

Az OTKA által támogatott, 100701 azonosító számú „A xenobiotikum anyagcsere oxidatív stressz okozta megváltozásának megelőzése sertés bél- és májsejt ko-kultúra modellen” című pályázat zárójelentése

Bevezetés

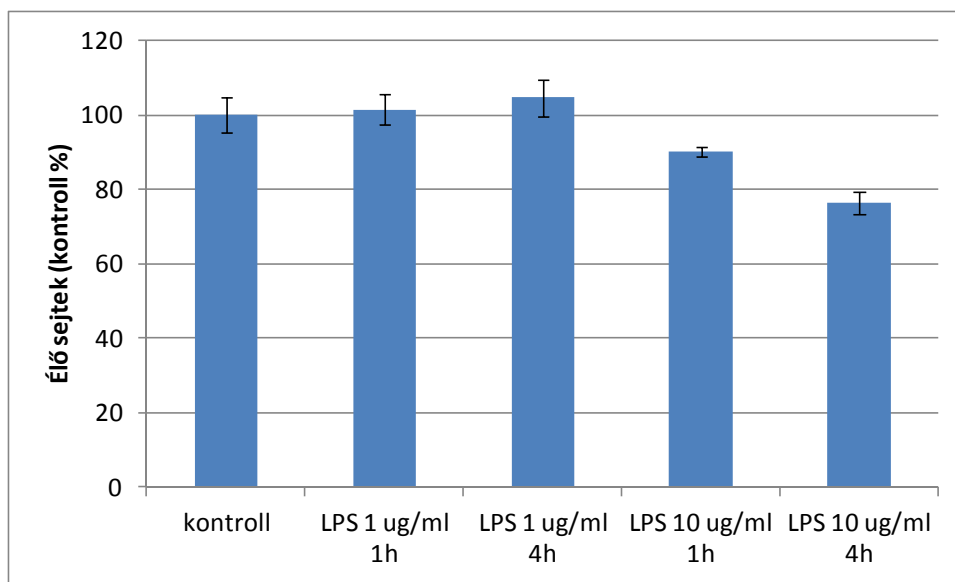
Az állati emésztőrendszer illetve az azzal szoros kapcsolatban álló máj működésének számos fontos összefüggésének megismerésére nyílik lehetőség nem tumoros eredetű sejtvonalak és primer sejttípusok felhasználásával. Az egyféle sejtípust tartalmazó mono-kultúrákkal szemben a kettő vagy többféle sejtípusból álló bél-máj ko-kultúra rendszerek az *in vivo* viszonyokat még pontosabban leíró modellként szolgálhatnak különféle molekulák bélbeli felszívódásának, biológiai hasznosulásának és májbeli biotranszformációjának tanulmányozására. A ko-kultúrák alkalmazásával állatkísérletek száma tovább csökkenthető. A bélhámsejtek és a májsejtek enterohepatikus anyagforgalmának modellezésére alkalmas, állati eredetű ko-kultúra sejtmodellt azonban eddig még nem készítettek. Az egyetlen, eddig leírt modell humán, tumoros eredetű sejtvonalat tartalmaz (Caco-2 humán colon adenocarcinoma és HepG2 humán hepatocita karcinóma). Kutatásunk elsődleges célja egy új, erre alkalmas, differenciálódott sertés bélhámsejtekből (IPEC-J2) és sertés primer májsejtekből álló ko-kultúra sejtmodell kidolgozása volt. Másodsorban azt tanulmányoztuk, hogy a mikrobiális lipopoliszacharid (LPS) és reaktív oxigén vegyületek hatására a bélhámsejtek által termelt gyulladásos mediátorok hogyan befolyásolják a májsejtek xenobiotikumok, így gyógyszerek metabolizmusában kulcsfontosságú citokróm P450 enzimjeinek aktivitását.

A kis-dózisú antibiotikumok hozamfokozóként való felhasználását az Európai Unió 2006-tól betiltotta, mivel bizonyos antibiotikumokkal szemben egyes kórokozó baktériumokban rezisztencia alakult ki. Ebből adódóan egyre növekszik az igény, hogy a kis-dózisú antibiotikumokat különféle természetes anyagok, például probiotikumok váltsák fel. Ezért különféle probiotikus mikrobák (*Lactobacillus* és más nemzetségbe tartozó fajok) sejtmentes felülszójának, illetve egyes anyagcsere-termékeiknek, így a nátrium n-butirátnak potenciális gyulladásgátló hatását tanulmányoztuk a ko-kultúra sejtmodell segítségével.

