

TDK dolgozat



Állatorvostudományi Egyetem

Élettani és Biokémiai Tanszék

Biokémiai Osztály

A baicalin és a dezoxinivalenol hatásának vizsgálata csirke eredetű háromdimenziós májsejttenyészeteken

Készítette:

Batta Laura Nóra

Témavezetők:

Vörösházi Júlia (PhD hallgató)

Dr. Mátis Gábor (egyetemi docens)

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	2
Bevezetés.....	3
Irodalmi áttekintés.....	4
A trichotecénvázas mikotoxinok szerkezete, csoportosítása	4
A DON metabolizmusa.....	5
A DON sejtszintű hatásai.....	5
Baicalin.....	6
3D sejtenyésztés	7
Célkitűzések	9
Anyag és Módszer.....	10
Kísérleti állatok, vegyszerek.....	10
Az oldatok előkészítése	10
A csirke májsejtek és nem-parenchimális sejtek izolálása	11
A 3D sejtenyészetek kialakítása és kezelése	12
A metabolikus aktivitás mérése	13
A sejtkárosodás mérése.....	13
Gyulladásos paraméterek mérése	13
Statisztika	15
Eredmények.....	16
Metabolikus aktivitás mérése	16
Sejtkárosodás mértékének vizsgálata	17
Interleukin-6	19
Interleukin-8	20
Interferon- γ	22
Diskusszió.....	24
Absztrakt	28
English Abstract	30
Források.....	32

Rövidítések jegyzéke

2D	Kétdimenziós
3D	Háromdimenziós
ANOVA	varianciaanalízis, analysis of variance
BAI	Baicalin
BSA	Szarvasmarha szérum albumin, Bovine Serum Albumin
CCK-8	Cell Counting Kit-8
DON	Dezoxinivalenol, vomitoxin
DON-3s	Dezoxinivalenol-3-szulfát
ECM	Extracelluláris mátrix
EGTA	Etilén-glikol-tetraacetát
ELISA	Enzimhez kötött immunszorbens próba, Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FBS	Magzati szarvasmarha szérum, Fetal Bovine Serum
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
IFN- γ	Interferon gamma
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
INT	Jód-nitro-tetrazólium só
LDH	Laktát-dehidrogenáz
LPS	Lipopoliszacharid
MHC	Fő hisztokompatibilitási komplex, major histocompatibility complex
MS	Mycofix Select
NF- κ B	Nukleáris faktor kappa-B
NK	Természetes ölüsejt, natural killer
NP	Nem parenchimális
ROS	Reaktív oxigéngyökök, reactive oxygen species
sIL-6R α	Vízoldható Interleukin-6 Receptor α , Soluble Interleukin-6 Receptor α
Th	T-helper sejt
TNF- α	Tumor nekrozis faktor α
WST-8	Vízoldható tetrazólium só, Water Soluble Tetrazolium Salt-8

Bevezetés

A mikotoxinok a gombák által termelt másodlagos anyagcseretermékek, melyek közül kiemelkedő fontosságúak az egyes *Fusarium* fajok által termelt trichotecén vázas mikotoxinok. Ezen vegyületek jelentősége abban rejlik, hogy a *Fusarium* fajok világszerte jelen vannak, így a gabonamagvakat gyakran szennyezhetik. Ilyen trichotecén vázas mikotoxin a dezoxinivalenol (DON, vomitoxin) is. Habár a DON a legkevésbé akut mérgezést okozó trichothecén vázas vegyület, hatása éppen gyakori előfordulása miatt nem elhanyagolható. A csak kis mennyiségű DON-nal szennyezett takarmány fogyasztása csökkenő takarmányfelvételhez vezethet, míg nagyobb koncentrációban már fogyást, emésztőrendszeri zavarokat és immunszuppressziót is okozhat [1]. Fő sejtszintű hatása a fehérjeszintézis gátlása a peptidil-transzferáz enzim megkötésén keresztül. Emellett reaktív oxigéngyökök (reactive oxygen species, ROS) képződésének serkentésén keresztül oxidatív stressz kialakulását okozhatja, károsíthatja a sejtmembránok integritását, illetve gyulladásos folyamatok beindulásához vezethet [2].

A baicalin (BAI) a bajkáli csucsóka (*Scutellaria baicalensis*) gyökeréből izolált flavonoid, melynek számos különböző terápiás hatása ismert. Ennek a vegyületnek nem csak antioxidáns és gyulladáscsökkentő, de antimikrobiális és daganatellenes hatását is leírták már [3].

TDK munkám során a DON gyulladásra gyakorolt, illetve a BAI protektív hatását vizsgáltuk csirke eredetű háromdimenziós (3D) májsejttenyészeteken, melyet mágneses 3D bioprinting módszerrel hoztunk létre. Mindehhez vizsgáltuk a sejtek életképességét, illetve a gyulladásos folyamatok mérése céljából egyes citokinek, az interleukin-6 (IL-6), az interleukin-8 (IL-8) és az interferon- γ (IFN- γ) mennyiségét is meghatároztuk.

Irodalmi áttekintés

A trichotecénvázas mikotoxinok szerkezete, csoportosítása

A trichotecénvázas mikotoxinokat különböző *Fusarium* gombafajok termelik. Ebbe a genusba a szaprofitáktól egészen a növényeket megbetegítő parazitikus fajokig tartozó gombákat sorolunk [4]. A trichotecénvázas mikotoxinok mind illékony, alacsony molekulatömegű szeszkviterpén epoxidok, amelyek egy triciklikus mag köré épülnek. Ez a szerkezet adja a trichotecén vázat. A toxicitásért felelős oldalláncok az epoxidok, amelyeket a C₁₂-n és C₁₃-on találhatunk. A toxicitásukat tovább fokozza a C₉₋₁₀ között található kettőskötés [5].

A trichotecénvázas mikotoxinokat négy csoportra (A, B, C, D) bonthatjuk kémiai tulajdonságaik alapján, illetve a termelő gombafajok szerint. A *Fusarium* fajok termelik az A és B csoportba tartozó toxinokat, amelyek szerkezetében a C₈-on oxigén vagy karbonil funkció csoport található. Az A típusba tartozik többek között a T-2 toxin és a diacetoxiszkirpenol, míg a B típusba például a nivalenol és az általunk is vizsgált DON. A C típusba tartozó toxinok tartalmazzak egy második epoxid csoportot a C_{7,8} vagy a C_{9,10} helyzetben, mint például a crotocint. A D típusba azokat a toxinokat soroljuk, amelyek a C₄ és C₅ között egy makrociklikus gyűrűt tartalmazzak két észterkötéssel. Ilyen például a verrucarín [6]. Több felmérés is azt mutatta, hogy az A és B-típusú trichotecénvázas mikotoxinok gyakrabban előfordulnak a gabonák és takarmánynövények szennyező anyagaként, mint a makrociklikus gyűrűt tartalmazó típusok [4]

Dezoxinivalenol (vomitoxin, DON)

A *Fusarium* nemzetségben olyan gabonamagvakon megtelepedő gombafajok találhatóak, melyek világszerte elterjedtek. E gombák több különböző másodlagos anyagcseretermék, többek között különféle mikotoxinokat termelnek, melyek közül kiemelkedő jelentőségű a trichotecénvázas DON. Annak ellenére, hogy a DON-ra nem jellemző az akut mérgezéses tünetek megjelenése, hatásainak vizsgálata mégis fontos, mivel az egyik leggyakrabban előforduló szántóföldi toxin világszerte. A szárnyasok jellemzően kevésbé érzékenyek az egyes mikotoxinok hatásaira, mint egyes emlősfajok, például a sertés. Ez valószínűleg az egyes toxinok metabolizmusának és szervezetből történő gyors kiürítésének köszönhető [7]. Ennek ellenére a DON-koncentráció és a kitettség mértékétől függően mégis tapasztalhatunk bizonyos tüneteket a toxinnal fertőzött gabona fogyasztása után. DON-t kisebb koncentrációban tartalmazó takarmány felvétele esetén gyomor-bélrendszeri irritációt és szöveti elhalást,

hányást, étvágy csökkenését és kisebb mértékű súlygyarapodást is tapasztalhatunk, míg magasabb koncentrációban súlyvesztést, a vérképzőszervek és a nyirokszervek károsodását, ebből fakadóan pedig akár az állat fertőzésekkel szembeni ellenállóképességének csökkenését is okozhatja [1].

A DON metabolizmusa

Az állatok szervezete rengeteg xenobiotikummal találkozik, melyek csak igen kis arányban hagyják el a szervezetet átalakítás nélkül. A gyorsabb kiválasztás érdekében szükséges a biotranszformációjuk, amelyhez általában egy vagy többféle enzimre van szükség. Ezeknek az enzimek többsége a májban termelődik, mivel a máj az egyik legfontosabb szerepet betöltő szerv a testidegen anyagok átalakításában. A metabolizmus során lejátszódó folyamatokat két fázisra bonthatjuk, ahol az első fázis jelenti az oxidációt, redukciót vagy hidrolízist, míg a második a konjugációs reakciókat [8].

A DON lebontása *in vivo* a különböző állatfajokban eltérően játszódik le, ebből is fakadhat az érzékenységbeli különbség. Alapvetően a két fő módja a bél mikrobióta által végzett lebontás, illetve a májban zajló konjugáció, amely során képződhet glükozid, glükoronidés szulfát metabolit is. Csirkékben a legfőbb út a szulfátos konjugáció és a mikrobióta által történő lebontás, míg utóbbi sertésben igen kis jelentőséggel bír. A madarak esetében a DON legfontosabb metabolitja a dezoxinivalenol-3-szulfát (DON-3S), mely átalakulás aránya eltérő az egyes baromfifajokban [9].

A DON sejtszintű hatásai

A DON fő sejtszintű hatása a peptidil-transzferáz enzim megkötésén keresztül a fehérjeszintézis gátlása. Emellett a ROS-termelődés fokozásával oxidatív stressz kialakulását indukálhatja, amely fokozott lipidperoxidációhoz, DNS károsodáshoz, a gyulladásos folyamatok fokozódásához, és akár apoptózishoz vezethet [10]. A gyulladásos folyamatokat dózis- és kitettségfüggő módon befolyásolhatja [11]. A gyulladás egy komplex válasza a veleszületett immunrendszernek, amelynek szerepe a szervezetet ért káros hatások elleni védekezés és a sérült szövetek helyreállításának segítése.

Az immunrendszer sejtjei közül a makrofágok, a T-sejtek és a B-sejtek a trichothecénvázis mikotoxinok fő célpontjai. A koncentráció, illetve a kitettség időtartamától függően a toxinok stimulálhatják vagy szuppresszálhatják is az immunrendszert [12]. A magasabb koncentráció a leukociták pusztulásához, míg az alacsonyabb koncentráció több gyulladásos folyamatokkal

összefüggő gén expressziójának, illetve gyulladásos citokinek és kemokinek termelésének emelkedését váltja ki [7].

A folyamat egyik fő eleme az IL-6, melyet a T-helper (Th) sejtek termelnek [13]. Az IL-6 legfontosabb hatásai az akut gyulladás kiváltása akut fázis fehérjék segítségével, továbbá a B-sejtek, a makrofágok és a T-sejtek aktiválásának és differenciálódásának, illetve az ellenanyagok termelésének serkentése. Az akut fázis fehérjéket elsősorban a máj termeli és feladatuk például a komplement rendszer aktiválása, a gyulladásos citokinek termelésének serkentése és a neutrofil kemotaxis kiváltása [14].

