt elöntöttük, majd a maradék 100 ml puffert steril tripszinező lombikban felfogtuk és recirkuláltattuk.

A perfúziót addig végezzük, amíg a májparenchyma szerkezete szét nem esett (kb. 10 perc), amit a máj állományának márványszerű rajzolata jelzett. A rajzolat megjelenése után a perfúziót abbahagytuk, a lebenyt egy steril üvegedénybe helyeztük, majd a további lépéseket steril fülke alatt és jégen végeztük. A folyamat során a különböző lépések között a sejtek

mosásához, illetve a kész tenyészetek kezeléséhez az első 24 órában foetal bovine serum (FBS) tartalmú tápfolyadékot, majd szérummentes tápfolyadékot használtunk.

A *Glisson-tok* felvágásával hozzájutottunk a sejtekhez, melyeket tápfolyadékban szuszpendáltunk, majd 50 ml-es centrifugacsőbe mértünk egy steril, 100 µm pórusméretű nylonhálón keresztül (Millipore, Volketswil, Svájc). A szuszpenziót 40 ml-re egészítettük ki tápfolyadékkal. A műveletet háromszori centrifugálás követte (50g, 1,5 perc, 4°C). Egy-egy centrifugálás között a nem-parenchymális sejteket tartalmazó felülúszókat az 1. modell esetében elöntöttük, a 2. modellnél jégbe hűtve félreraktuk (lásd később), majd mindegyik esetben az üledéket tápfolyadékban reszuszpendáltuk és 40 ml-re egészítettük ki.

A 3. centrifugálást követően került sor a sejtek életképességének vizsgálatára, melyhez 200 µl, előzőleg ötszörösére hígított sejtsuszpenzióhoz 200 µl tripánkéket adtunk. A tripánkék azokba a sejtekbe tud bejutni, melyeknek a membránja károsodott, kékre színezve azokat, ezzel lehetővé téve az elpusztult és élő sejtek elkülönítését, arányuk meghatározását. A sejtek számolását Bürker-kamra segítségével, fénymikroszkóp alatt végeztük, és ha az élő sejtek aránya, azaz a sejtek életképessége meghaladta a 90%-ot, akkor a sejteket tenyésztésre alkalmasnak találtuk.

Az életképesség vizsgálata után a szuszpenziót a tenyésztéshez szükséges sejtszámnak megfelelően hígítottuk, úgy, hogy a lerakási koncentráció 4×10^5 sejt/ml legyen. A sejteket az immunfluoreszcens vizsgálat céljára speciális, „lumox” felületű 8 lyukú edényekre (0,4 ml sejtsuszpenzió / lyuk) (Sarstedt, Nürnberg, Németország), míg a citokintermelés mérése céljából 6-lyukú TC felületű tenyésztőedényekre (1,5 ml sejtsuszpenzió / lyuk) (Greiner Bio-One, Mosonmagyaróvár) raktuk le. A tenyésztőedényeket előzőleg kollagénnel vontuk be, melynek során az I. típusú kollagént 0,1 mmol/l koncentrációjú ecetsavban oldottuk, 3 órán keresztül mágneses keverőn kevertetve duzzasztottuk. Ezzel egy 0,1 mg/ml-es koncentrációjú törzsoldatot kaptunk, melyet 0,1 mmol/l koncentrációjú ecetsavval tízszeresére hígítottunk és a tenyésztőedényekbe mértük 1 ml/lyuk mennyiségben. Végül az edényeket egy éjszakán keresztül UV fényben steril fülke alatt szárítottuk.

A centrifugálás során leírt kivételtől eltekintve az eddigi lépések a két modell esetén azonos módon zajlottak, a további lépéseket azonban a két modell bemutatásánál külön-külön ismertetem.

A lerakást követően a sejteket termosztátban inkubáltuk (37°C-on, 100% relatív páratartalom, 5% CO₂ tartalom) 4 órán keresztül, majd tápfolyadékcserét végeztünk, és folytattuk a sejtek inkubálását. 24 óra elteltével a tenyészetek konfluenssé váltak, erről

fénymikroszkópos vizsgálattal bizonyosodtunk meg, majd sor került az immunhisztokémiai vizsgálatokra, illetve megkezdtük a tenyészetek kezelését.

A Kupffer-sejtek arányának meghatározása primer májsejttenyészetben immunhisztokémiai módszer segítségével

A létrehozott tenyészet pontosabb jellemzésére immunhisztokémiai eljárással meghatároztuk az izolálás során a tenyészetbe kerülő *Kupffer-sejtek* hepatocytákhoz viszonyított arányát, a már említett 8 lyukú speciális „lumox” felületű tenyésztőedényben tenyésztett sejtek felhasználásával.

Ehhez a következő lépéseket végeztük el a 24 órás, konfluens tenyészeteken:

- 1) A tenyészetek mosása PBS-sel 5 percig
- 2) Permeabilizálás: PBS-ben oldott Triton-X (0,25%) segítségével (5 perces inkubációs idő)
- 3) Blokkolás (a háttérfestődést és az ellenanyagok aspecifikus kötődését megakadályozó lépés), 1 óra; az alkalmazott blokkoló oldat összetétele:
 - a) 5% kecskeszérum
 - b) 1% BSA
 - c) 10 µl 0,1% Triton-X
 - d) A felhasznált összetevőket PBS-ben oldottuk, majd az oldat pH-ját 7,2-re állítottuk be.
- 4) Primer ellenanyag hozzáadása: Fluoreszcein-izotiocianáttal (=FITC) jelzett, anti-CD-68 ellenanyag. A CD-68 fehérje a makrofágok, így a *Kupffer-sejtek* antigénje, tehát alkalmas a *Kupffer-sejtek* specifikus kimutatására.

Az ellenanyagot 1:200 hígításban (2 ml blokkoló oldat + 10 µl ellenanyag) alkalmaztuk, a tenyészeteket szobahőmérsékleten, 1,5 óráig inkubáltuk alufóliával lefedve.
- 5) Mosás: 3x5 perc PBS-sel
- 6) 4',6-diamidino-2-fenilindol (=DAPI) festés (1 µg /ml): DNS-hez kötődik, minden sejtmag pozitivitást mutat (kék). Az inkubáció paraméterei: szobahőmérséklet, 5 perc, alufóliával lefedve.
- 7) Fedés: A tárgylemezekre néhány csepp fedő médiumot (PBS:glicerin, 2:1) pipettáztunk, majd fedőlemezzel fedtük.
- 8) Mikroszkópos vizsgálat: A lemezeket Olympus CKX-41 típusú fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk, a fényképeket Canon EOS 1100D típusú kamerával készítettük.

Az elkészült fényképeken a sejtek számolását ImageJ program segítségével végeztük. Látóterenként vizsgáltuk az összes sejtmag (DAPI pozitív – kék festődés) és a *Kupffer-sejtek* (kettős, DAPI és FITC pozitivitást mutató sejtek – kék és zöld festődés) számát, ezáltal meghatározva a *Kupffer-sejtek* arányát a májsejtenyészetben.

Sejtmentes baktériumfelülűsző előállítása

A tenyészetek kezelésére – mint lehetséges gyulladáscsökkentő hatású anyagot – *Lactobacillus plantarum* 2142 (Lp2142) (Perugiai Egyetem Mezőgazdasági Kar Mikrobiológiai Intézet, Olaszország) probiotikus baktériumtörzs sejtmentes felülűsző folyadékát használtuk, amelyet Dr. Farkas Orsolya készített el számunkra a Gyógyszertani és Méregtani Tanszéken. A baktériumokat DeMan levesbe oltották, és 24 órán át 37°C hőmérsékleten tenyésztették. A sejtmentes felülűszőt a bakteriális szuszpenziók 3000g-n 5°C hőmérsékleten 10 percig tartó centrifugálásával állították elő, a felülűszőt egy steril 0,22 µm pórusméretű filteren szűrték át.