Gyulladás modellezése bakteriális eredetű lipopoliszachariddal IPEC-J2 bélhám monokultúrán

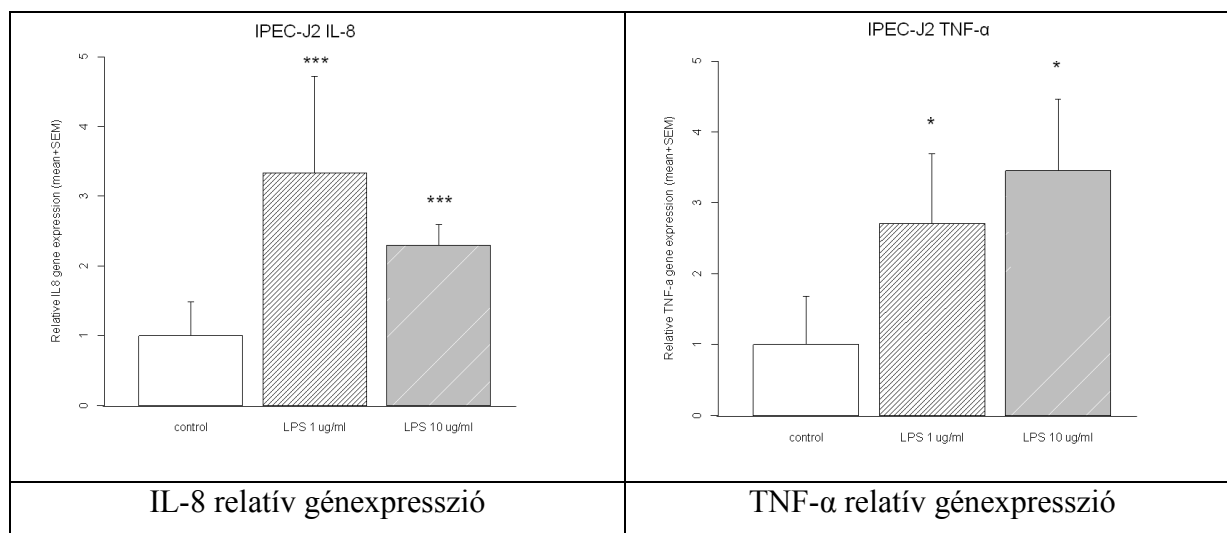
Korábbi kutatási projektünk során (OTKA 76133 azonosító számú „A bélhámsejtek oxidatív stressz okozta gyulladásának gátlása probiotikus tejsavbaktériumokkal: hatásmechanizmus és alkalmazhatóság antibiotikum-helyettesítő hozamfokozásra választási malacokon” című pályázat) kidolgoztuk az IPEC-J2 sertés bélhám-sejtvonal tenyésztési körülményeit, valamint létrehoztunk egy olyan *in vitro* rendszert, amely az oxidatív stressz modellezésére valamint a védő hatású vegyületek tesztelésére alkalmazható. Jelen projektünk témája szervesen kapcsolódott az előző kutatáshoz, hidrogén-peroxid (oxidatív stressz kiváltás) helyett, illetve mellette nagyobb hangsúlyt akartunk fektetni a gyulladás modellezésére. A gyulladást bakteriális eredetű lipopoliszachariddal (LPS) váltottuk ki.

Első lépésben megvizsgáltuk, hogy az milyen hatással van az LPS bélhámsejtek életképességére. Az IPEC-J2 sejtek vitalitását Neutral Red assay-vel vizsgáltuk, többféle kezelési időt és kezelési koncentrációt alkalmazva. A vizsgálatok 96 lyukú mikroplate-en történtek. Elmondhatjuk, hogy az alkalmazni kívánt koncentrációk (az szakirodalom alapján 1 µg/ml és 10 µg/ml) egy órás kezelési idő esetében az IPEC-J2 sejtek több mint 90%-a életképes maradt (1. ábra). Megállapítottuk, hogy 4 órás 10 µg/ml LPS kezelést alkalmazva az élő sejtek száma jelentősen (több mint 20-kal) csökken.