Az IL-8 egy fagociták és mezenchimális sejtek által termelt citokin. A termelését valamilyen gyulladásos inger váltja ki, majd a kemotaxis, a degranuláció és az oxidatív stressz serkentésével aktiválja a neutrofil granulocitákat [15].

Az IFN- γ igen sokrétű szereppel rendelkező citokin. Mind a veleszületett, mind pedig a szerzett immunitásban fontos molekula, mivel vírus-, baktérium- és daganatellenes hatással is rendelkezik. Szükséges a különböző immunsejtek megfelelő éréséhez és működéséhez, növeli a makrofágok és a dendritikus sejtek fő hisztokompatibilitási komplex (MHC - major histocompatibility complex) termelését, ezáltal pedig serkenti az antigénprezentációt. IFN- γ -t termelnek a natural killer (NK) sejtek is a fertőzések korai szakaszában, amely tovább serkenti ezen sejtek aktivitását és a sejtes immunválasz létrejöttét [16].

Baicalin

A bajkái csucsóka (*Scutellaria baicalensis*) egy régóta és széleskörben használt gyógynövény, melynek gyökeréből kivonható flavonoid vegyület a baicalin (BAI) [17]. A BAI-nak antioxidáns, gyulladáscsökkentő, antibakteriális és immunerősítő hatása is ismert, mely tulajdonságai miatt számos különböző betegség kezelése során használható, mint például a tüdőgyulladás, a hepatitis vagy az érelmeszesedés [18]. Előzetes kutatások során kimutatták protektív hatását mikotoxikózisokkal szemben is, mely során csökkentette az oxidatív stressz és a gyulladásos folyamatok mértékét [18]. Sertésben vizsgálták DON-nal szemben kifejtett hatását is, mely kutatás során azt tapasztalták, hogy csökkentette az oxidatív stressz és egyes gyulladásos paraméterek mennyiségét [19].

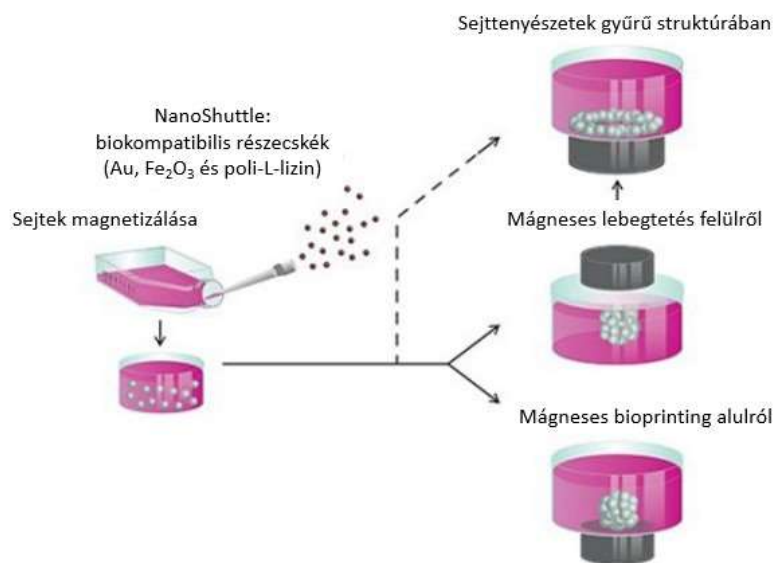
Korábbi kutatások igazálták, hogy a BAI rendelkezik terápiás hatással az autoimmun hepatitiszrel szemben, illetve azt, hogy bizonyos koncentrációban alkalmazva enyhítette a máj károsodást a tumor nekrosis faktor α (TNF- α) és az IFN- γ szintjének csökkentésével [20]. Sun

és kutatócsoportja patkányokban CCL₄ segítségével idézett elő májfibrózist, illetve az erre gyakorolt hatását vizsgálták a baicalinnak. A kísérlet során azt tapasztalták, hogy a BAI képes volt gátolni a fibrózist azáltal, hogy csökkentette a hialuronsav, laminin és a prokollagén-III szintjét. Továbbá vizsgálták az aszpartát-aminotranszferáz és az alanin-aminotranszferáz szintjét is, amelyek BAI hatására szignifikánsan csökkentek, ezzel is bizonyítva, hogy segítette a máj regenerációját, hiszen vélhetően az antifibrotikus hatásnak köszönhető ez a javulás. Fontos azonban kiemelni, hogy a májfibrózis helyreállítása egy igen lassú folyamat [21].

A BAI jótékony hatását a bakteriális fertőzések során is kimutatták már. A baromfi ágazatban hatalmas károkat tud okozni a *Mycoplasma gallisepticum* fertőzés az állományban, emiatt is fontos lehet egy immunstimuláns, mint takarmánykiegészítő. A kutatások szerint a BAI képes volt csökkenteni a nukleáris faktor kappa-B (NF- κ B) jelpályát a Toll-like receptor 4-en keresztül lipopoliszacharid (LPS) által indukált fertőzés esetében csirke májban. Ezen felül 7 napig adagolt BAI csökkentette a csirkék légúti gyulladását *Mycoplasma gallisepticum* fertőzés esetén [20].

3D sejtenyésztés

A tudományos kutatások nagy része ma már elképzelhetetlen lenne *in vitro* vizsgálatok nélkül, melyeknek egyik legfontosabb módja a különböző sejt kultúrák létrehozása. A sejt kultúrák lehetnek hagyományos kétdimenziós (2D), vagy az utóbbi években elterjedt 3D tenyészetek is. Előbbi gyors, könnyen megismételhető és költséghatékony módszer, azonban nem ad teljesen hiteles képet, ennek ellenére még mindig széles körben használatosak. A hagyományos egyrétegű májsejtenyészetekben a sejtek gyakran elveszítik az *in vivo* jellemző fenotípusukat és differenciáltságukat, melynek oka valószínűleg az, hogy a sejtek a táptalajra kitapadnak, így a sejt-sejt kapcsolatok és az extracelluláris mátrix (ECM) kialakulása korlátozott. Mivel az élő szervben a májsejtek kapcsolata és karakterisztikája igen szerteágazó, így az egyrétegű sejtenyészetek néhány tekintetben nem képesek megfelelően modellezni annak működését [22]. Emiatt fejlesztették ki az ún. szendvics tenyészeteket, mely sok szempontból jobban megfelelt a májsejtek tenyésztéséhez. A szendvics tenyészet létrehozásánál a sejteket két réteg mátrix közé helyezik, így azok alakja és funkciója jobban hasonlít az *in vivo* körülményekhez. Így a májsejtek esetében képesek a hosszantartó albumintermelésre, a polaritásuk megőrzésére, így akár az epecsatornácskák létrehozására is, amely igen fontos lehet a különböző gyógyszeres kutatások során. Azonban igazán új lehetőségeket a biokémiai és biomechanikai folyamatok vizsgálatára a 3D sejtenyészetek voltak képesek nyitni [23]. Ezekben a kultúrákban



*1. ábra: A mágneses sejtenyésztés egyes módszerei. A sejtek magnetizálása után azok 3D struktúrákba rendezhetők. A módszerek közötti alapvető különbség a mágnes elhelyezkedése.
Forrás: White Paper M3D Cell Culture: Biocompatibility of Nanoshuttle-Pl and the Magnetic Field (Greiner Bio-One)*

a sejtek képesek megőrizni az élettani körülmények között jellemző fenotípusukat és differenciáltságukat, melynek köszönhetően változatos sejtek közötti, és sejt-ECM kapcsolatok jöhetnek létre [24]. A 3D tenyészetek kialakítására sokféle módszer létezik, többek között a függőcsepp módszer, a „hydrogel” és az általunk is alkalmazott mágneses 3D bioprinting. A függőcsepp módszer esetén a sejtek a folyadék és a levegő határán csoportosulnak egyetlen gömböt eredményezve. Ezzel a módszerrel létrehozott tenyészetek esetében nagyobb fokú gázcserét figyeltek meg [25]. A „hydrogel” környezetben tenyésztett sejtek esetében egy vízzel duzzasztott polimerből álló hálózatot hozunk létre, amely realisztikusan leképezi a sejtek mikrokörnyezetét, így segítve a sejtek egymáshoz való tapadását [26]. Az általunk használt mágneses 3D bioprinting módszer során a kívánt 3D struktúrát külső mágneses erővel alakítjuk ki. Ehhez a sejteket magnetizálni kell, melyhez aranyból, vas-oxidból és poli-L-lizinenből álló nanorészecskéket használunk. Ezek a részecskék a poli-L-lizinen keresztül kötődnek a sejtek membránjához, melyek ezt követően specifikus mágneses drive-ok segítségével szferoidokba rendezhetők. A nanorészecskék bizonyítottan biokompatibilisek, a mágneses erő hatására történő térbeli rendeződés pontosan szabályozható és nem befolyásolja a sejt működést [27].

Célkitűzések

Kutatásunk során csirke eredetű 3D májsejt-nem parenchimális (NP) sejt mágneses bioprinting módszerrel létrehozott ko-kultúrákon vizsgáltuk a DON sejtkárosító és gyulladásra gyakorolt, illetve a BAI védő hatásait. Célunk volt a gyulladás és annak szerepének, hatásainak vizsgálata a májsejtekre, ebből következtetve a szervre és a teljes szervezetre gyakorolt hatásaira. Ezen felül pontosabb képet szeretnénk volna nyerni mind a DON, mind a BAI sejtszintű hatásairól a mikotoxinok jelentős gazdasági károkozásának jövőbeli fékezése érdekében, mivel ennek a teljes körű kivédésére nincsen jelenleg lehetőségünk.

Kutatásunk során mindamellet, hogy e két természetes vegyület hatásait vizsgáltuk, szeretnénk volna felmérni azt is, hogy ezeknek a koncentrációbeli változásuk milyen módon és mértékben képes egymás hatását kioltani.

Mindezeket szeretnénk volna az *in vivo* körülményekhez lehető legközelebb álló módon kivitelezni, emiatt választottunk 3D vizsgálati modellt, mindezzel tudományosan megalapozva a BAI, mint potenciális baromfitakarmány-kiegészítő alkalmazását további lehetséges *in vivo* kutatások elvégzése után.

Anyag és Módszer

Kísérleti állatok, vegyszerek

A kísérlet során felhasznált vegyszereket a Merck KGaA-tól (Darmstadt, Germany) szereztünk be a később kiemelt kivételektől eltekintve. Az állatokon történő beavatkozások mind a nemzetközi, mind a hazai jogszabályoknak megfelelően, az intézményi irányelveket betartva, a budapesti Állatorvostudományi Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága (MAB) és a Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Osztálya által is jóváhagyva történtek. Mivel az állatok semmilyen *in vivo* kezelésen nem estek át és beérkezés után azonnal felhasználásra kerültek, így a MAB állásfoglalása alapján állatvédelmi engedély nem volt szükséges.