Kezelés és mintavétel

A 6-lyukú lemezekben kialakított kezelési csoportokat és kezelési oldatokat a **2. táblázat** mutatja be. Az LPS *Salmonella enterica* Typhimurium szerotípusból származott, az oldatokat frissen készítettük és adtuk hozzá a szérummentes tápfolyadékhoz. A sejtmentes felülűsző koncentrációja 13 térfogat%, a nátrium n-butiráté 2 mmol/l volt.

A tenyészeteken a kezelőoldatokat 1 órás inkubáció után szérummentes tápfolyadékra cseréltük le. További 24 órás inkubáció után megkezdtük a mintavételt.

Kezelési csoport	Kezelési oldat		
Kontroll	Szérummentes tápfolyadék		
LPS1	Lactobacillus plantarum 2142 + 1 µg/ml LPS	Nátrium n-butirát + 1 µg/ml LPS	LPS1 kontroll: 1 µg/ml LPS
LPS10	Lactobacillus plantarum 2142 + 10 µg/ml LPS	Nátrium n-butirát + 10 µg/ml LPS	LPS10 kontroll: 10 µg/ml LPS

2. táblázat: A kialakított kezelési csoportok n=3 lyuk/kezelési csoport

A mintavétel során a tenyészetek tápfolyadékát leszívtuk, majd azt 345g-n 10 percig 4°C hőmérsékleten centrifugáltuk. Az IL-6 és IL-8 koncentrációjára vonatkozó méréseket az ötszörösére hígított felülúszókból végeztük el.

A tápfolyadék IL-6 és IL-8 koncentrációjának meghatározása ELISA módszer segítségével

Vizsgálataink során a kezelt tenyészetek előzőleg ötszörösére hígított tápfolyadék-mintáiból határoztuk meg a termelődött IL-8 és IL-6 koncentrációját. Ehhez szendvics ELISA módszert alkalmaztunk, melynek lényege a megfelelő antigén kimutatása enzimmel (legtöbbször tormaperoxidáz, horseradish peroxidase, HRP) jelölt specifikus ellenanyaggal. Az elegyhez végül olyan szubsztrátot adunk, melynek eredménye egy színreakció, aminek erősségét spektrofotométer segítségével mérhetjük. A kialakult szín intenzitása arányos a mintában lévő kimutatni kíván antigén mennyiségével. A szendvics ELISA előnye, hogy a hagyományos direkt ELISA vizsgálatnál érzékenyebb, hiszen a reakcióban itt kétféle ellenanyag vesz részt, az egyik a mérés helyéül szolgáló lemezhez, illetve a vizsgálandó antigénhez kapcsolódik, a másik az enzimmel jelölt ellenanyag, amely egyrészt szintén az antigénhez, másrészt a reakcióhoz adott szubsztráthoz kötődik.

Az IL-8 kimutatásához sertés-specifikus IL-8 ELISA kitet (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) használtunk, az IL-6 esetében pedig sertés-specifikus IL-6 ELISA kitet (Abcam, Cambridge, UK) alkalmaztunk. A vizsgálatok mindkét esetben hasonló módon, a gyártó utasításai szerint zajlottak. A kezelés végig szobahőmérsékleten történt, egy 96-lyukú lemezen, melynek meghatározott lyukaiba a különböző mintákból 100-100 µl-t mértünk be. A vizsgálandó oldatokon kívül bemértük a standard sort, valamint egy pozitív és egy negatív kontroll mintát. Egy órás inkubációt követően négyszeres mosás következett mosófolyadékkal, majd szárítás után lyukanként 100 µl – az IL-8 mérése esetén anti-sertés-IL-8-HRP, az IL-6 esetén anti-sertés-IL-6-HRP – reagenst mértünk be, amelyet 30 percig inkubáltunk. A következő lépést a kromogén szubsztrát (tetrametil-benzidin) és a hidrogén-peroxid rámerése jelentette (lyukanként szintén 100-100 µl mennyiségben), melynek hatására kék színű termék keletkezett. Tizenöt perc múlva a reakciót egy kénsavtartalmú gátlófolyadék („stop solution”) felvitelével zártuk, és az így kialakult sárga szín intenzitását 415 nm-en ELISA leolvasó segítségével mértük. Az abszorbancia értékekből a standard sor segítségével határoztuk meg az egyes minták interleukin-koncentrációját.

2. modell

Sertés eredetű hepatocyta – Kupffer-sejt egyrétegű ko-kultúra

A ko-kultúra modell létrehozására az 1. modellben szereplő állatokkal azonos fajtájú, korú, ivarú malacokat használtunk, az állatok tartására, előkészítésére és a műtéti fázisra vonatkozó adatok megegyeznek az 1. modellnél leírtakkal.

A Kupffer-sejtek izolálása és a ko-kultúra kialakítása

A ko-kultúra készítése nagyrészt az 1. modellnél leírtakkal azonos módon történt, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben a májból nyert primer sejtszuspenzió centrifugálásakor két centrifugálás között a felülúszókat külön csőbe gyűjtöttük, hiszen ez a fázis tartalmazza a *Kupffer-sejtek* legnagyobb hányadát. Az így nyert *Kupffer-sejt* tartalmú felülúszót 7 percig 500g-vel centrifugáltuk. Mivel ilyen fordulatszám mellett már a *Kupffer-sejtek* is az üledék fázisba kerültek, a keletkezett felülúszót elöntöttük, az üledéket 20 ml tápfolyadékban szuszpendáltuk. Eközben párhuzamosan két centrifugacsőben előkészítettük a csővenként 15 ml 50%-os és 20 ml 25%-os Percollt tartalmazó oldatot, majd rárétegeztünk 10-10 ml szuszpenziót, ezzel megkezdve a *Kupffer-sejtek* elválasztását a szuszpenzióban maradt sejttermeléktől.

A centrifugálás (500g, 20 perc) eredményeként az 50%-os és 25%-os Percoll oldat határán egy *Kupffer-sejtekből* álló gyűrű jött létre, a csövek alján üledékként sejttermék és vörösvérsejtek jelentek meg. A legfelső fázist eltávolítottuk, a sejtgyűrűt és az alsó folyadékfázist egy-egy új csőbe vittük át, és a kb. 10 ml szuszpenziót 40 ml-re egészítettük ki tápfolyadékkal. 20 percig tartó 600g-vel végzett centrifugálást követően a felülúszót elöntöttük, az üledéket tápfolyadékkal resuszpendáltuk és a két cső tartalmát egyesítettük.

Eddigi munkánk eredményességét a *Kupffer-sejtek* életképességének vizsgálatával ellenőriztük. Ezt a már korábban leírt módszer szerint tripánkékes festéssel végeztük, és 90%-os életképesség elérésekor a sejteket tenyésztésre és ko-kultúra létrehozására alkalmasnak találtuk. A sejtszuspenzió hígítása után előzőleg kollagénnel bevont 6-lyukú lemezre (2×10^6 sejt/lyuk), illetve 8-lyukú „lumox” felületű edényekre raktuk le a sejteket. Húsz perc termosztátban való inkubálás után a *Kupffer-sejtek* letapadtak, ellentétben a sejtszuspenzióban található többi nem-parenchymális sejttel, így a felülúszó leszívása és az edények tápfolyadékkal történő óvatos lemosása után tisztán *Kupffer-sejtekből* álló réteget kaptunk. Ezekre a letapadt sejtekre rétegeztük rá különböző arányban a hepatocytákat, kialakítva az egyrétegű ko-kultúra különböző típusait: a hepatocytákat és *Kupffer-sejteket* 6:1 és 2:1 arányban tartalmazó tenyészeteket. A sejttenyészetek tápfolyadékát négy óra

inkubációs időt követően lecseréltük, majd 24 óra után megkezdjük a sejtarányok vizsgálatát immunhisztokémiai módszer segítségével. Emellett a 6-lyukú lemezekon hepatocyt- és *Kupffer-sejt* monokultúrákat is készítettünk a különböző típusú sejtekből álló tenyészetek mikroszkópos képének összehasonlítása céljából.