1. ábra Bakteriális eredetű LPS hatása az IPEC-J2 sejtek életképességére – élő sejtek mennyiségének meghatározása Neutral Red teszt alapján. Az 1 órás LPS kezelés (1 illetve 10 µg/ml) nem jár szignifikáns mértékű sejtpusztulással, így biztonságosan alkalmazható IPEC-J2 kultúrán

Következő lépésben kidolgoztuk a kollagénnel bevont poliészter membrán inzerten tenyésztett IPEC-J2 bélhámsejtek LPS kezelésének módszerét. Kétféle LPS-t használtunk, *Salmonella typhimurium* illetve *Escherichia coli* eredetűt, 1 µg/ml illetve 10 µg/ml koncentrációban alkalmazva. A kezelési idő 1 óra volt (mint korábbi kísérleteink során a H₂O₂ kezelés esetében). Az LPS kezelés hatását az IPEC-J2 sejtréteg integritására TER (transzepiteliális elektromos ellenállás) méréssel követtük nyomon. Megállapítottuk, hogy a kezeléseket követően a TER érték csökken, majd 24 óra elteltével regenerálódik. A sejtekből az egy órás kezelési és egy órás várakozási idő után -megfelelő mintaelőkészítést követően - q-PCR módszerrel meghatároztuk az IL-6, IL-8 és TNF-α gének relatív expresszióját a háztartási génekhez (CycA és HPRT) viszonyítva. Megállapítottuk, hogy az IL-6 expressziója a különböző eredetű és koncentrációjú LPS kezelések hatására a kontrollhoz képest nem változott. Mind a *S. typhimurium*, mind az *E. coli* eredetű LPS kezelés esetében megfigyelhető volt az IL-8 és a TNF-α gén up-regulációja (2. ábra). A sejtenyészetek apikális és bazolaterális tápfolyadékából 1 órás kezelési és 24 órás várakozási idő elteltével szendvics ELISA módszerrel mértük az IL-8 mennyiségét (előkísérleteink alapján 24 órásnál rövidebb - 4, 6 ill. 12 óra- várakozási idő alatt nem mutatható ki a kontroll mintákhoz képest szignifikáns eltérés LPS-kezelés után az IL-8 koncentrációjában). Megállapítható, hogy mind az apikális, mind a bazolaterális folyadéktérből vett mintáknál szignifikánsan megnőtt az IL-8 koncentrációja a kontroll mintákhoz képest az 1µg/ml és a 10µg/ml-os LPS kezelés hatására.



2. ábra Az IL-8 és a TNF-α relatív expressziója szignifikánsan megnő az 1 órás (1-10 µg/ml) LPS kezelés hatására IPEC-J2 sejtekben.

A bazolaterális tápfolyadékban jelentősen nagyobb (kb. hétszeres) mennyiségű IL-8-at mutattunk ki az apikális tápfolyadékban mért IL-8 szinthez képest. Ez az eredmény előrevetíti annak a lehetőségét, hogy a létrehozandó ko-kultúrában a bélhámsejtek által leadott IL-8 a

bazolaterális térbe kerülve gyulladáskeltő hatást fog kifejteni a májsejtekre. Megállapítottuk, hogy mind az *E. coli*, mind a *S. typhimurium* jól alkalmazható gyulladás kiváltására és modellezésére az IPEC-J2 bélhámsejt-kultúrán.

Korábban vizsgáltuk 1mM-os H₂O₂ IPEC-J2 sejtek IL-8 termelésére gyakorolt hatását ELISA módszerrel. Érdekes, hogy ebben az esetben az apikális térbe kiválasztódó IL-8 mennyisége 24 óra eltelte után több volt, mint a bazolaterális térben mérté, de a kontroll mintákhoz képest a bazolaterális IL-8 koncentráció is szignifikan megnőtt. A korábban 1mM H₂O₂-vel történő kezelést 0,5 mM koncentráció alkalmazásával megismételtük. Megállapítottuk, hogy az oxidatív stressz így is jól modellezhető, miközben az élő sejtek száma növekszik. A qRT-PCR vizsgálatok mindhárom vizsgált gén (IL-6, IL-8, TNF- α) esetén up-regulációt mutatott a kezeletlen kontroll mintákhoz képest.

Elvégeztük a primer sertés hepatociták izolálását és jellemzését. A sejtizoláláshoz 15 kg tömegű, magyar nagyfehér fajtájú ártány sertéseket használtunk, amelyeken medián laparotómiát végeztünk, és a máj aszeptikus kiemelését követően leválasztottuk a *processus caudatus*-t. Az izolált lebenyt több lépcsőben perfundáltuk, majd a sejteket kollagenáz segítségével emésztettük (1. kép), és a Glisson-tok felvágását követően sejtenyészítő médiumban reszuszpendáltuk.