Az oldatok előkészítése

A kísérletet megelőzően elsőként a sejtizoláláshoz szükséges pufferoldatokat készítettük elő, melyek a következők voltak:

- 150 ml etilén-glikol-tetraacetát (EGTA) (0,5 mmol/l) tartalmú HBSS (Hanks Balanced Salt Solution)
- 150 ml EGTA-mentes HBSS
- 100 ml IV. típusú kollagenáz tartalmú oldat, kiegészítve 7 mmol/l MgCl_2 és 7 mmol/l CaCl_2 oldattal

A HBSS törzsoldat steril desztillált vízzel történő tízszeres hígítását követően 4,7 ml 7,5%-os NaHCO_3 -t adtunk 1000 ml pufferhez. A HBSS-t tartalmazó EGTA előkészítéséhez 1,052 ml EGTA-t kevertünk 200 ml pufferoldathoz a 0,5 mmol/l-es koncentráció beállítása érdekében. A kollagenáz tartalmú oldatot 100 ml HBSS, 1 ml 7mmol/l koncentrációjú MgCl_2 , 1 ml ugyanilyen koncentrációjú CaCl_2 és 250 mg IV típusú kollagenáz összekeverésével állítottuk elő. Ezeket az oldatokat közvetlenül a felhasználás előtt átbuborékolattuk 11/perc áramlási sebességű Carbogennel (5% CO_2 és 95% O_2). Emellett kiegészítettük a sejtek tápfolyadékául szolgáló Williams Medium E oldatot 0,22% NaHCO_3 -val, 50 mg/ml gentamicinnel, 2 mmol/l glutaminnal, 4 $\mu\text{g/l}$ dexametazonnal, és 20 IU/l inzulinnal; továbbá az oldat feléhez 5% magzatiszarvasmarha szérum (fetal bovine serum – FBS) adtunk.

A csirke májsejtek és nem-parenchimális sejtek izolálása

A májsejteket és nem-parenchimális (NP) sejteket 6 hetes hímivarú Ross-308 típusú brojlercsirkékből (Gallus Kft., Devecser, Magyarország) izoláltuk, a kutatócsoportunk által már korábban kifejlesztett módon [28]. A CO₂-vel történő bódítást követően az állatot dekapitáltuk és hátfekvésben rögzítettük. A ventrális területől a tollakat eltávolítottuk, és laparotómiát végeztünk. A máj perfúziójához a *vena gastropancreaticoduodenalis*-t kanüláltuk, mely befolyó ágként funkcionált, míg a pufferek elvezetéséhez a jobb pitvarba vezettünk be egy üvegkanült.

A perfúzió során háromlépcsős rendszert alkalmaztunk. Az oldatokat végig 40°C-on tartottuk, és 30 ml/min áramlási sebességet alkalmaztunk. A kalcium és magnézium eltávolításához a májat elsőként 150 ml 0,5 mmol/l koncentrációjú EGTA tartalmú HBSS pufferoldattal mostuk át. Az EGTA egy kelátképző vegyület, amely megköti a magnézium- és kalciumionokat, ezáltal segít fellazítani a sejtek közötti kapcsolatokat, így megkönnyíti a szövet szétesését és a sejtek izolálását. Ezt követően a májat átöblítettük 150 ml EGTA-mentes HBSS oldattal, hogy eltávolítsuk az esetlegesen ott maradó EGTA-t, melyet 100 ml kollagenázoldattal történő mosás követett. A kollagenáz a sejtek közötti extracelluláris mátrix lebontásáért felelős. A kifolyó kollagenáz oldatot egy steril tripszinező lombikban gyűjtöttük, és addig recirkuláltattuk, amíg a máj szerkezete fel nem bomlott. A szervet ezt követően steril főzőpohárba helyeztük, és a további lépéseket steril környezetben, jégen tartva végeztük el.

A Glisson-tokot felvágtuk, és a májat 50 ml szarvasmarha szérum albuminnal (bovine serum albumin – BSA) (2,5%) kiegészített jéghideg HBSS pufferbe helyeztük. A BSA segíti a sejtek szétválását, illetve gátolja a már szétvált sejtek összekapcsolódását. A szuszpenziót ezután az emésztetlen *interstitium* és a sejtaggregátumok eltávolítása érdekében átszűrtük három réteg steril gézen egy BSA-tartalmú HBSS-t tartalmazó steril centrifugacsőbe, majd további 50 percig inkubáltuk jégen hűtve.

A sejtszuszenzióból háromlépcsős centrifugálással különítettük el a májsejteket. Elsőként BSA-val kiegészített HBSS-ben 3 percig alacsony fordulatszámon (100×g) centrifugáltuk a szuszpenziót, majd a következő két centrifugálás során a kapott üledéket az előzőleg elkészített, FBS-tartalmú Williams Medium E tápfolyadékban reszuszpéndáltuk, és szintén 3 percig 100×g-n centrifugáltuk. A keletkezett felülszót mindhárom lépés után steril edénybe gyűjtöttük. A harmadik centrifugálás során kapott üledéket végül szintén reszuszpéndáltuk FBS-tartalmú Williams Medium E tápfolyadékban, és így egy májsejtekben gazdag sejtszuszenziót kaptunk.

A májsejtek életképességét és a teljes sejtszámot Bürker-kamrában, tripánkékes festéssel határozzuk meg. Ehhez 200 µl tömény sejtsuszpenziót 800 µl Williams Medium E-vel hígítottunk, majd ennek 200 µl-jéhez ugyanekkora mennyiségű tripánkékes festéket adtunk. Ezzel a festéssel az élő és elpusztult sejtek elkülöníthetőek, mivel a tripánkékes csak azokba a sejtekbe tud bejutni, amelyek membránjának integritása sérült, azaz az életképtelen sejteket kékre színezi. Ezt követően meghatároztuk az élő és elpusztult sejtek arányát, amely 90% feletti volt, így a szuszpenziót a sejtenyészetek kialakítására alkalmasnak találtuk. A tömény sejtsuszpenziót végül 10^6 sejt/ml koncentrációjára hígítottuk.

Következőként a májsejtek centrifugálása során kapott felülúszót centrifugáltuk, hogy a nem-parenchimális (NP) sejteket is el tudjuk különíteni. Először $350\times g$ -n 10 percig centrifugáltuk, majd a kapott felülúszót tiszta centrifugacsőbe öntöttük, és $800\times g$ -n 10 percig centrifugáltuk. A kapott üledékeket 5 ml FBS-tartalmú Williams Medium E-ben reszuszpendáltuk, így egy NP sejtben gazdag szuszpenziót kaptunk. Az életképességet és a teljes sejtszámot a korábban ismertetett módon, Bürker-kamra és tripánkékes festés segítségével határoztuk meg. A végső koncentrációt 10^6 sejt/ml-re állítottuk be hígítással. Ezt követően 60 ml májsejt szuszpenziót összekevertünk 10 ml NP sejt szuszpenzióval, így létrehozva 70 ml ko-kultúra szuszpenziót, melyben a hepatocita : NP sejt arányt 6:1-re állítottuk be.

A 3D sejtenyészetek kialakítása és kezelése

A mágneses háromdimenziós sejtenyészetek kialakításához szükséges specifikus eszközöket és anyagokat a Greiner Bio-One Hungary Kft. (Mosonmagyaróvár, Magyarország) biztosította. A sejtek magnetizálásához 1000 µl mágneses nanorészecskét (NanoShuttleTM-PL) adtunk 10 ml sejtsuszpenzióhoz (1:10 arányban).

A sejteket ezt követően 96-lyukú sejttaszító tenyésztőedényekre raktuk le (100 µl/lyuk), és inkubáltuk 1 órán keresztül 37°C -on. Ez idő alatt a NanoShuttleTM-PL részecskék kötődtek a sejtek membránjához. Ezután a lemezt egy ún. Spheroid Drive-ra helyeztük, amelyen a lemez minden lyuka alatt egy kicsi mágnes található. Ezek a mágnesek a lyukak közepére vonzzák a magnetizált sejteket, ahol azok 3D struktúrákba rendeződnek. A lemezt a Spheroid Drive-val együtt inkubáltuk 37°C -on 48 órán keresztül. 24 óra után a tápfolyadékot szérumentes tápfolyadékokra cseréltük, amihez egy ún. Holding Drive-ot használtunk. Ezen a Drive-on 4-4 lyuk között egy-egy nagyobb mágnes van, melyek kihúzzák a szferoidokat a lyukak szélére és ott tartják azokat, amíg a tápfolyadékcseré zajlik.

Az inkubáció letelte után a sejteket 2 különböző koncentrációjú (2, 20 µl/ml) DON oldattal és 3 különböző koncentrációjú (5, 15, 45 µl/ml) BAI oldattal kezeltük. A kezelt sejtenyészeteket 37°C-on 24 órán keresztül inkubáltuk, majd mintát vettünk a sejtek tápfolyadékából. A mintákat további felhasználásig -80°C-on tároltuk.

A metabolikus aktivitás mérése

A sejtek metabolikus aktivitását az inkubációs idő leteltével Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo Molecular Technologies, Rockville, Egyesült Államok) teszttel vizsgáltuk, amely egy kolorimetriás eljárás. A CCK-8 reagens vízoldható tetrazólium só (Water Soluble Tetrazolium Salt 8 – WST-8) tartalmaz, melyet az élő sejtek által termelt redukált koenzimek narancssárga formazánná redukálnak. Ennek intenzitása spektrofotométerrel mérhető és mértéke egyenesen arányos az életképes sejtek metabolikus aktivitásával.

A sejtekről a tápfolyadékot eltávolítottuk, majd a gyártói utasításokat követve 100 µl friss FBS mentes Williams Medium E-t és 10 µl CCK-8 reagenst mértünk a lemez mindegyik lyukába, melyet 2 órán keresztül inkubáltunk 37°C-on. Az abszorbancia értékeket 450 nm-en olvastuk le Multiskan GO 3.2 readerrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

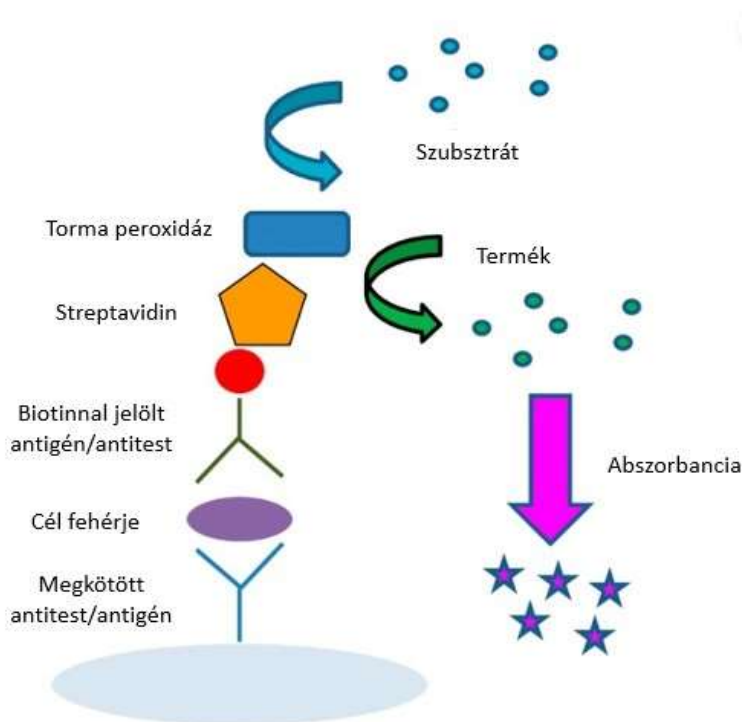
A sejtkárosodás mérése

A sejtkárosodás mértékét a tápfolyadékba került laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitása alapján határoztuk meg. Az LDH egy citoplazmatikus enzim, amely a sejtmembrán sérülése esetén kerül a sejtek tápfolyadékába. Az LDH a NAD⁺-ot NADH-vá redukálja, amely a sárga színű jód-nitro-tetrazólium só (INT) alakítja egy hidrogén átadásával piros színű INT-formazánná, melynek mennyisége egyenesen arányos a károsodott sejtek számával. A mérést 96-lyukú lemezen végeztük el. Az eljárás során a mintákat úgy hígítottuk LDH Assay pufferrel, hogy a végtérfogat 50 µl legyen. Ehhez adtunk 50 µl munkareagenst (48 µl LDH Assay puffer, 2 µl LDH Substrate Mix keveréke), majd a lemezt 37°C-on, fénytől védve inkubáltuk 2-3 percig. Az abszorbanciákat 450 nm-en olvastuk le 5 percenként Multiskan GO 3.2 readerrel, amíg a legaktívabb minta abszorbancia értéke magasabb nem volt, mint a legtöményebb standardé. Ezt követően kiszámoltuk az LDH aktivitását a gyártó protokolljában szereplő képlet segítségével.