A Kupffer-sejtek arányának meghatározása immunhisztokémiai módszer segítségével

A 8 lyukú lemezek immunhisztokémiai festése, illetve előkészítése a mikroszkópos vizsgálathoz az 1. modellnél leírtakkal azonos módon zajlott. A vizsgálattal a különböző típusú sejtek általunk beállított arányának meglétét kívántuk ellenőrizni.

Az immunhisztokémiai eljárás mellett a 6-lyukú lemezen tenyésztett ko-kultúrát, illetve hepatocyt- és *Kupffer-sejt* monokultúrákat Giemssával festettük meg és fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk.

Statisztika

A sejtizolálást 2 állatból végeztük el mindegyik modell esetén, állatonként egy kezelési csoportból 3 párhuzamos lyukat készítettünk a 6-lyukú lemezekon. Az immunhisztokémiai vizsgálat céljára pedig mindegyik esetben két lemezt készítettünk, és mindegyik lyukban 10 látóteret vizsgáltunk.

Az eredmények feldolgozásához R 2.14.0 statisztikai szoftvert alkalmaztunk. Az átlagok közti különbség megbecsüléséhez, normál eloszlású alapsokaság esetén „egy- vagy két-utas” ANOVA tesztet, a kezelt és kontroll csoportok összehasonlításához post-hoc teszteket végeztünk. $P < 0,05$ esetén szignifikáns különbséget állapítottunk meg. Minden eredményt átlag $\pm$ standard hiba alakban fejeztünk ki.

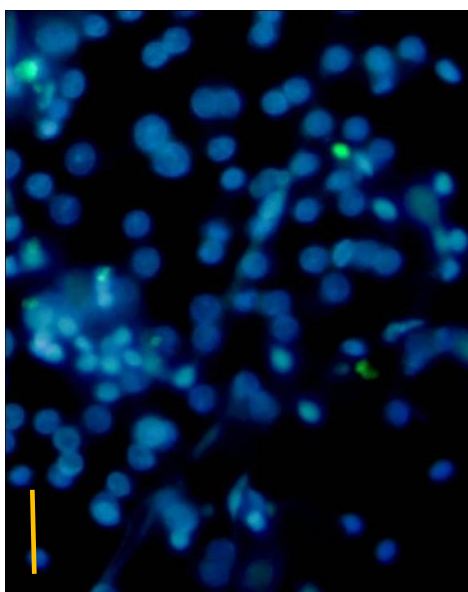
Eredmények

1. modell

Sértés primer májsejttenyészet

A Kupffer-sejtek arányának meghatározása primer májsejttenyészetben immunhisztokémiai módszer segítségével

Az elvégzett immunhisztokémiai vizsgálatok (4. ábra) alapján a primer májsejttenyészetbe került *Kupffer-sejtek* aránya $6,74 \pm 1,07\%$ -nak adódott (kb. 16:1 hepatocytá:*Kupffer-sejt* arány), jól tükrözve a májból készült primer sejttenyészetekre jellemző fiziológiás sejtarányokat.

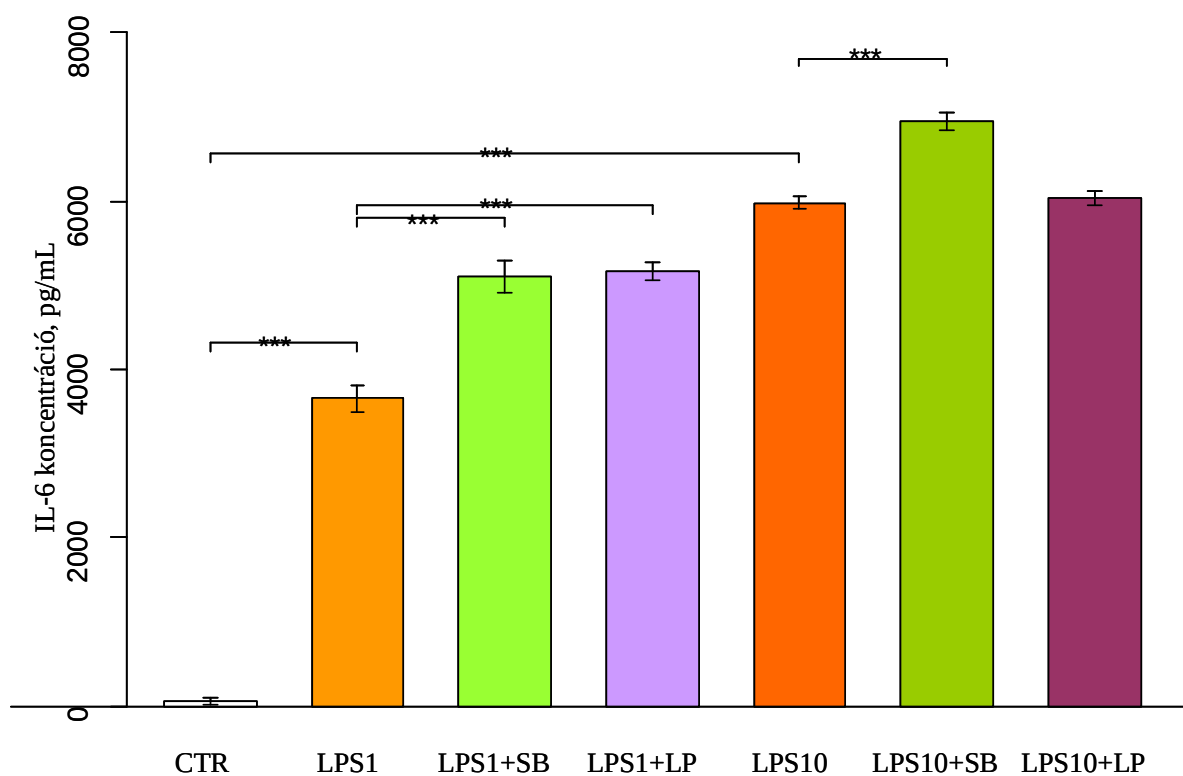


4. ábra: Primer májsejttenyészet képe immunhisztokémiai festést követően (40x nagyítás, bar=50 μ m)

Kék festődés: DAPI, sejtmagok; Zöld festődés: FITC, CD-68 fehérje (*Kupffer-sejtek*)