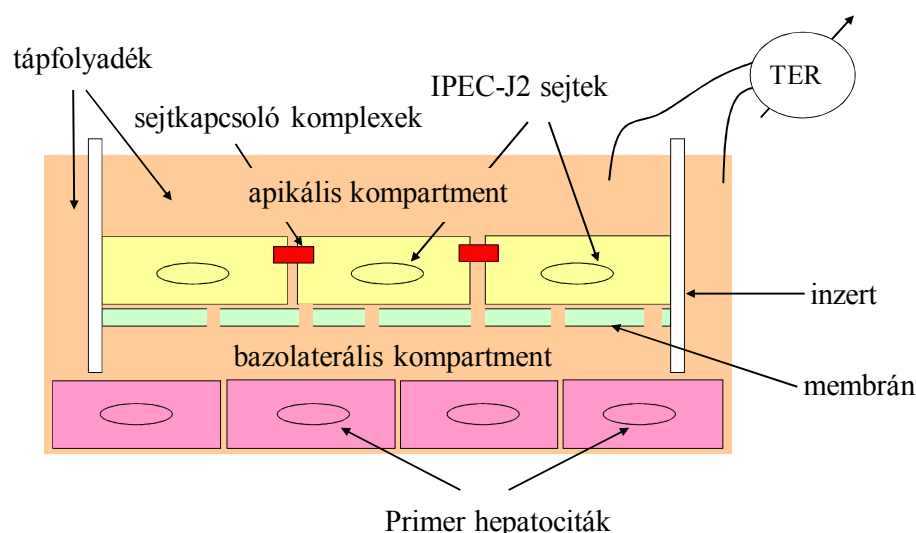
1. kép: Az izolált májlebens kezelés kollagenáz enzimmel – a sejtkapcsoló komplexek felbomlása

Háromszori centrifugálás (50g, 2 perc) és reszuszpendálás után tripánkékes festéssel határoztuk meg a sejtek életképességét, amely minden esetben 90% felettinek adódott. A májsejteket – előzőleg kollagénnel bevont – 6-lyukú lemezekben tenyésztettük (6×10^5 sejt/lyuk) 24 óráig, mialatt a tenyészetek minden esetben konfluenssé váltak. Ekkor a sejteket különböző eredetű (*Salmonella typhimurium* és *Escherichia coli*), illetve koncentrációjú (1 és 10 μ g/ml) LPS-sel kezeltük 1, valamint 4 órán keresztül. További kezelést végeztünk 0.5 mM

hidrogén-peroxid alkalmazásával (H_2O_2). Célunk annak vizsgálata volt, hogy a közvetlenül (vagyis nem a bélhámsejteken keresztül) kiváltott gyulladás hatására hepatociták interleukin-8 termelése növekszik-e, illetve hogy megnézzük, történik-e változás a CYP enzimek expressziójában. Szendvics ELISA segítségével meghatároztuk a médium albumin- és IL-8-tartalmát. Az albumin a májsejtek vitalitásának markereként szolgált. Az immunhisztokémiai jellemzéssel szemben a hepatociták által termelt albumin mennyisége nem csak kvalitatív, hanem kvantitatív jellemzője is a vizsgált sejteknek, valamint az albumin szint meghatározásával egy további paraméter adódik a ko-kultúra kísérletek során a kontroll és a kezelt minták összehasonlítására. A kontroll sejtek az irodalmi adatoknak megfelelő mennyiségben adtak le albumint a tápfolyadékba, az LPS által kiváltott stressz viszont minden esetben szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkentette a hepatociták albumintermelését, amely a stressz hatására beindult gyulladásos folyamatokkal magyarázható.

Ezt támasztja alá, hogy az LPS-kezelés is szignifikánsan fokozta a hepatociták IL-8 szekrécióját. Sem az endotoxinok eredete, sem az alkalmazott koncentráció, valamint a stimulus időtartama nem befolyásolta szignifikánsan a sejtek albumin- és interleukin-termelését. A hepatocitákból qRT-PCR-rel mért CYP1A1, CYP1A2 és CYP3A29 enzimek expressziójában sem történt változás a kontroll mintákhoz képest.