Gyulladásos paraméterek mérése

Kísérletünk során három gyulladásos citokin mennyiségét mértük (IFN- γ , IL-6, IL-8) csirke specifikus szendvics ELISA (enzimhez kötött immunszorbens próba – enzyme-linked

immunosorbent assay) tesztekkel (MyBioSource, San Diego, Egyesült Államok). Az ELISA egy adott antigén vagy antitest koncentrációjának mérésére alkalmas módszer. A reakció során egy antitest-antigén kötődés jön létre, amely fotometriásan mérhető színváltozást eredményez. A szendvics ELISA előnye, hogy a direkt ELISA módszernél érzékenyebb, hiszen két antitest vesz részt a reakcióban és mindkettő a cél antigénre specifikus. Ebben az eljárásban a lemez a vizsgálni kívánt antigénre specifikus ellenanyaggal előre bevont, ezáltal képes megkötni azt. Az így rögzült antigénhez egy második, biotinnal jelölt antitest kötődik. Ehhez az antitesthez kapcsolódik egy enzimmel jelölt komplex, amelyhez az utolsó lépésben az enzim szubsztrátját adjuk hozzá, így létrejön a spektrofotometriásan mérhető színváltozás. Kísérletünk során mindhárom mérés egyes lépéseit a gyártó protokollja szerint végeztük el. A méréshez az ELISA teszthez adott, ellenanyaggal előre bevont 96-lyukú lemezt használtuk. A vizsgálat során a lemezt 37°C-on inkubáltuk, és az egyes lépések között lemostuk a nem kötődött anyagokat.



2. ábra: A szendvics ELISA teszt működési elve.

Forrás: Overview of ELISA protocol, MyBioSource (MyBioSource, San Diego, Egyesült Államok)

Statisztika

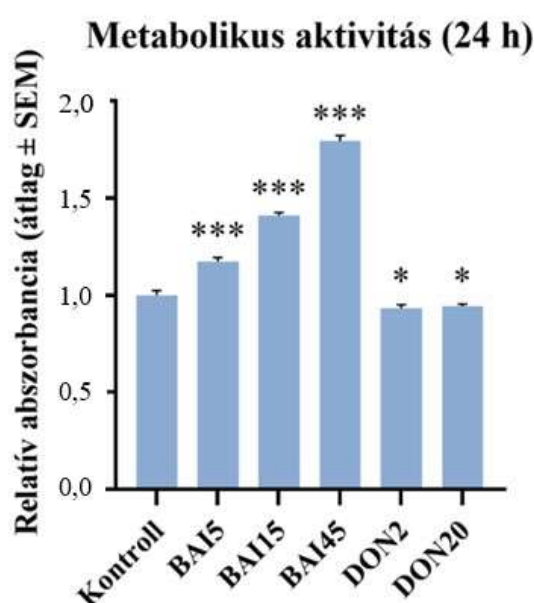
A statisztikai adatelemzéshez R 3.5.3 szoftvert (v4.3.1; R Core Team 2023) használtunk. Minden kezelési csoport $n=8$ mintát tartalmazott. A különböző csoportok közötti eltéréseket egytényezős varianciaanalízissel (one-way analysis of variance – ANOVA) állapítottuk meg, a páronkénti összehasonlításhoz pedig Dunnett *post hoc* próbát alkalmaztunk. Az eredményeket az átlag $\pm$ standard hiba (standard error of the mean – SEM) értékeként értelmeztük. A különbségeket $p < 0,05$ értéktől tekintettük szignifikánsnak.

Az eredményeink összevetése során a csak DON-nal és csak BAI-val kezelt csoportokat a kezeletlen sejtekhez hasonlítottuk. A kombinációs csoportokat a megfelelő koncentrációjú DON-nal (2 $\mu\text{l/ml}$ vagy 20 $\mu\text{l/ml}$) kezelt csoporthoz viszonyítottuk.

Eredmények

Metabolikus aktivitás mérése

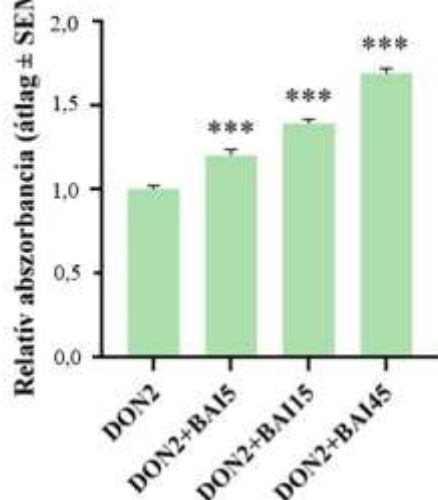
A sejtek életképességét CCK-8 teszttel mértük. Ahogyan a 3. ábrán is látható, a kontroll tenyészetekhez képest a BAI-val kezelt csoportok esetében a sejtek metabolikus aktivitása a koncentráció emelésével egyenesen arányosan növekedett ($p = 7,40 \times 10^{-5}$; $p = 5,72 \times 10^{-10}$; $p = 4,54 \times 10^{-12}$). Ezzel szemben a DON-nal való kezelés csökkentette a sejtek életképességét ($p = 0,042$; $p = 0,044$).



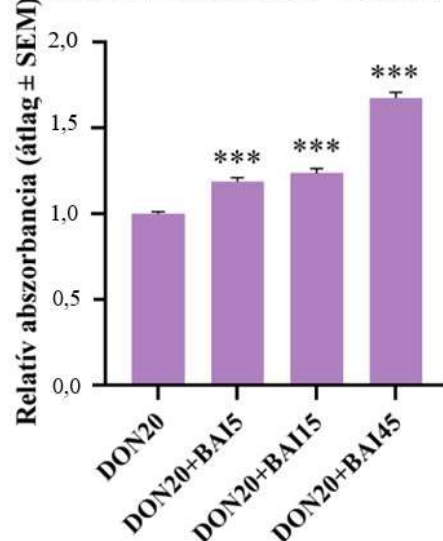
3. ábra: A sejtek metabolikus aktivitása 24 h DON és BAI kezelés hatására. Kontroll: kezeletlen sejtek; BAI5: 5 µg/ml koncentrációjú baicalin kezelés; BAI15: 15 µg/ml koncentrációjú baicalin kezelés; BAI45: 45 µg/ml koncentrációjú baicalin kezelés; DON2: 2 µg/ml koncentrációjú DON kezelés; DON20: 20 µg/ml koncentrációjú DON kezelés. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

A 2 µg/ml DON-nal kezelt sejtkultúrák esetében mindhárom, egyidejűleg alkalmazott BAI koncentráció növelte ($p = 1,36 \times 10^{-4}$; $p = 5,08 \times 10^{-9}$; $p = 1,64 \times 10^{-11}$) a sejtek életképességét a csak DON-nal kezelt csoporthoz képest. A 20 µg/ml DON-nal történő kezelés mellett szintén mindhárom BAI képes volt növelni ($p = 1,96 \times 10^{-6}$; $p = 1,32 \times 10^{-6}$; $p = 1,37 \times 10^{-11}$) a sejtek metabolikus aktivitását a kizárólag DON-nal kezelt sejtekhez viszonyítva (4. ábra).

Metabolikus aktivitás - DON2 (24 h)



Metabolikus aktivitás - DON20 (24 h)

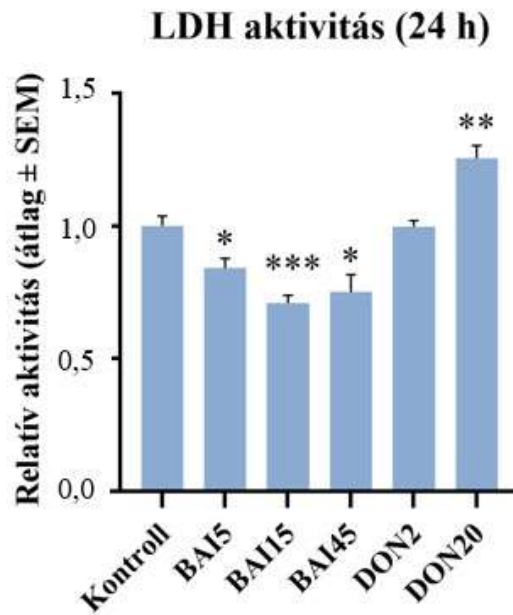


4. ábra: A sejtek metabolikus aktivitása 24 h DON és BAI kezelés hatására. DON2: 2 µg/ml koncentrációjú DON kezelés; DON2+BAI5: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 5 µg/ml BAI kezelés; DON2+BAI15: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 15 µg/ml BAI kezelés, DON2+BAI45: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 45 µg/ml BAI kezelés. DON20: 20 µg/ml koncentrációjú DON kezelés; DON20+BAI5: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 5 µg/ml BAI kezelés, DON20+BAI15: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 15 µg/ml BAI kezelés; DON20+BAI45: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 45 µg/ml BAI kezelés. *** $p < 0,001$.