A tápfolyadék IL-6 koncentrációjának meghatározása ELISA módszer segítségével

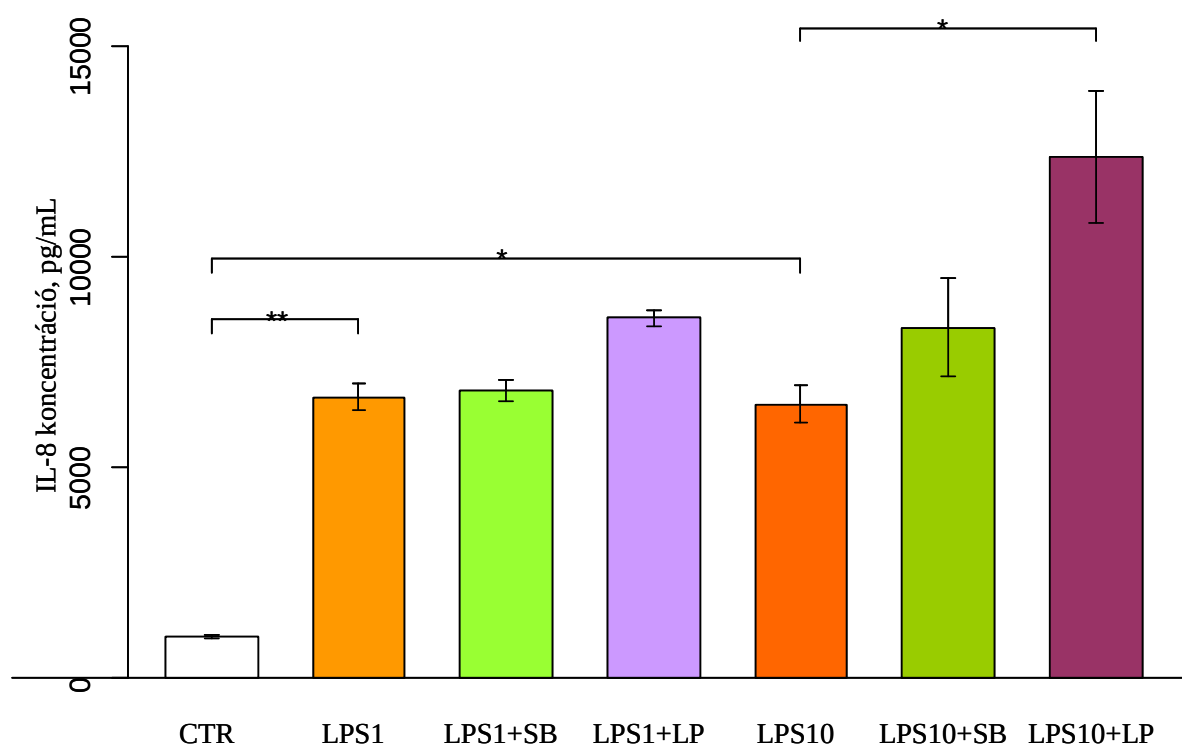
A tápfolyadékban mért IL-6 koncentráció LPS-stimulus hatására mindkét alkalmazott dózis esetén szignifikánsan emelkedett a kontroll tenyészetekhez képest ($P < 0,001$) (5. ábra). Ezekhez viszonyítva viszont az IL-6 koncentrációja sem a butirát, sem az Lp2142 kezelés hatására nem mutatott szignifikáns csökkenést, ellenben mind az 1 $\mu\text{g/ml}$, mind a 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS-sel kezelt tenyészeteken a butirát kezelés hatására az IL-6 koncentráció szignifikánsan emelkedett a csak LPS-sel kezelt sejtekhez képest. Továbbá szignifikáns IL-6 koncentráció emelkedést mértünk az 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS-sel és *L. plantarum* 2142-vel kezelt tenyészetek tápfolyadékában is az LPS kontrollhoz képest ($P < 0,05$) (5. ábra).



5. ábra: A tápfolyadék IL-6 koncentrációjának változása különböző kezelések hatására
CTR=kontroll, LPS1= 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS, LPS10= 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS, SB= 2mmol/l Na-butirát, LP=
13,33% Lp2142 (n=3/csoport, *** $P < 0,001$)

A tápfolyadék IL-8 koncentrációjának meghatározása ELISA módszer segítségével

A kontroll csoporthoz képest az IL-8 szintje a tápfolyadékban mind a két LPS koncentrációval kezelt tenyészetben szignifikánsan megemelkedett (az 1 µg/ml LPS tartalmú csoportnál $P=0,008$, a 10 µg/ml LPS tartalmúnál pedig $P=0,011$) (6. ábra). A különböző gyulladáscsökkentő szerekkel való kezelés után az IL-8 koncentráció sem a butirát, sem az Lp2142-kezelés hatására nem csökkent, sőt a 10 µg/ml LPS-sel kezelt tenyészetben az Lp2142 kezelés további szignifikáns emelkedést váltott ki ($P<0,05$) (6. ábra).



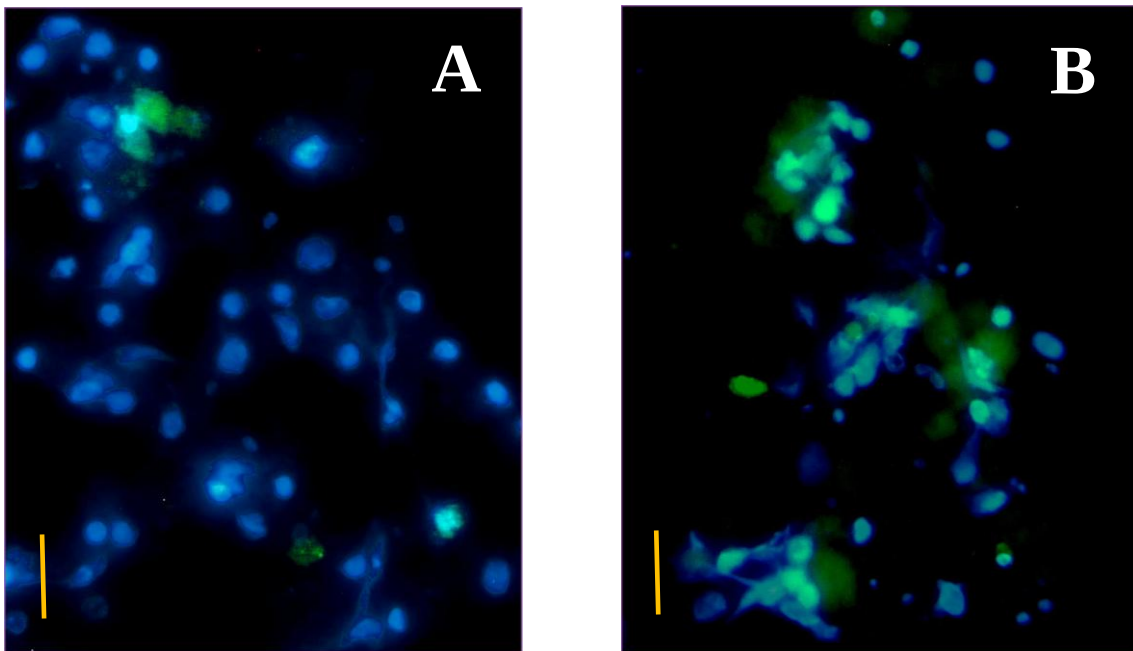
6. ábra: A tápfolyadék IL-8 koncentrációjának változása különböző kezelések hatására
CTR=kontroll, LPS1= 1 µg/ml LPS, LPS10= 10 µg/ml, LPS, SB= 2mmol/l Na-butirát, LP=
13,33% Lp2142 (n=3/csoport, * $P<0,05$; ** $P<0,01$)