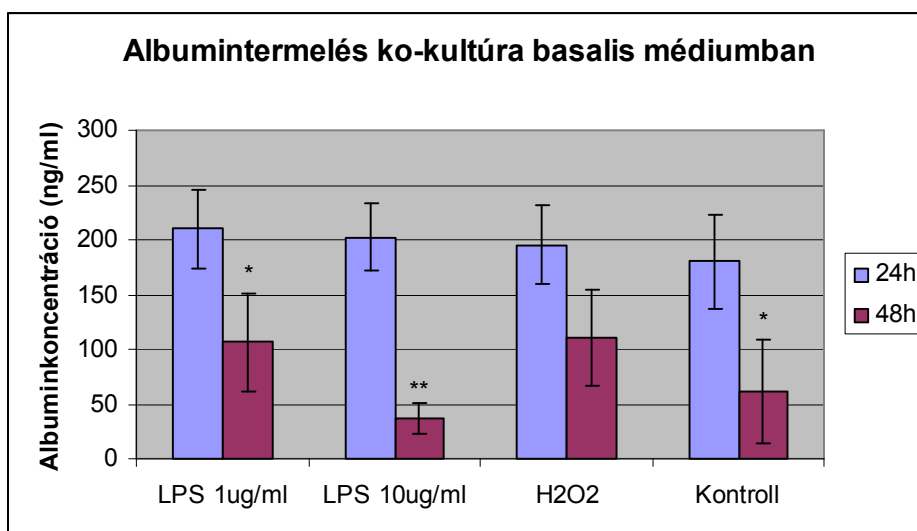
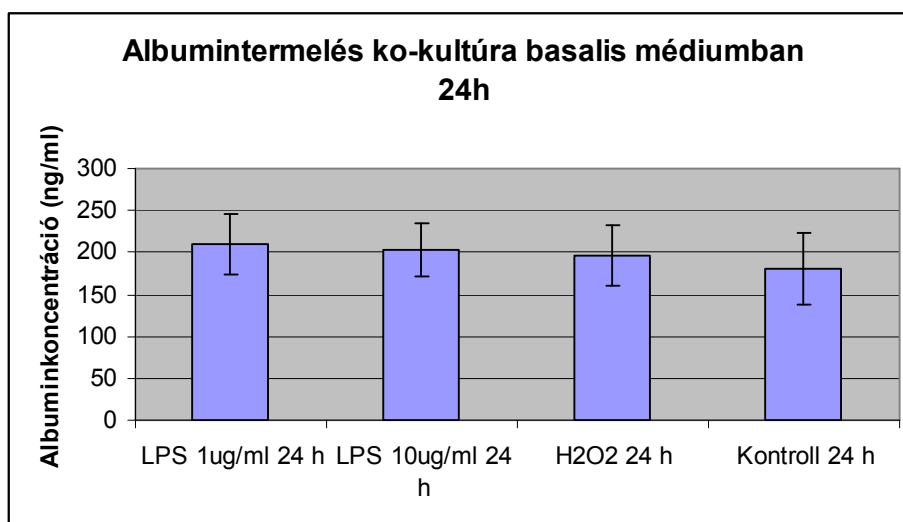
Az IPEC-J2 sejtek LPS kezelésének módszerének kidolgozása és a primer hepatociták jellemzése után létrehoztuk az IPEC-J2 és hepatocita ko-kultúrát (3. ábra).



3. ábra A sertés bélhám-májsejt ko-kultúra felépítése. A kollagénnel bevont poliészter membrán inwerten tenyésznek az IPEC-J2 sertés jejunum eredetű, kellő mértékben differenciálódott (sejtkapcsoló komplexek kialakultak, TER megfelelő értéket vett fel) sejtek.

A tenyésztőedény kollagénnel bevont alján helyezkednek el a sertésből származó primer hepatociták. Az apikális és a bazolaterális kompartment között kizárólag a bélhámsejteken keresztül történhet anyagforgalom.

A hepatocita izolálás után 24 órával a konfluens primer májsejttenyészetekre maximálisan polarizálódott IPEC-J2 sejteket tartalmazó inzerteket helyeztünk, így az IPEC-J2 sejtek bazolaterális kompartmentjébe a májsejtek kerültek, míg az apikális kompartmentet az IPEC-J2 sejtek lumenális felülete képezte. Az IPEC-J2 sejtekben az oxidatív stresszt hidrogén-peroxid és *S. enterica* LPS hozzáadásával váltottuk ki többféle koncentrációt és mintavételi időt (24 h és 48h) alkalmazva az apikális kompartmentben. A kezelések hatását az IPEC-J2 sejtréteg integritására TER méréssel követtük nyomon.