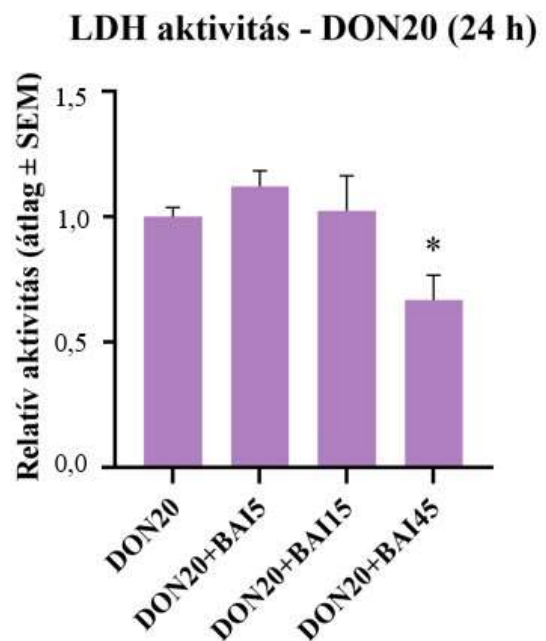
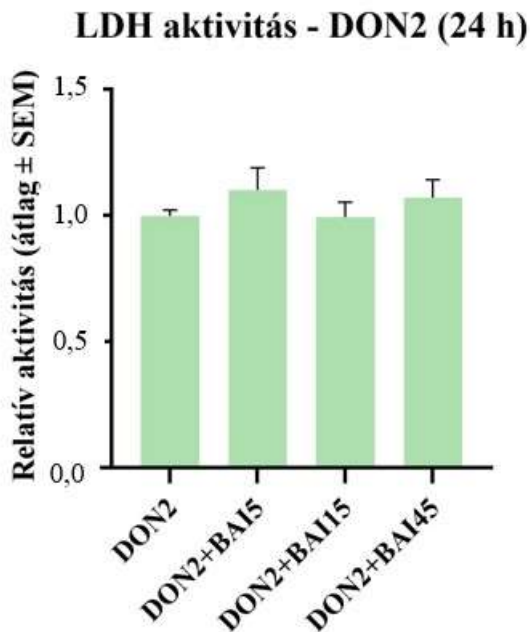
Sejtkárosodás mértékének vizsgálata

A sejtek károsodásának mértékét az LDH enzim aktivitásának mérésével határoztuk meg. A kezeletlen sejtekhez viszonyítva a BAI-val történő kezelés csökkentette az LDH szintjét ($p = 0,017$; $p = 3,30 \times 10^{-4}$; $p = 0,010$). A DON-nal való kezelések közül csak a 20 µg/ml DON esetében tapasztaltunk szignifikáns emelkedést ($p = 0,003$) a kontroll csoporthoz képest (5. ábra).

Az enzim aktivitása a 20 µg/ml DON kezeléssel kombinált 45 µg/ml koncentrációjú BAI hatására szignifikánsan csökkent ($p = 0,014$) a csak DON-nal kezelt sejtekhez képest (6. ábra).



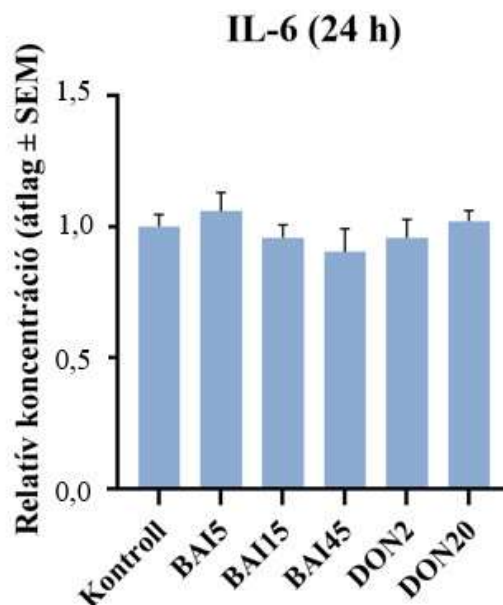
5. ábra: A laktát-dehidrogenáz (LDH) extracelluláris aktivitása 24 h DON és BAI kezelés hatására. DON2: 2 µg/ml koncentrációjú DON kezelés; DON2+BAI5: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 5 µg/ml BAI kezelés; DON2+BAI15: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 15 µg/ml BAI kezelés, DON2+BAI45: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 45 µg/ml BAI kezelés. DON20: 20 µg/ml koncentrációjú DON kezelés; DON20+BAI5: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 5 µg/ml BAI kezelés, DON20+BAI15: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 15 µg/ml BAI kezelés; DON20+DON45: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 45 µg/ml BAI kezelés. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



6. ábra: A laktát-dehidrogenáz (LDH) extracelluláris aktivitása 24 h DON és BAI kezelés hatására. DON2: 2 µg/ml koncentrációjú DON kezelés; DON2+BAI5: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 5 µg/ml BAI kezelés; DON2+BAI15: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 15 µg/ml BAI kezelés, DON2+BAI45: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 45 µg/ml BAI kezelés. DON20: 20 µg/ml koncentrációjú DON kezelés; DON20+BAI5: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 5 µg/ml BAI kezelés, DON20+BAI15: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 15 µg/ml BAI kezelés; DON20+DON45: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 45 µg/ml BAI kezelés. * $p < 0,05$.

Interleukin-6

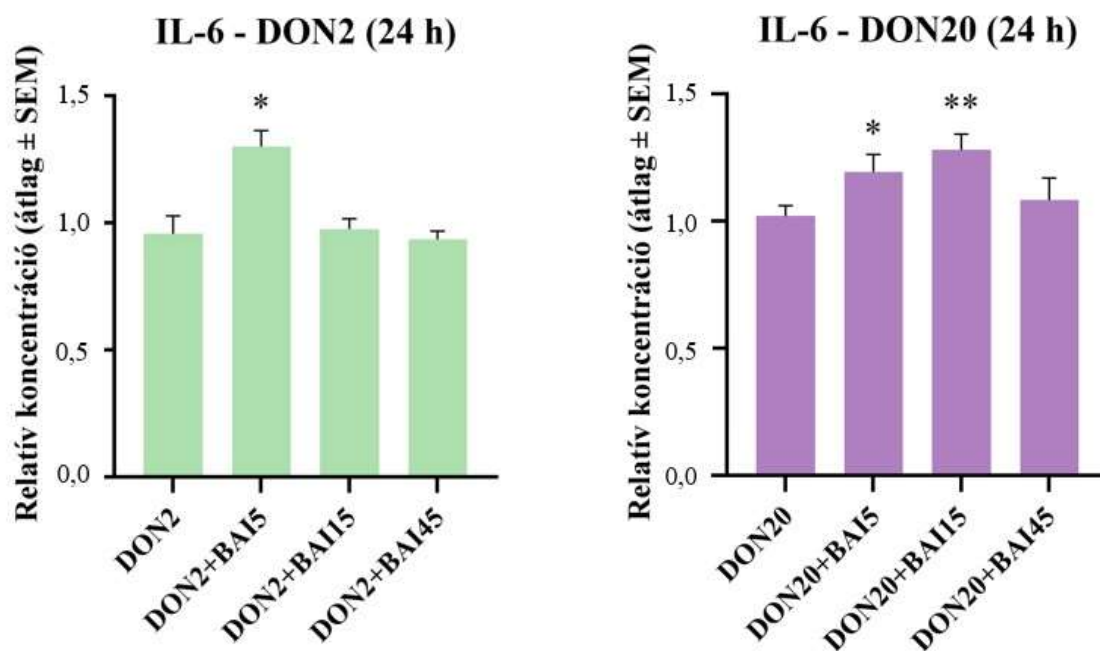
Az IL-6 koncentrációját csirkespecifikus szendvics ELISA tesztel mértük a sejtenyészetek tápfolyadékából. Az önállóan alkalmazott DON és BAI kezelések nem befolyásolták az IL-6



koncentrációját (7. ábra).

7. ábra: Az IL-6 koncentrációja 24 h DON és BAI kezelés hatására. DON2: 2 µg/ml koncentrációjú DON kezelés; DON2+BAI5: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 5 µg/ml BAI kezelés; DON2+BAI15: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 15 µg/ml BAI kezelés, DON2+BAI45: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 45 µg/ml BAI kezelés. DON20: 20 µg/ml koncentrációjú DON kezelés; DON20+BAI5: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 5 µg/ml BAI kezelés, DON20+BAI15: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 15 µg/ml BAI kezelés; DON20+DON45: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 45 µg/ml BAI kezelés.

A 2 µg/ml DON-nal kezelt tenyészetek esetében az 5 µg/ml BAI kezelés emelte ($p = 0,014$) az IL-6 szintjét. A 20 µg/ml DON-nal kezelt csoport esetében mind az 5 µg/ml BAI, mind a 15 µg/ml BAI megemelte ($p = 0,039$; $p = 5,32 \times 10^{-3}$) a citokin szintjét (8. ábra).

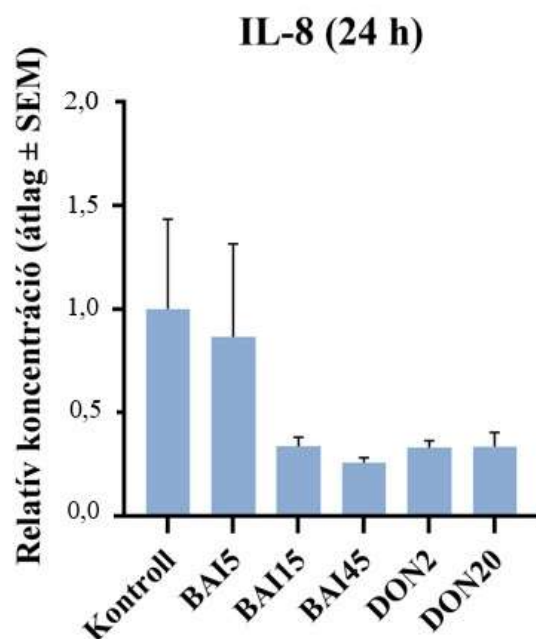


8. ábra: Az IL-6 koncentrációja 24 h DON és BAI kezelés hatására. DON2: 2 µg/ml koncentrációjú DON kezelés; DON2+BAI5: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 5 µg/ml BAI kezelés; DON2+BAI15: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 15 µg/ml BAI kezelés, DON2+BAI45: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 45 µg/ml BAI kezelés. DON20: 20 µg/ml koncentrációjú DON kezelés; DON20+BAI5: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 5 µg/ml BAI kezelés, DON20+BAI15: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 15 µg/ml BAI kezelés; DON20+BAI45: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 45 µg/ml BAI kezelés. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

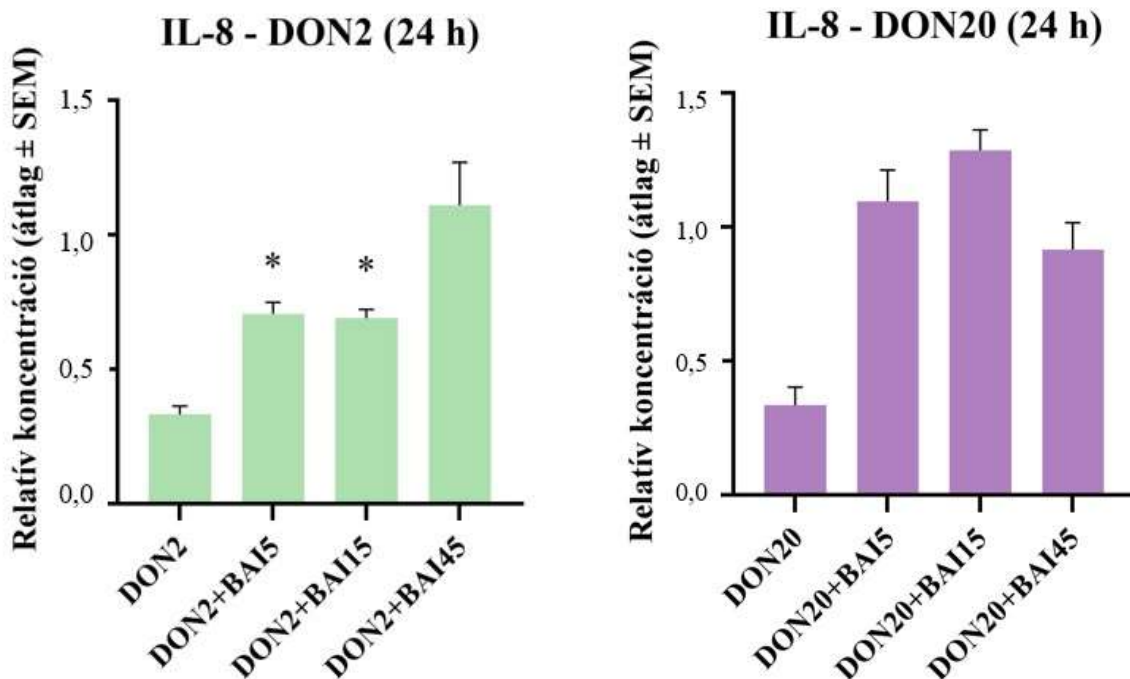
Interleukin-8

Az IL-8 koncentrációját szintén csirkespecifikus ELISA teszt segítségével mértük a szferoidok tápfolyadékából. Az önállóan alkalmazott DON és BAI kezelések nem befolyásolták az IL-8 koncentrációját (9. ábra).