2. modell

Sertés eredetű hepatocyta – Kupffer-sejt egyrétegű ko-kultúra

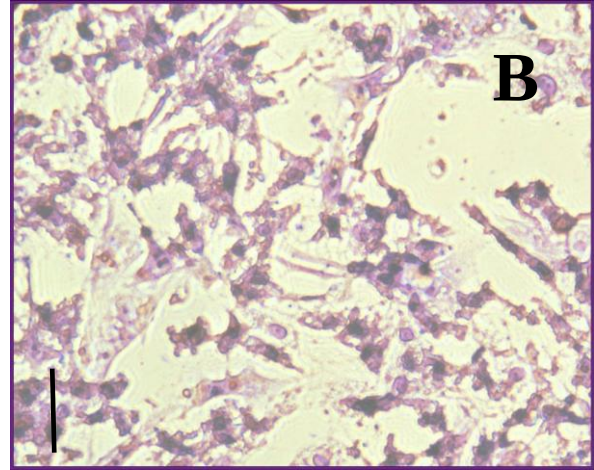
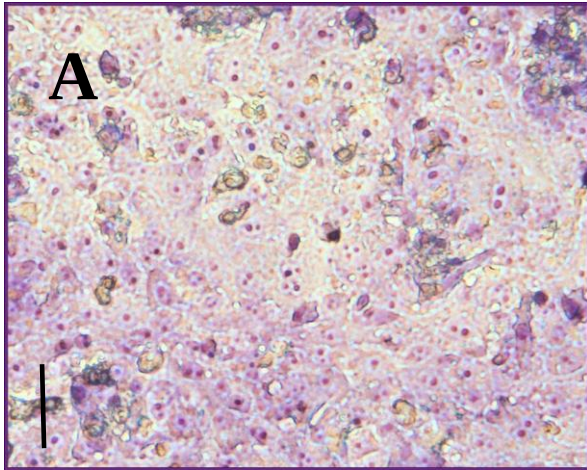
A Kupffer-sejtek arányának meghatározása immunhisztokémiai módszer segítségével

Az immunhisztokémiai vizsgálatok értékelése alapján megállapítható, hogy a 24 órás inkubációt követően a ko-kultúrákban a Kupffer-sejtek és a hepatocyták aránya jó közelítéssel megfelel a sejtek lerakásakor beállított (Hepatocyta:Kupffer-sejt = 6:1, illetve 2:1) sejtaránynak (7. ábra).

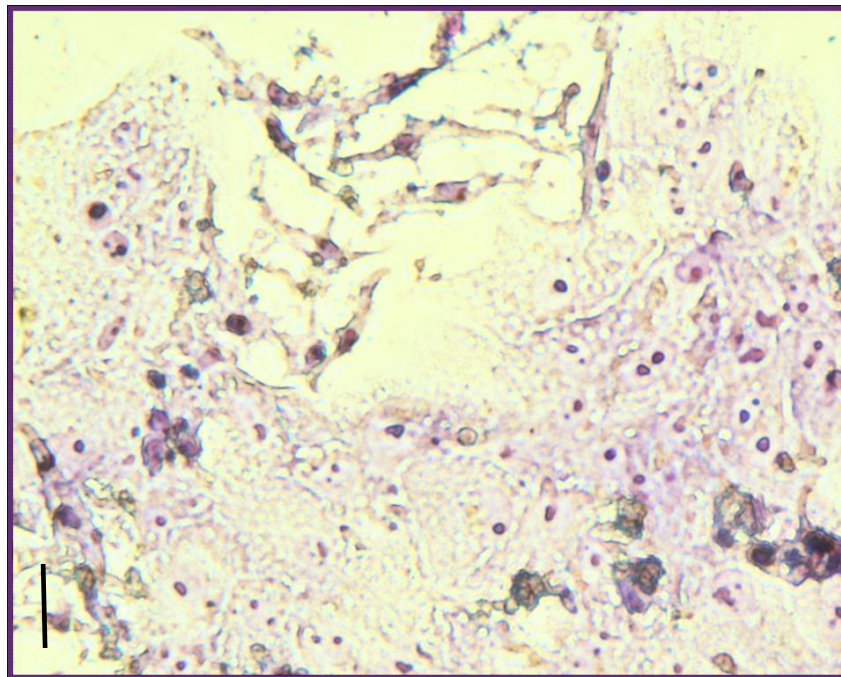


7. ábra: Hepatocyta – Kupffer-sejt egyrétegű ko-kultúra képe immunhisztokémiai festést követően (40x nagyítás, bar=50 μ m). **A.** Hepatocyta:Kupffer-sejt 6:1, illetve **B.** 2:1 sejtarányú tenyészetek (Kék: DAPI, sejtmagok; Zöld: FITC, CD-68, Kupffer-sejtek)

A 6-lyukú lemezekon készített hepatocyta – Kupffer-sejt egyrétegű ko-kultúrákat, illetve a kizárólag májsejtekből vagy Kupffer-sejtekből álló monokultúrákat Giemzával megfestve (8-9. ábra) megállapítottuk, hogy a tenyészetek 24 órás inkubációt követően konfluenssé váltak. A sejtek morfológiája megfelel a sejtípusra jellemző sajátosságoknak, így – az immunhisztokémiai vizsgálatokon túl – a tenyészetek mikromorfológiája is megerősíti, hogy azok alkalmasak további, a gyulladásos folyamatok vizsgálatára irányuló kísérletek végzésére.



8. ábra/A: Hepatocyták-, illetve **B:** Kupffer-sejt monokultúra Giemsa festési eljárással festve (20x nagyítás, bar=100 µm)



9. ábra: Hepatocyták – Kupffer-sejt egyrétegű ko-kultúra (2:1 sejtarány) Giemsa festéssel (20x nagyítás, bar=100 µm)

Megbeszélés

A legtöbb káros anyag hatására az élő szervezetben az immunválasz részeként különböző gyulladásos citokinek által mediált gyulladásos reakció játszódik le. Egyik ilyen gyulladáskeltő anyag a Gram negatív baktériumok sejtfalából felszabaduló LPS, mely akkor indít el immunválaszt, ha a bélcsatornában akár élettani körülmények közt is jelen lévő patogén baktériumok túlságosan elszaporodnak. Ilyenkor a bélfal hámsejtjein található TLR receptorokhoz – melyek közt a legfontosabb LPS felismerő altípus a TLR-4 – kötődik az LPS, melynek hatására egy bonyolult mechanizmuson keresztül aktiválódik a nukleáris faktor- κ B (NF- κ B), amely a különböző gyulladásos citokinek, például IL-6, IL-8, TNF- α szintéziséért felelős transzkripciós faktorként (Armant et al., 2002., Uematsu et al., 2007.) elindítja a gyulladásos válaszreakciót.

A bél eredetű gyulladásos folyamatokkal szembeni védekezésben központi szerepet tölt be a bélhám barrier funkciója, amely szoros összefüggést mutat a bélhámsejtek közti kapcsolat erősségével. Élettani körülmények között a bélhámsejtek felső részén övszerűen körbefutó sejtkapcsoló struktúra, tight junction (*zona occludens*) található, amely olyan szoros kapcsolatot alakít ki a sejtek között, hogy az intercelluláris rés szinte eltűnik. A struktúra különböző integráns membránfehérjék, például okkludin, klaudin komplexéből áll. (Röhlich, 2006.). Gyulladásos citokinek hatására a bélhámsejtek közti tight junction kapcsolatok fellazulnak, helyenként megszakadnak, utat biztosítva a baktériumok, illetve az LPS vérpályába, így a *vena portae*-n keresztül a májba jutásához, ezáltal a máj *in vivo* körülmények között is direkt LPS stimuláló hatásnak lehet kitéve. Ennek *in vitro* vizsgálatára szolgál a mi kísérleteink során is alkalmazott modell, amelyben sertés eredetű primer májsejttenyészetet bakteriális LPS-sel kezelünk, így a közvetlen LPS-stimulus által kiváltott akut gyulladásos folyamatot tanulmányozhatjuk (Morgan, 2001).