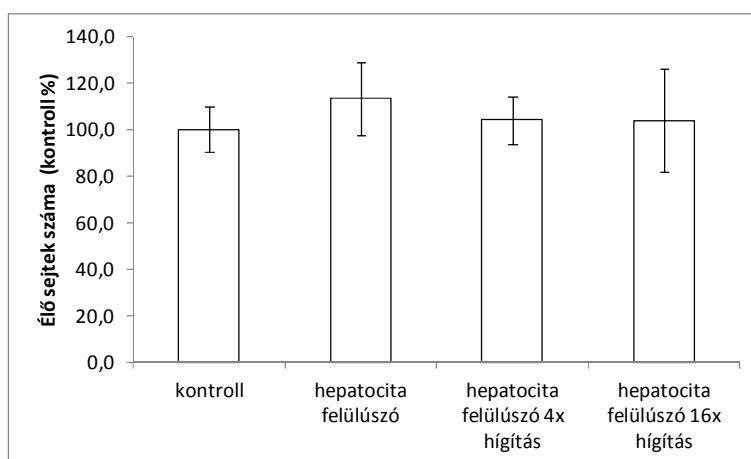


4. ábra A hepatociták albumintermelése, mint életképességük markere. A primer hepatociták 24 órán keresztül életképesek maradtak. LPS és H₂O₂ kezelés hatására a hepatociták albumintermelése 48 óra elteltével jelentősen csökkent.

A bazolaterális kompartment tápfolyadékból ELISA módszer segítségével mértük a hepatociták által termelt albumin és az enterociták által leadott IL-8 mennyiségét. A CYP1A1, CYP1A2 és CYP3A29 enzimek expresszióját qRT-PCR-rel a májsejtekből határoztuk meg.

A TER értékek és a májsejtek által termelt albumin mennyiségének meghatározása alapján megállapítható, hogy a ko-kultúra 24 órán keresztül életképes maradt (4. ábra).

A bazolaterális kompartmentben az apikálisan alkalmazott LPS kezelést követően kimutatható volt az IL-8; 10µg/ml LPS koncentráció esetén az IL-8 érték szignifikánsan nőtt. Ugyanakkor a CYP1A2 és a CYP3A29 expressziója a májsejtekben az alkalmazott LPS koncentrációtól függően változott. Ezzel ellentétben a primer májsejttenyészetek LPS-sel történő közvetlen kezelése nem befolyásolta ugyanezen CYP gének expresszióját. Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy a CYP-expresszió csak az enterociták által termelt közvetítő anyagok (citokinek) szerepe révén változhat, ami kiemeli a kialakított ko-kultúra modell jelentőségét.



5. ábra Hepatocita felülűsző hatása az IPEC-J2 sejtek életképességére – Neutral Red vitalitás teszt

Mivel az LPS-sel történő kezelés után a ko-kultúra rendszerben nem történt tápfolyadékcseré, felmerül, hogy a primer hepatocitákból keletkező és felhalmozódó metabolitok kedvezőtlenül befolyásolják az IPEC-J2 sejtek életképességét. Ennek megállapítására a hepatociták 24 órás felülűszőjából vett mintával kezeltünk IPEC-J2 sejteket 96 lyukú tenyésztőedényen, és

Neutral Red módszerrel vizsgáltuk a sejtek életképességét. Nem találtunk szignifikáns különbséget a kezelt és a kezeletlen bélhámsejtek életképessége között (5. ábra).