A 2 µg/ml DON-nal kezelt sejtkultúrák esetén az 5 és 15 µg/ml BAI hatására megnőtt ($p = 0,024$; $p = 0,016$) a citokin szintje.



9. ábra: Az IL-8 koncentrációja 24 h DON és BAI kezelés hatására. DON2: 2 µg/ml koncentrációjú DON kezelés; DON2+BAI5: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 5 µg/ml BAI kezelés; DON2+BAI15: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 15 µg/ml BAI kezelés, DON2+BAI45: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 45 µg/ml BAI kezelés. DON20: 20 µg/ml koncentrációjú DON kezelés; DON20+BAI5: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 5 µg/ml BAI kezelés, DON20+BAI15: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 15 µg/ml BAI kezelés; DON20+DON45: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 45 µg/ml BAI kezelés.

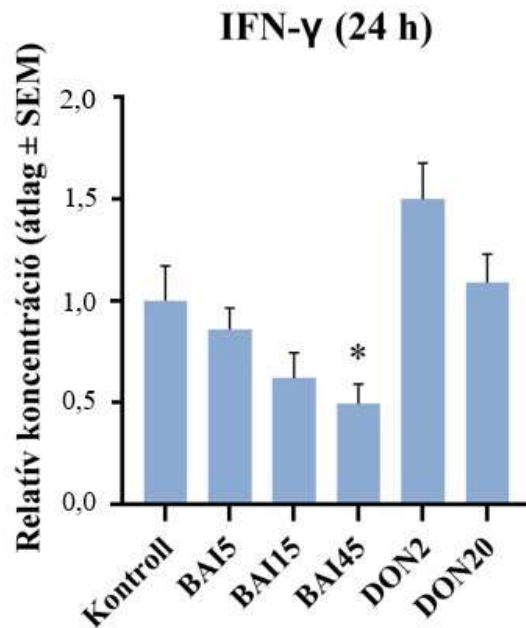


10. ábra: Az IL-8 mennyisége 24 h DON és BAI kezelés hatására. DON2: 2 µg/ml koncentrációjú DON kezelés; DON2+BAI5: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 5 µg/ml BAI kezelés; DON2+BAI15: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 15 µg/ml BAI kezelés; DON2+BAI45: 2 µg/ml koncentrációjú DON és 45 µg/ml BAI kezelés. DON20: 20 µg/ml koncentrációjú DON kezelés; DON20+BAI5: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 5 µg/ml BAI kezelés; DON20+BAI15: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 15 µg/ml BAI kezelés; DON20+BAI45: 20 µg/ml koncentrációjú DON és 45 µg/ml BAI kezelés. * $p < 0,05$.

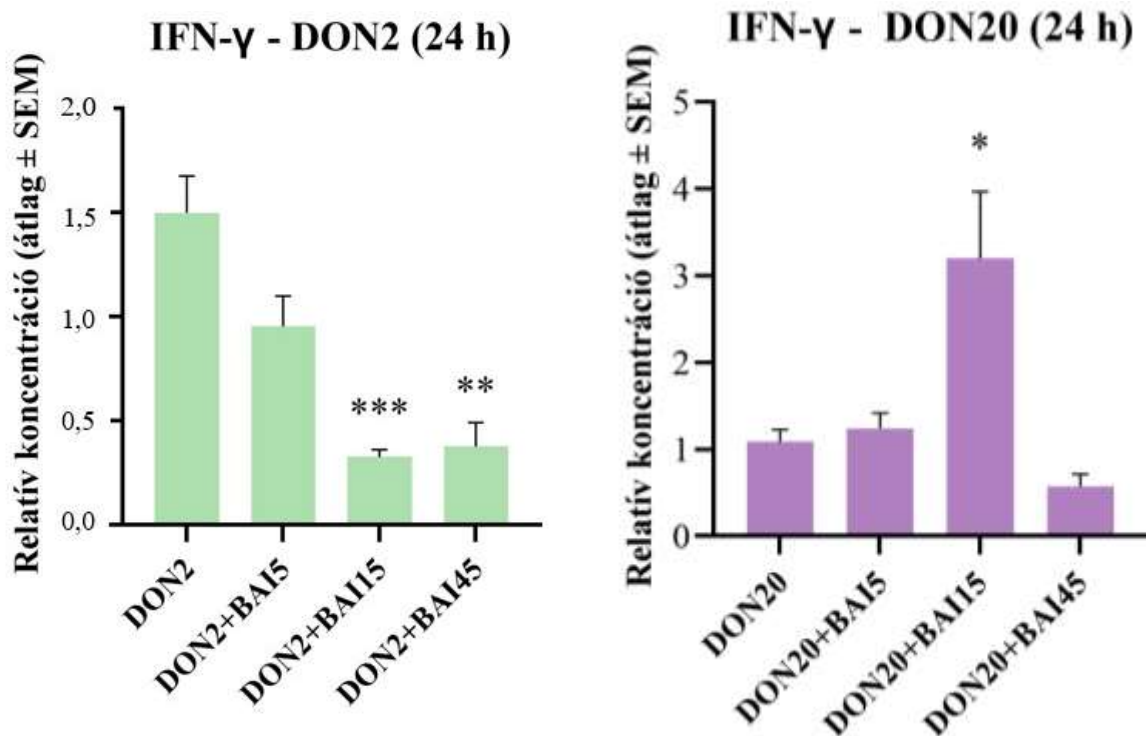
Interferon- γ

Az IFN- γ koncentrációját csirkespecifikus ELISA teszttel határoztuk meg a tápfolyadékból. A kezeletlen sejtekhez képest a 45 µg/ml BAI kezelés csökkentette ($p = 0,033$) a szintjét a citokinnek (11. ábra).

A 2 µg/ml DON-nal kezelt tenyészeteknél mind a 15 µg/ml BAI, mind a 45 µg/ml BAI képes volt mérsékelni ($p = 5,82 \times 10^{-4}$; $p = 5,36 \times 10^{-3}$) az IFN- γ termelődést. A 20 µg/ml DON-nal való kezelést követően csak a 15 µg/ml BAI hatására emelkedett ($p = 0,023$) az IFN- γ mennyisége (12. ábra).



11. ábra: Az IFN- γ mennyisége 24 h DON és BAI kezelés hatására. DON2: 2 μ g/ml koncentrációjú DON kezelés; DON2+BAI5: 2 μ g/ml koncentrációjú DON és 5 μ g/ml BAI kezelés; DON2+BAI15: 2 μ g/ml koncentrációjú DON és 15 μ g/ml BAI kezelés, DON2+BAI45: 2 μ g/ml koncentrációjú DON és 45 μ g/ml BAI kezelés. DON20: 20 μ g/ml koncentrációjú DON kezelés; DON20+BAI5: 20 μ g/ml koncentrációjú DON és 5 μ g/ml BAI kezelés, DON20+BAI15: 20 μ g/ml koncentrációjú DON és 15 μ g/ml BAI kezelés; DON20+DON45: 20 μ g/ml koncentrációjú DON és 45 μ g/ml BAI kezelés. * $p < 0,05$.



12. ábra: Az IFN- γ mennyisége 24 h DON és BAI kezelés hatására. DON2: 2 μ g/ml koncentrációjú DON kezelés; DON2+BAI5: 2 μ g/ml koncentrációjú DON és 5 μ g/ml BAI kezelés; DON2+BAI15: 2 μ g/ml koncentrációjú DON és 15 μ g/ml BAI kezelés, DON2+BAI45: 2 μ g/ml koncentrációjú DON és 45 μ g/ml BAI kezelés. DON20: 20 μ g/ml koncentrációjú DON kezelés; DON20+BAI5: 20 μ g/ml koncentrációjú DON és 5 μ g/ml BAI kezelés, DON20+BAI15: 20 μ g/ml koncentrációjú DON és 15 μ g/ml BAI kezelés; DON20+DON45: 20 μ g/ml koncentrációjú DON és 45 μ g/ml BAI kezelés. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Diszkusszió

A DON egy *Fusarium* fajok által termelt trichotecénvázas mikotoxin, mely különböző gabonákat szennyez világszerte [1]. Mivel a baromfitakarmány zömmel gabonából áll, így mikotoxin fertőzésnek való kitettségük jelentős. Sejtszinten okozott legjelentősebb hatása a fehérjeszintézis gátlása, illetve ROS képződés fokozásán keresztül növelheti az oxidatív stressz kialakulásának esélyét, károsíthatja a sejtmembránok épségét és serkentheti a gyulladásos folyamatok beindulását [2]. E hatások csökkent takarmányfelvételhez, majd fogyáshoz, emésztőrendszeri irritációhoz és immunszuppresszióhoz vezethetnek [1].

A BAI egy flavonoid, amely a bajkái csucsóka (*Scutellaria baicalensis*) gyökeréből vonható ki [17]. Ennek az antioxidáns hatással bíró vegyületnek leírták már többek között gyulladáscsökkentő, immunerősítő és mikotoxikózisokkal szembeni protektív hatását is [18].

Kísérleteinkhez 3D mágneses bioprinting módszerrel szferoidokat hoztunk létre, melyek a hepatocitákat és a nem parenchimális sejteket 6:1 arányban tartalmazták. Ennek az eljárásnak előnye, hogy a májsejtek így képesek megőrizni differenciáltságukat és fenotípusaikat a 2D sejt kultúrában tenyésztettekkel szemben, így változatos sejtek közötti és sejt-ECM kapcsolatok jöhetnek létre, ezzel hitelesebben modellezve az *in vivo* lejátszódó folyamatokat [22, 24].