Munkánk során különböző, takarmány-kiegészítőként alkalmazható anyagok, így a butirát és az Lp2142 probiotikus baktériumtörzs gyulladáscsökkentő hatását vizsgáltuk. Korábbi kutatások igazolták, hogy a *per os* adott butirát fokozta a fent említett tight junction fehérjék expresszióját, ezzel javította a bélfal barrier funkcióját (Bordin et al., 2004). Leírták továbbá egy humán bélbiopsziátum szövettanén, mint *in vitro* modellen, hogy a butirát gyulladáscsökkentő hatást fejt ki úgy, hogy az LPS által aktivált NF- κ B aktivitásának gyengítésén keresztül csökkenti a gyulladásos citokinek termelődését (Segain et al., 2000). *In vivo* patkány modell kísérletekben a butirát – mint epigenetikusan aktív molekula – csökkentette a TNF- α -termelést az LPS által stimulált neutrophil granulocytákban a hiszton-

deacetiláz enzim aktivitásának szabályozásán keresztül (Vinolo et al., 2011). Hasonló gyulladáscsökkentő hatást írtak le különböző probiotikumok *per os* történő alkalmazása esetén is humán bélbiopátumból származó *in vitro* tenyészetben. (Bäuerl et al., 2012). Ezen kívül IPEC-J2 (sertés eredetű vékonybél sejtvonal) *in vitro* modellen például a *Bacillus licheniformis* csökkentette a *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium által stimulált IL-8 szekréciót (Skjold et al., 2007).

Karunk Gyógyszertani és Méregtani, valamint Élettani és Biokémiai Tanszékének munkatársai a fent említett szerek gyulladáscsökkentő hatását vizsgálták IPEC-J2 monokultúrán, illetve IPEC-J2 és primer hepatocita tenyészetből álló kétrétegű ko-kultúrán, mint enterohepatikus *in vitro* modellen. Vizsgálataik során azt találták, hogy az IPEC-J2 monokultúrán mind az 1, mind a 10 µg/ml LPS-sel kezelt tenyészeteken a butirát, illetve az Lp2142 kezelés hatására is csökkent az IL-8 mennyisége a tápfolyadékban, a csak LPS-sel kezelt tenyészetekhez képest. Az enterohepatikus ko-kultúrán az 1 µg/ml LPS-sel kezelt tenyészetben mind a butirát, mind az Lp2142 kezelés hatására szignifikáns csökkenés mutatkozott az IL-8 szintben. A 10 µg/ml LPS-sel kezelt tenyészeteken butirát hatására mérséklődött a tápfolyadék IL-8 koncentrációja, illetve ebben az esetben mind butirát, mind az Lp2142 kezelés hatására csökkent IL-6 szint volt mérhető (Farkas et al., 2014). Ezek az eredmények szintén az említett szerek gyulladáscsökkentő hatását bizonyítják.

Az *in vivo* körülményeket igen jól modellezi az enterohepatikus ko-kultúra. Az LPS egyrészt direkt stimulálja a bélhámsejteket, melynek hatására azok különféle gyulladásos citokineket termelnek; illetve a sejtek közti kapcsolat is fellazul, így az LPS-felszívódás megnövekszik. A termelődött citokinek (IL-6, IL-8) és a felszívódott LPS a vérpályán keresztül a májba jut, ahol gyulladást indukál. A felszívódott LPS és a bélfal sejtjei által termelt citokinek egyaránt szükségesek a megfelelő mértékű immunválasz kiváltásához és a gyulladás kialakulásához (Pásztai-Gere et al., 2013).

A jelen dolgozat tárgyát képező munkánk során LPS-sel kezelt primer májsejttenyészetben (1. modell) kívántuk a tárgyalt szerek gyulladáscsökkentő hatását vizsgálni. Tehát kísérleteinkben elsősorban a fokozott bélpermeabilitás révén a májba jutó endotoxinok által indukált gyulladás folyamatát modelleztük. Vizsgálataink során különböző koncentrációjú LPS-sel (1 és 10 µg/ml) és butiráttal (2 mmol/l) vagy Lp2142 sejtmentes felülszóval (13,3 %) kezeltünk sertés eredetű primer májsejttenyészeteket, és ELISA tesztel vizsgáltuk a tápfolyadék IL-6, illetve IL-8 mennyiségének változását, összehasonlítva a csak LPS-sel kezelt tenyészetek tápfolyadékának IL-tartalmával. Eredményeink szerint nem tapasztalható a gyulladásos citokinek (IL-6, IL-8) koncentrációjának szignifikáns csökkenése

sem a butirát-, sem az Lp2142-kezelés hatására egyik LPS-koncentráció esetén sem. Ezen adatok tehát nem erősítik meg a vizsgált anyagok gyulladáscsökkentő hatását, szemben az irodalmi forrásokban leírt, más modelleken végzett kísérletek eredményeivel. Ez feltehetően azzal magyarázható, hogy modellünkben kizárólag a hepatocytákat közvetlenül stimuláló LPS által indukált gyulladás folyamatát vizsgáltuk, az egyéb, bél eredetű és szisztémás hatásoktól, így például a bél eredetű citokinek szerepétől elkülönítve.

Kísérletünk eredményének értékelése során fontos kiemelni továbbá, hogy a vizsgált anyagok gyulladáscsökkentő hatásában kulcsszerepet játszik a gyulladás típusa is. Az általunk vizsgált primer májsejttenyészet (1. modell) egy akut gyulladásos folyamatot modellez, azonban ha egy kórok hosszú ideig jelen van, krónikus folyamat veheti kezdetét, melynek során jelentősen megnövekszik a makrofágok, így a májban a *Kupffer-sejtek* száma, amelyek elsősorban felelősek a gyulladásos citokinek termelődésének szabályozásáért, illetve a gyulladást kiváltó kórokok eliminálásáért. Az 1. modellben az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményének kvantifikálásával megállapítottuk, hogy a májsejtek közelében elhelyezkedő, így emiatt a tenyészetbe került *Kupffer-sejtek* aránya megfelelt a májból készített primer sejttenyészetekre jellemző fiziológiás értéknek, így ez a vizsgálati rendszer elsősorban az egészséges májat érő gyors, rövid ideig fennálló gyulladásos stimulus hatásainak vizsgálatára alkalmas.

Így nagy jelentőségű egy olyan egyrétegű ko-kultúra modell létrehozása, melyben a hepatocyták és a *Kupffer-sejtek* arányát tetszőlegesen határozhatjuk meg, a modellezni kívánt gyulladás típusának megfelelően (2. modell). Mi 6:1, illetve 2:1 hepatocytá:*Kupffer-sejt* arányban alakítottuk ki a ko-kultúrát, és ezen sejtarányokat immunhisztokémiai eljárással is ellenőriztük. Huszonnégy órás inkubációt követően a tenyészetek a Giemzával való festést követő mikroszkópos vizsgálat alapján konfluenssé váltak, és az immunhisztokémiai vizsgálat mindegyik esetben az általunk kialakított sejtarányokat igazolta.

Ez a modell az *in vivo* körülményeket jobban tükrözve alkalmas különböző stádiumú krónikus gyulladásos folyamatok, illetve gyulladáscsökkentő anyagok hatásának vizsgálatára, a sejtarányok gyulladás típusától függő tetszőleges változtatásával. További céljaink közt szerepel a primer májsejttenyészetben vizsgált anyagok gyulladáscsökkentő hatásának tanulmányozása ezen, a korábbi vizsgálati modellünknél szélesebb körű vizsgálatokat lehetővé tevő ko-kultúrán.

Összefoglalás

Napjainkban mindinkább előtérbe kerül az alternatív hozamfokozók, így különböző probiotikumok, illetve egyes mikrobiális metabolitok, így a butirát takarmány-kiegészítőként való felhasználása. Korábbi kutatások leírták ezen anyagok bélfalra kifejtett gyulladáscsökkentő hatását, így feltételezhető, hogy más szervekre, így a májra is hasonló hatást gyakorolnak. Munkánk során bakteriális lipopoliszacharidokkal (LPS-sel) kezelt, sertés eredetű primer májsejttenyészetten mint *in vitro* modellen kívántuk vizsgálni a butirát, illetve a *Lactobacillus plantarum* 2142 (*Lp2142*) baktériumtörzs sejtmentes felülúszója által kifejtett gyulladáscsökkentő hatást (1. modell). Mivel a gyulladásos válasz létrejöttében a Kupffer-sejtek központi szerepet töltenek be, kutatásunk további célja létrehozni egy olyan hepatocytá - Kupffer-sejt ko-kultúrát, melyben a két sejttípus aránya tetszőlegesen változtatható, különböző gyulladásos folyamatokat modellezve (2. modell).

A májsejteket 15 kg-os magyar nagyfehér ártány sertések májának *processus caudatus*-ából több lépcsős perfúzió segítségével izoláltuk; a sejteket kollagénnel bevont tenyésztőedényekre raktuk le, és egy nap után a tenyészetek konfluenssé váltak. Az 1. modell esetén a sejteket LPS-sel és nátrium-butiráttal vagy *Lp2142* sejtmentes felülúszóval kezeltük 1 órán keresztül, majd 24 órás inkubálás után a tápfolyadékból ELISA teszt segítségével meghatároztuk két gyulladásos citokin, az IL-6 és IL-8 koncentrációját. Az izolálás során a tenyészetbe került Kupffer-sejtek arányát immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk (macrophag-specifikus CD-68 antigén kimutatása). A 2. modell esetében a hepatocyták izolálása után különböző koncentrációjú percollos oldatok segítségével elkülönítettük a Kupffer-sejteket is, majd a sejttípusokat 6:1, illetve 2:1 arányban (hepatocytá:Kupffer-sejt) tenyésztőedényekre helyeztük. Az arányok ellenőrzését, egyben a ko-kultúra jellemzését immunhisztokémiai eljárással végeztük, az 1. modellhez hasonló módon.

Az 1. modellben a Kupffer-sejtek aránya $6,74 \pm 1,07\%$ -nak adódott, ami összhangban van az irodalmi forrásokban szereplő értékekkel. A tápfolyadékból mért IL-6 és IL-8 koncentráció a csak LPS-sel kezelt kontrollhoz képest – fiziológiás Kupffer-sejt-arány mellett – nem csökkent sem a butirát-, sem az *Lp2142*-kezelés hatására. Ugyanakkor irodalmi adatok szerint *in vivo* körülmények között mind a butirát, mind az *Lp2142* hatékonyan csökkenti a gyulladások során termelődő citokinek mennyiségét. Az *in vitro* és *in vivo* kísérletek közötti különbségekre magyarázatot adhat, hogy a gyulladáscsökkentő hatás nagyban függ a gyulladás típusától. Krónikus gyulladások esetén jelentősen megemelkedik a Kupffer-sejtek aránya a májban, ezért indokolt egy, a megnövekvő Kupffer-sejt-arányt modellező ko-kultúra

(2. modell) létrehozása. Az ezen végzett immunhisztokémiai vizsgálat az általunk beállított sejtarányok meglétét igazolta, és ezáltal alkalmas lehet további gyulladásos folyamatok vizsgálatára.

Summary

Application of alternative growth promoters, such as probiotics and certain microbial metabolites, amongst them butyrate as feed additives is getting more abundant in the animal production. Previous studies have already described the anti-inflammatory effect of these materials on the intestinal wall, therefore presumably they possess similar effect on other organs, e.g. liver as well. In this study, we investigated the anti-inflammatory effect of butyrate and that of the spent culture supernatant (SCS) of *Lactobacillus plantarum* 2142 (*Lp2142*) on primary culture of porcine hepatocytes stimulated with bacterial lipopolysaccharides (LPS) as an *in vitro* inflammatory model (model 1). As Kupffer cells have a central role in establishing inflammatory response, further aim of our investigations was to create such a hepatocyte - Kupffer cell co-culture, in which the ratio of the two cell types can be set, modelling various inflammatory processes (model 2).

Hepatocytes were isolated by multi-step perfusion of *processus caudatus* of the liver, excised from male pigs of the Hungarian Large White breed, weighing 15 kg. Cells were seeded onto culture plates coated by collagen, and cultures became confluent in one day. In case of model 1, cells were treated with LPS and sodium butyrate or the SCS of *Lp2142* for 1 hour, then after 24 hours incubation time concentrations of inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 were determined from culture medium by using ELISA method. Ratio of Kupffer cells in the hepatic cultures was investigated by immunohistochemistry (detection of macrophage specific CD-68 antigen). In model 2, after hepatocyte isolation Kupffer cells were separated by percoll solutions of different concentrations, then both cell types were seeded onto plates in 6:1 and 2:1 ratios (hepatocyte:Kupffer cells). Confirmation of the applied ratios and the characterization of co-cultures was conducted by immunohistochemical method, similarly as in model 1.

In model 1, rate of Kupffer cells was $6.74 \pm 1.07\%$, in accordance with values published in scientific literature. Concentrations of IL-6 and IL-8 in culture medium of hepatocytes with physiological Kupffer cell ratio did not decrease either after butyrate or *Lp2142* treatment compared to control group treated with LPS only. However, according to literature data both butyrate and *Lp2142* are able to effectively decrease the amount of inflammatory cytokines *in vivo*. The fact that anti-inflammatory effect highly depends on the type of inflammation may

provide an explanation for the differences between results of *in vitro* and *in vivo* studies. In case of chronic inflammations, rate of Kupffer cells is significantly increasing in the liver, therefore, establishing a co-culture modelling increased Kupffer cell ratio (model 2) is of special importance. Immunohistochemical investigation performed on this model has justified cell ratios set, thus it can be suitable for the investigation of further inflammatory processes.

Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Mátis Gábornak és Dr. Neogrady Zsuzsanna tanárnőnek elengedhetetlen közreműködéséért, kitartó lelkesítéséért és fáradhatatlan segítségnyújtásáért a dolgozatom létrejöttéhez. Továbbá köszönettel tartozom Kulcsár Annának a statisztikai elemzésekben nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért, illetve Kulcsárné dr. Petrilla Jankának a kísérletek előkészítésében és elvégzésében nyújtott szíves közreműködéséért.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Frenyó V. László tanszékvezető úrnak, hogy bekapcsolódhattam a tanszéki kutatómunkába, illetve az Élettani és Biokémiai Tanszék valamennyi munkatársának a kísérletekben nyújtott segítségét.

Hálámat szeretném kifejezni a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék munkatársainak, köztük külön köszönet Dr. Farkas Orsolyának, a sejtmentes baktériumfelülűszo elkészítéséért és az ELISA mérések során nyújtott segítségéért, Dr. Kővágó Csabának az immunfluoreszcens felvételek készítésében való közreműködéséért, illetve Prof. Dr. Gálfi Péter tanár úrnak a folyamatos szakmai tanácsaiért.

Kutatómunkánk anyagi háttérét részben a 2013. évi 15972. sz. NKB, illetve a 2014. évi KK-UK 15729. sz. Kutatókari pályázat biztosította.