A DON és a BAI sejtek életképességére gyakorolt hatását CCK-8 tesztel vizsgáltuk. Az eredményeink a DON-nal kezelt kultúrák esetében szignifikáns csökkenést, míg a BAI-val történő kezelés után szignifikánsan emelkedést mutattak a sejtek metabolikus aktivitásában a kezeletlen sejtekhez képest. Emellett a BAI mindkét DON kezelés mellett emelni tudta a sejtek metabolikus aktivitását. Ebből arra következtethetünk, hogy ugyan a DON negatívan befolyásolja a sejtek életképességét, a BAI ezt a hatást képes volt mérsékelni.

Ez összhangban áll a Bao vezetésével zajlott 2022-es kutatással, ahol szintén három különböző BAI koncentráció hatását vizsgálták önállóan és LPS is kezelt sejtek esetében. A kísérlet során azt tapasztalták, hogy az LPS-sel való kezelést követően a sejtek életképessége csökkent. Azokban az esetekben, amikor a kezelést BAI-val kiegészítették, mind az alacsony, közepes és magas koncentráció képes volt visszafordítani ezt a citotoxikus hatást [29].

A sejt károsodás mértékét az LDH tápfolyadékbeli aktivitásából határoztuk meg. A laktát-dehidrogenáz egy citoplazmatikus enzim, ezáltal a tápfolyadékbeli koncentrációjából következtethetünk a sejtmembrán sérülésének mértékére. A méréseink során azt tapasztaltuk, hogy a csak BAI-val kezelt tenyészetek esetében szignifikánsan csökkent az LDH szint, illetve

a magasabb alkalmazott DON kezelés hatására emelkedett a kezeletlen sejtekhez képest. Továbbá ugyanezen DON koncentráció esetében a legmagasabb BAI csökkentette az LDH aktivitást, tehát feltételezhető, hogy mérsékelni tudta a sejtkárosodás mértékét. Ez összhangban áll egy 2020-ban megjelent cikkben Liao és munkatársai a DON emésztőrendszeri gyulladást és oxidatív stresszt kiváltó hatását vizsgálták sertésben, illetve a BAI potenciálját ezek ellensúlyozására. A vizsgálatok során számos biokémiai markert vizsgáltak, többek között az LDH aktivitását a sejtkárosodás mértékének monitorozásához. A mérések azt mutatták, hogy azoknál a sertéseknél, amelyek DON-nal szennyezett takarmányt kaptak, a szérumban LDH aktivitása jelentősen megnövekedett a többi takarmányozási csoporthoz képest. Ezzel szemben azoknál az állatoknál, akiknél a DON-t BAI kiegészítéssel etették, a szérumban LDH aktivitása kevesebb volt, mint a DON-nal kezelt állatoké. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy a BAI képes ellensúlyozni a DON sejtkárosító hatásait, ezzel megelőzni és a kezelést segíteni a gasztrointesztinális károsodásnak [19].

A gyulladás a veszélyeztetett immunrendszer válasza a szervezetet érő káros hatásokra, feladata az azok elleni védekezés és a sérült szövetek helyreállításának segítése [13]. A gyulladásos folyamatokat ún. gyulladásos citokinek szintjének vizsgálatával monitorozhatjuk. Ezen markerek közül mi az IL-6-ot, IL-8-at és az IFN- γ -t mértük csirke specifikus szendvics ELISA tesztek segítségével.

Az IL-6 mérés során a kisebb DON koncentrációval kezelt csoport esetében a legkisebb BAI kezelés hatására, míg a magasabb DON kezelés esetében a legkisebb és a középső BAI kezelés során tapasztaltunk emelkedést. Az IL-6-nak azonban nem csak a gyulladás kiváltásában van szerepe, hiszen ez egy pleiotróp citokin, leírták már szabályozó szerepét a májsejtek fibrinogén expressziójában, a kórokozókkal szembeni védelemben és a szöveti regenerációban is [30]. Hatását egy másik receptorral, az IL-6R α -n való kapcsolatán keresztül fejti ki. Ezek együttesen egy komplexet képeznek, amelyek érzékenyítik a sejteket az IL-6-ra. Galun és munkatársai kísérletükben azt tapasztalták, hogy az IL-6 deficiens egerek máj regenerációs folyamatai sérültek, azonban IL-6-tal vagy IL-6/sIL-6R α komplexszel való kezelést követően ezek helyreállíthatóak voltak [31]. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy azért emelkedett meg az IL-6 szintje, hogy a sejtek pusztulását ellensúlyozni próbálja, hiszen a regenerációt alapvetően a máj tömegvesztése stimulálja, amely a hepatociták és a nem-parenchimális sejtek osztódását idézi elő [32]. Emiatt lehetséges, hogy a BAI hatására megnövekedett metabolikus aktivitású sejtek igyekeztek serkenteni a proliferációt az IL-6 szintjének növelésével.

Az IL-8 esetében a kisebb DON koncentráció mellett az legalacsonyabb és a középső BAI emelte meg a szintjét. Az IL-8 egy kemokin, amely a neutrofil granulociták aktiválásában fontos szerepet játszik a degranuláció és az oxidatív stressz serkentésével [15]. Egy 2013-ban publikált kutatásban Ghareeb és munkatársai vizsgálták a DON immunrendszerre gyakorolt hatását egy Mycofix Select (MS) nevű, kereskedelmi forgalomban kapható takarmánykiegészítővel együttesen. A MS egy Európai Unió által jóvá hagyott takarmánykiegészítő, amelynek feladata a mikotoxinok megkötése, enzimek hozzáadásával a mikotoxinok átalakítása nem mérgező metabolitokká, illetve tartalmaz immunstimulánsokat a toxinok hatásának kivédésére. Ebben a kísérletben az orálisan alkalmazott DON csökkentette az IL-8 szintjét, amely a szervezet gyulladásos immunválaszáért felelős. Ez azt sugallja, hogy a DON szuppresszálta az immunrendszert. A MS használatát követően az IL-8 szintje viszont emelkedett, amelyből arra következtettek, hogy a MS képes stimulálni az immunrendszert, hiszen javította a csirkék immunválaszát [33]. Eredményeink azt mutatják, hogy annak ellenére, hogy a DON immunszuppresszáns hatása nem volt szignifikáns az IL-8 esetében a kontroll tenyészetekhez képest, két különböző koncentrációjú BAI hatására mégis szignifikánsan emelkedett a kisebb DON koncentrációval kezelt csoport esetében. Ebből feltételezhetjük, hogy a BAI-nak immunstimuláns hatása van.

Az IFN- γ fontos szerepet játszik az immunrendszerben, hiszen szükséges egyes immunsejtek megfelelő éréséhez. Növeli az MHC termelést, ezáltal serkenti az antigénprezentációt [16].

Vizsgálatunk során az IFN- γ szintjét a legmagasabb BAI koncentráció csökkentette a kontroll sejtekben mérthez képest. Az alacsonyabb koncentrációjú DON kezelés esetében a középső és a legmagasabb BAI csökkentette az IFN- γ mennyiségét. Ehhez hasonló eredményt tapasztaltak egy másik trichotecénvázas mikotoxin, a T-2 toxin esetében is egy 2006-os kutatásban, ahol azt tapasztalták, hogy a T-2 toxinnal való kezelést követően megemelkedett az IFN- γ -t kódoló mRNS szintje [34]. Ebből arra következtettek, hogy a T-2 toxinnak, amely a DON-hoz igen hasonló szerkezetű és hatású mikotoxin, gyulladást kiváltó hatása van. Mindezek alapján feltételezhetjük, hogy a BAI mérsékelni tudta a DON által kiváltott gyulladás mértékét.

Ezzel szemben a magasabb koncentrációjú DON-nal kezelt csoportnál a középső BAI hatására megemelkedett az IFN- γ szintje. Mivel nem minden esetben ismert a pontos hatásmechanizmusa a BAI-nak, elképzelhető, hogy olyan változásokat indukált a sejtekben ebben a koncentrációban alkalmazva, melynek hatására növekedett az IFN- γ mennyisége. Ennek vizsgálatához további kísérletek szükségesek a jövőben.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a DON negatív hatással volt a sejtekre, károsította a sejtmembránokat, és gyulladásos folyamatok beindulásához vezetett. E hatásokat az általunk alkalmazott különféle BAI koncentrációk azonban mérsékelni tudták. Mindezek alapján elmondható, hogy a BAI-nak, mint takarmánykiegészítőnek az alkalmazása baromfi fajokban várhatóan pozitív hatásokkal járhat, azonban ennek alátámasztásához még további, *in vivo* vizsgálatok is szükségesek.

Absztrakt

A mikotoxinok gombák által termelt másodlagos anyagcseretermékek, melyek közül kiemelkedő fontosságúak az egyes *Fusarium* fajok által termelt trichotecénvázias mikotoxinok. Ezek egyik fontos képviselője a dezoxinivalenol (DON), melynek fő sejtszintű hatása a fehérjeszintézis gátlása, illetve reaktív oxigéngyökök (ROS) képződésének serkentésén keresztül oxidatív stressz kialakulását okozhatja, károsíthatja a sejtmembránok integritását, illetve gyulladásos folyamatok beindulásához vezethet. E tulajdonságai miatt lényeges olyan vegyületek kutatása, amelyekkel ezek a káros hatások kivédhetők. A baicalin (BAI) a bajkáli csucsóka (*Scutellaria baicalensis*) gyökeréből izolált flavonoid, melynek antioxidáns, gyulladáscsökkentő, antimikrobiális és daganatellenes hatása régóta ismert.

TDK munkám során a DON gyulladásos válaszra gyakorolt, illetve a BAI ezzel szemben kifejtett protektív hatását vizsgáltuk csirke eredetű háromdimenziós (3D) májsejttenyészeteken, melyeket mágneses 3D bioprinting módszerrel hoztunk létre. A sejt kultúrákat kétféle DON (2 és 20 $\mu\text{g/ml}$), háromféle BAI (5, 15 és 45 $\mu\text{g/ml}$) koncentrációval, illetve ezek kombinációival kezeltük. A sejtek metabolikus aktivitását CCK-8 (Cell-Counting Kit-8) teszttel határoztuk meg. A sejt károsodás mértékének vizsgálatához a laktát-dehidrogenáz (LDH) enzim extracelluláris aktivitását mértük. A gyulladásos folyamatok nyomon követése céljából az interleukin-6 (IL-6), az interleukin-8 (IL-8) és az interferon- γ (IFN- γ) mennyiségét határoztuk meg csirkespecifikus ELISA tesztek segítségével.

A sejtek metabolikus aktivitását mindhárom BAI koncentráció növelte, míg a DON-nal való kezelés csökkentette a kontroll tenyészetekhez képest. Mindkét koncentrációjú DON-nal kezelt tenyészetek esetében mindhárom BAI növelte a sejtek életképességét. Az LDH aktivitását az összes alkalmazott BAI koncentráció csökkentette, míg a kisebb koncentrációjú DON növelte. Továbbá a magasabb DON-nal kezelt tenyészetek esetében a legmagasabb BAI csökkentette az LDH aktivitást. Az IL-6 szintje az alacsonyabb DON-kezelt sejtek esetében a legkisebb BAI koncentráció, míg a magasabb DON-nal kezelt tenyészetek esetében a két kisebb BAI kezelés hatására emelkedett. Az IL-8 koncentrációja az alacsonyabb DON-nal kezelt csoportokban a két kisebb BAI kezelés hatására növekedett. A kezeletlen sejtekhez képest a legmagasabb BAI, míg a kisebb DON koncentráció esetében a középső és a legmagasabb BAI koncentráció csökkentette az IFN- γ mennyiségét. Ezzel szemben a magasabb koncentrációjú DON kezelés esetében a középső koncentrációjú BAI növelte az IFN- γ koncentrációját.