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

Irodalomjegyzék

- 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.
- BALAJTHY Z., ARADI J., CSÖSZ É., SCHOLTZ B., SZATMÁRI I., TŐZSÉR J., AND VARGA T. (2011): Molekuláris terápiák 6. fejezet, Debreceni Egyetem URL: http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_Molekularis_terapiak_hu_book/ch06s03.html, Letöltés időpontja: 2014-11-01.
- BEGUE, J.M., C. GUGUEN-GUILLOUZO, N. PASDELOUP, AND A.GUILLOUZO. (1984.) Prolonged maintenance of active cytochrome P-450 in adult rat hepatocytes co-cultured with another liver cell type. *Hepatology* 4: 839–842.
- BERGMAN, F. N. (1990): Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews*, 70, 567-590.
- 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.
- 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.
- BRAND, R.M., T.L. HANNAH, C. MUELLER, Y. CETIN, AND F.G. HAMEL (2000). A novel system to study the impact of epithelial barriers on cellular metabolism. *Annals of Biomedical Engineering* 28: 1210–1217.
- BÄUERL, C., LLOPIS, M., ANTOLÍN, M., MONEDERO, V., MATA, M, ZÚÑIGA, M., GUARNER, F., AND MARTÍNEZ, G.P. (2013): *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus plantarum* strains downregulate proinflammatory genes in an ex vivo system of cultured human colonic mucosa. *Genes and Nutrition* 8:165–180
- 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.
- CASTELL-AUVI, A., M.J. MOTILVA, A. MACIA, H. TORRELL, C. BLADE, M.

- PINENT, L. AROLA, AND A. ARDEVOL (2010): Organotypic co-culture system to study plant extract bioactivity on hepatocytes. *Food Chemistry* 122: 775–781.
- CARRICO CJ. The elusive pathophysiology of the multiple organ failure syndrome. *Annals of Surgery* 218:109-10, 1993.
- CHANG, P. V., HAO, L., OFFERMANN S, S. AND MEDZHITOV, R. (2014): The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (6): 2247-52
- CHOI, S.H., M. NISHIKAWA, A. SAKODA, AND Y. SAKAI (2004): Feasibility of a simple double layered coculture system incorporating metabolic processes of the intestine and liver tissue: application to the analysis of benzo[a]pyrene toxicity. *Toxicology in Vitro* 18: 393–402.
- DOYLE, J. (2010): A review of Histone Deacetylase inhibitors and their application in veterinary medicine. Szakdolgozat, SzIE ÁOTK, Budapest
- FARKAS O., MÁTIS G., PÁSZTI-GERE E., PALÓCZ O., KULCSÁR A.,
PETRILLA J., CSIKÓ GY., NEOGRÁDY ZS., AND GÁLFI P. (2014): Effects of *Lactobacillus plantarum* 2142 and sodium n-butyrate in lipopolysaccharide-triggered inflammation: Comparison of a porcine intestinal epithelial cell line and primary hepatocyte monocultures with a porcine enterohepatic co-culture system. *Journal of Animal Science* 92, 1-11.
- FERNÁNDEZ-RUBIO, C., ORDÓÑEZ, C., ABAD- GONZÁLEZ, J., GARCIA- GALLEGRO, 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, 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 Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology*, 1, 98-105.
- 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 European Symposium on Poultry Nutrition. WPSA,. Balatonfüred, Hungary.
- FRY, J. R. (1981): Preparation of mammalian hepatocytes. *Methods in enzymology*, 77, 130-137.

- GÁLFI, P., BOKORI, J. (1990): Feeding trial in pigs with a diet containing sodium n-butyrate. *Acta Veterinaria Hungarica*, 38, 3–17.
- GÁLFI, P., CSIKÓ, GY., JERZSELE, Á. (2010): Állatorvosi gyógyszerteran I. , Budapest: Bíró Family Nyomda és Könyvkiadó, 202-250.
- GEHRING, S., DICKSON, E., SAN MARTIN, M., VAN ROOIJEN, N., PAPA, E., HARTY, M., TRACY, T. J. AND GREGORY, S. (2006): Kupffer cells abrogate cholestatic liver injury in mice. *Gastroenterology*, 130:810-822
- GEWIRTZ, A.T., LIU, Y., SITARAMAN, S.V., AND MADARA, J.L. (2002): Intestinal epithelial pathobiology: past, present and future. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 16, 851–867.
- 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.
- 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.
- HARIMOTO, M., M. YAMATO, M. HIROSE, C. TAKAHASHI, Y. ISOI, A. KIKUCHI, AND T. OKANO (2002): Novel approach for achieving doublelayered cell sheets co-culture: overlaying endothelial cellsheets onto monolayer hepatocytes utilizing temperature-responsive culture dishes. *Journal of Biomedical Materials Research* 62: 464–470
- HOWARD, R. B. AND PESH, L. A. (1968): Preparation and partial characterization of intact isolated parenchymal cells from rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 243, 3105–14.
- HU, Z. AND GUO, Y. (2007): Effects of dietary sodium butyrate supplementation on the intestinal morphological structure, absorptive function and gut flora in chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 132, 240-249.
- JACOB AI, GOLDBERG PK, BLOOM N, DEGENSHEIN GA, AND KOZINN PJ (1977): Endotoxin and bacteria in portal blood. *Gastroenterology* 72:1268-70
- KASAI, S. AND MITO, M. (1993): Large-scale cryopreservation of isolated dog hepatocytes. *Cryobiology*, 30, 1-11
- KOLIOS, G., VALATAS, V., AND KOUROUMALIS, E. (2006): Role of Kupffer cells in the

- pathogenesis of liverdisease. *World Journal of Gastroenterology* 12:7413–7420.
- 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.
- MÁTIS G., NEOGRÁDY ZS., CSIKÓ GY., KULCSÁR A., KENÉZ Á. AND HUBER, K. (2013): Effects of orally applied butyrate bolus on histone acetylation and cytochrome P450 enzyme activity in the liver of chicken – a randomized controlled trial. *Nutrition and Metabolism*, 10:120
- MÁTIS G., KULCSÁR A., TUROWSKI, V., FÉBEL H., NEOGRÁDY ZS., HUBER, K. (2014): Effects of oral butyrate application on insulin signaling in various tissues of chickens *Domestic Animal Endocrinology* 50: 26-31.
- MORGAN, E. T. (2001): Regulation of cytochrome p450 by inflammatory mediators: why and how?. *Drug metabolism and disposition*, 29, 207-212.
- NAITO M, HASEGAWA G, EBE Y, AND YAMAMOTO T. (2004.): Differentiation and function of Kupffer cells. *Medical Electron Microscopy* 37:16-28.
- NEUTRA, M. R., PRINGAULT, E. AND KRAEHENBUHL, J. P. (1996): Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annual review of immunology*, 14, 275-300.
- 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.
- RICKE, S. C. (2003): Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobiols. *Poultry Science*, 82, 632-639.
- ROBBINS (2009): A patológia alapjai, Budapest: Medicina Könyvkiadó, 117-147, 703-743
- ROHLICH, P. (2006): Szövektan. 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.

- SAKATA, T. (1987): Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors, *British Journal of Nutrition*, 58, 95-103.
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 149, 217.
- SEGAIN, J. P., RAINGEARD DE LA BLÉTIČRE, D., BOURREILLE, A., LERAY V., GERVOIS, N., ROSALES, C., FERRIER, L., BONNET, C., BLOTTIČRE, H. M., AND GALMICHE, J.P. (2000): Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*, 47, 397-403.
- SKJOLAAS, K. A., T. E. BURKEY, S. S. DRITZ, AND J. E. MINTON. (2007): Effects of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, or serovar Choleraesuis, *Lactobacillus reuteri* and *Bacillus licheniformis* on chemokine and cytokine expression in the swine jejunal epithelial cell line, IPEC-J2. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 115:299–308.
- SUNMAN, JA., HAWKE, RL., LECLUYSE, EL., AND KASHUBA, AD. (2004): Kupffer cell mediated IL-2 suppression of CYP3A activity in human hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*, 32:359-363
- VAN BOSSUYT H. AND WISSE E. (1988): Cultured Kupffer cells, isolated from human and rat liver biopsies, ingest endotoxin. *Journal of Hepatology*, 7:45-56,
- 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.
- VINOLO, M. A., H. G. RODRIGUES, E. HATANAKA, F. T. SATO, S. C. SAMPAIO, AND R. CURI. (2011): Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 22:849–855
- 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.