Az eredmények alapján elmondható, hogy a DON negatív hatással volt a sejtekre, melyet bizonyos koncentrációban alkalmazva a BAI képes volt mérsékelni. Ezen hatásai miatt feltételezhető, hogy további, *in vivo* kísérletek elvégzése után a jövőben akár takarmánykiegészítőként is alkalmazható lehet gazdasági haszonállatainkban, javítva az állatok egészségi állapotát, ezáltal a termelést is.

English Abstract

Mycotoxins are secondary metabolites produced by different types of fungi. The most important mycotoxins are the trichothecene mycotoxins produced by several *Fusarium spp.* An important member of these is deoxynivalenol (DON, vomitoxin), whose main cellular effects are the inhibition of protein synthesis and the stimulation of reactive oxygen species (ROS) formation, thus the induction of oxidative stress, the impairment of cell membrane integrity as well as the initiation of inflammatory processes. Because of these characteristics, studying chemicals that could prevent these harmful effects is essential. Baicalin (BAI) is a flavonoid isolated from the root of *Scutellaria baicalensis* and it is known for its antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and antitumor effects.

In the present study, the inflammatory effect of DON and the protective role of BAI were investigated in chicken-derived three-dimensional (3D) hepatic cell cultures. 3D cultures were created by magnetic 3D bioprinting method. Cell cultures were treated with two different DON (2 and 20 µg/ml) and three different BAI (5, 15 and 45 µg/ml) concentrations as well as with their combinations. The viability of the cells was determined by CCK-8 (Cell Counting Kit-8) assay and the cell membrane damage was assessed by measuring the activity of the lactate dehydrogenase (LDH) enzyme. To monitor the inflammatory processes, interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interferon- γ (IFN- γ) concentrations were measured using chicken-specific ELISA tests.

The metabolic activity of the cells was increased by all applied BAI concentrations, while treatment with both DON concentrations decreased it compared to the control cultures. In case of the cells treated with both concentrations of DON, all three BAI increased the cell viability. The activity of LDH was reduced by all of the used BAI concentration, while was elevated by the lower concentration of DON. Furthermore, in cultures treated with the higher concentration of DON, only the highest BAI could reduce the LDH activity. IL-6 levels were elevated in the lower DON concentration treated cells by the lowest BAI, while in the higher DON concentration treated cells, they were increased by the two lower BAI treatments. The quantity of IL-8 was increased in the lower DON concentration treated groups in response to the two lower BAI treatments. Compared to untreated cells, the highest applied BAI, while in the lower DON concentration treated cells, the middle and the highest applied BAI could decrease the quantity of IFN- γ . In case of the cells treated with the higher DON, the middle BAI concentration increased the amount of IFN- γ .

Our results showed that DON had a negative impact on the cells, which BAI was able to attenuate at certain concentration. Because of this effect, it can be assumed that after further *in vivo* experiments BAI could be used as a feed supplement in livestock, improving animal health and thereby production.

Források

1. Awad WA, Ghareeb K, Bohm J, Razzazi E, Hellweg P, Zentek J (2008) The impact of the Fusarium toxin deoxynivalenol (DON) on poultry. *Int J Poult Sci* 7:827–842
2. Pinton P, Oswald IP (2014) Effect of deoxynivalenol and other Type B trichothecenes on the intestine: a review. *Toxins* 6:1615–1643
3. Arunachalam C, Doohan FM (2013) Trichothecene toxicity in eukaryotes: Cellular and molecular mechanisms in plants and animals. *Toxicol Lett* 217:149–158. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.12.003>
4. Krska R, Baumgartner S, Josephs R (2001) The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals. *Fresenius J Anal Chem* 371:285–299. <https://doi.org/10.1007/s002160100992>
5. Zha A, Yuan D, Cui Z, Qi M, Liao S, Liao P, Tan B (2020) The Evaluation of the Antioxidant and Intestinal Protective Effects of Baicalin-Copper in Deoxynivalenol-Challenged Piglets. *Oxid Med Cell Longev* 2020:e5363546. <https://doi.org/10.1155/2020/5363546>
6. Rocha O, Ansari K, Doohan FM (2005) Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Addit Contam* 22:369–378. <https://doi.org/10.1080/02652030500058403>
7. Awad W, Ghareeb K, Böhm J, Zentek J (2013) The Toxicological Impacts of the Fusarium Mycotoxin, Deoxynivalenol, in Poultry Flocks with Special Reference to Immunotoxicity. *Toxins* 5:912–925. <https://doi.org/10.3390/toxins5050912>
8. Mulder GJ (1979) Detoxification or toxification? modification of the toxicity of foreign compounds by conjugation in the liver. *Trends Biochem Sci* 4:86–90. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(79\)90189-0](https://doi.org/10.1016/0968-0004(79)90189-0)
9. Sun Y, Jiang J, Mu P, Lin R, Wen J, Deng Y (2022) Toxicokinetics and metabolism of deoxynivalenol in animals and humans. *Arch Toxicol* 96:2639–2654. <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03337-8>
10. Mishra S, Dwivedi PD, Pandey HP, Das M (2014) Role of oxidative stress in Deoxynivalenol induced toxicity. *Food Chem Toxicol* 72:20–29. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.06.027>
11. Ge L, Lin Z, Le G, Hou L, Mao X, Liu S, Liu D, Gan F, Huang K (2020) Nontoxic-dose deoxynivalenol aggravates lipopolysaccharides-induced inflammation and tight junction disorder in IPEC-J2 cells through activation of NF-κB and LC3B. *Food Chem Toxicol* 145:111712. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111712>
12. Pestka JJ, Zhou H-R, Moon Y, Chung YJ (2004) Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. *Toxicol Lett* 153:61–73. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.023>
13. Valkó A, Lőrincz M (2020) Immunológiai illusztrációk könyve, Első kiadás. A/3 Nyomdaipari és Kiadói Szolgáltató Kft., Magyarország, Budapest
14. Cronstein BN (2007) Interleukin-6. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 65:11–5
15. Baggiolini M, Clark-Lewis I (1992) Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* 307:97–101. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80909-Z](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80909-Z)
16. Miller CHT, Maher SG, Young HA (2009) Clinical Use of Interferon-γ. *Ann N Y Acad Sci* 1182:69–79. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05069.x>
17. Ozma MA, Khodadadi E, Pakdel F, Kamounah FS, Yousefi M, Yousefi B, Asgharzadeh M, Ganbarov K, Kafil HS (2021) Baicalin, a natural antimicrobial and anti-biofilm agent. *J Herb Med* 27:100432. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2021.100432>

18. Xu J, Li S, Jiang L, Gao X, Liu W, Zhu X, Huang W, Zhao H, Wei Z, Wang K, Yang Z (2021) Baicalin protects against zearalenone-induced chicks liver and kidney injury by inhibiting expression of oxidative stress, inflammatory cytokines and caspase signaling pathway. *Int Immunopharmacol* 100:108097. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108097>
19. Liao P, Li Y, Li M, Chen X, Yuan D, Tang M, Xu K (2020) Baicalin alleviates deoxynivalenol-induced intestinal inflammation and oxidative stress damage by inhibiting NF- κ B and increasing mTOR signaling pathways in piglets. *Food Chem Toxicol* 140:111326. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111326>
20. Hu Z, Guan Y, Hu W, Xu Z, Ishfaq M (2022) An overview of pharmacological activities of baicalin and its aglycone baicalein: New insights into molecular mechanisms and signaling pathways. *Iran J Basic Med Sci* 25:14. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2022.60380.13381>
21. Sun H, Che Q-M, Zhao X, Pu X-P (2010) Antifibrotic effects of chronic baicalein administration in a CCl₄ liver fibrosis model in rats. *Eur J Pharmacol* 631:53–60. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.01.002>
22. Desai PK, Tseng H, Souza GR (2017) Assembly of Hepatocyte Spheroids Using Magnetic 3D Cell Culture for CYP450 Inhibition/Induction. *Int J Mol Sci* 18:1085. <https://doi.org/10.3390/ijms18051085>
23. Duval K, Grover H, Han L-H, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, Chen Z (2017) Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology* 32:266–277. <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>
24. Sebők C, Tráj P, Vörösházi J, Mackei M, Papp M, Gálfi P, Neogrady Z, Mátis G (2021) Two Sides to Every Question: Attempts to Activate Chicken Innate Immunity in 2D and 3D Hepatic Cell Cultures. *Cells* 10:1910. <https://doi.org/10.3390/cells10081910>
25. Amaral RLF, Miranda M, Marcato PD, Swiech K (2017) Comparative Analysis of 3D Bladder Tumor Spheroids Obtained by Forced Floating and Hanging Drop Methods for Drug Screening. *Front Physiol* 8:
26. Caliari SR, Burdick JA (2016) A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nat Methods* 13:405–414. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3839>
27. Van de Walle A, Perez JE, Wilhelm C (2023) Magnetic bioprinting of stem cell-based tissues. *Bioprinting* 30:e00265. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2023.e00265>
28. Mackei M, Molnár A, Nagy S, Pál L, Kővágó C, Gálfi P, Dublec K, Husvéth F, Neogrady Z, Mátis G (2020) Effects of Acute Heat Stress on a Newly Established Chicken Hepatocyte—Nonparenchymal Cell Co-Culture Model. *Anim Open Access J MDPI* 10:409. <https://doi.org/10.3390/ani10030409>
29. Bao M, Liang M, Sun X, Mohyuddin SG, Chen S, Wen J, Yong Y, Ma X, Yu Z, Ju X, Liu X (2022) Baicalin Alleviates LPS-Induced Oxidative Stress via NF- κ B and Nrf2–HO1 Signaling Pathways in IPEC-J2 Cells. *Front Vet Sci* 8:808233. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.808233>
30. Rothaug M, Becker-Pauly C, Rose-John S (2016) The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* 1863:1218–1227. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.03.018>
31. Galun E, Zeira E, Pappo O, Peters M, Rose-John S Liver regeneration induced by a designer human IL-6/sIL-6R fusion protein reverses severe hepatocellular injury. <https://doi.org/10.1096/fj.99-0913com>
32. Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, Taub R (1996) Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 274:1379–1383. <https://doi.org/10.1126/science.274.5291.1379>
33. Ghareeb K, Awad WA, Soodoi C, Sasgary S, Strasser A, Böhm J (2013) Effects of Feed Contaminant Deoxynivalenol on Plasma Cytokines and mRNA Expression of Immune Genes in the Intestine of Broiler Chickens. *PLOS ONE* 8:e71492. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071492>

34. (2006) T-2 toxin impairment of enteric reovirus clearance in the mouse associated with suppressed immunoglobulin and IFN- γ responses. *Toxicol Appl Pharmacol* 214:318–325.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.01.007>