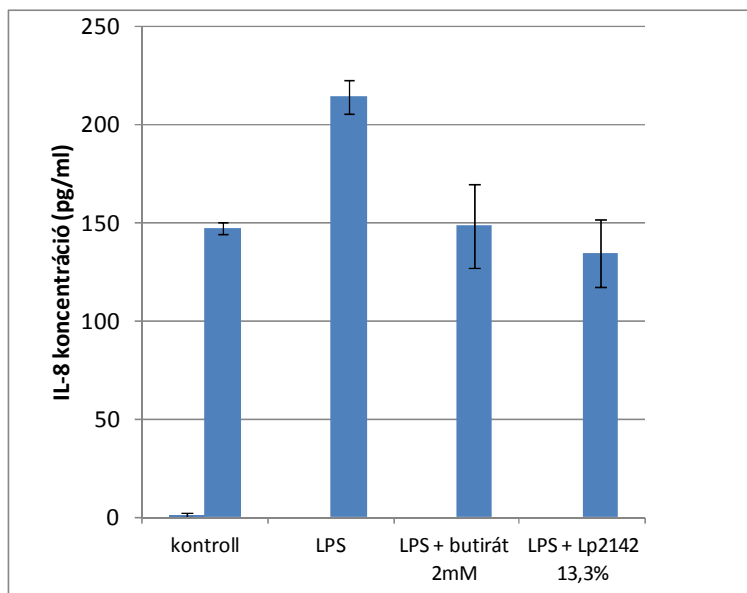
A fenti eredmények alapján megállapítható, hogy az általunk kidolgozott enterocita-hepatocita ko-kultúra jól alkalmazható az enterohepatikus kommunikáció modellezésére.

Hogyan befolyásolja a probiotikumokkal történő kezelés a sertés bélhám monokultúra paramétereit gyulladásos állapotban?

Korábbi kutatásunk során vizsgáltuk különböző probiotikus baktériumok sejtmentes szűrletének csillapító hatását hidrogén-peroxiddal indukált oxidatív stressz esetén IPEC-J2 sejt kultúrán. Védő tapasztaltunk a *Lactobacillus* nemzetségbe tartozó baktériumok esetén, különösen a *Lactobacillus plantarum* 2142 (*Lp* 2142) baktériumtörzs alkalmazásakor. Ezen eredményeinkből kiindulva LPS indukálta gyulladás esetén is megvizsgáltuk három, *Lactobacillus* nemzetségbe tartozó törzs (*Lp* 2142, *Lactobacillus plantarum* 299v – *Lp*299v és a *Lactobacillus casei* Shirota – *Lp* Sh.) valamint egyik legfontosabb anyagcseretermékük, a Na-n-butirát IPEC-J2 sejtekre gyakorolt gyulladáscsökkentő hatását. Ezen kívül egy korábban általunk nem vizsgált, ám sertések esetében takarmány kiegészítőként alkalmazott baktériumtörzs, a *Bacillus licheniformis* (*B. lich.*) felülűszójának esetleges gyulladáscsökkentő hatását is teszteltük.

Vizsgálataink során maximálisan polarizált IPEC-J2 sejteken 1 illetve 10 µg/ml 1 órán keresztül tartó LPS kezeléssel gyulladást keltettünk, majd további 1 óra várakozást követően qPCR-rel követtük nyomon két gyulladásos citokin, az IL-8 és a TNF-α relatív génexpresszió-változását a különböző bakteriális felülűszók illetve a nátrium n-butirát hatására. A felülűszók előzetes kísérleteink alapján 13,3% koncentrációban voltak hatékonyak, a butirát pedig 2mM-os koncentrációban, ezért mostani kísérleteink során is ebben a koncentrációban alkalmaztuk őket. A *Lp* 2142 13,3 %-os felülűszója szignifikáns mértékben csökkentette az LPS kezelés következtében megnövekedett IL-8, és a TNF-α génexpressziót, mind az 1 µg/ml, mind a 10 µg/ml lipopoliszacharid kezelés esetén. Hasonlóan pozitív, szignifikánsan IL-8 csökkentő hatást tapasztaltunk a 2mM-os butirát kezelést követően. Ezzel szemben a *Lp* 299v és a *Lp* Sh. 13,3 %-os felülűszója nem csökkentette szignifikánsan a vizsgált célgének expresszióját. A *B. lich.* 13,3 %-os felülűszója önmagában és LPS-sel együtt alkalmazva is jelentősen növelte mind az IL-8, mind a TNF-α génexpresszióját, 24 óra várakozást követően pedig a sejtenyészet pusztulását okozta.

Az ígéretesnek tűnő *Lp 2142* felülúszó és a butirát hatását fehérje szinten, IL-8 koncentráció ELISA módszerrel való kimutatásával is bizonyítottuk. A vizsgált két anyag LPS-sel együtt (1 µg/ml és 10 µg/ml) apikálisan alkalmazva 24 óra elteltével jelentősen csökkentette az IL-8 mennyiségét a bazolaterális tápfolyadékban (6. ábra).



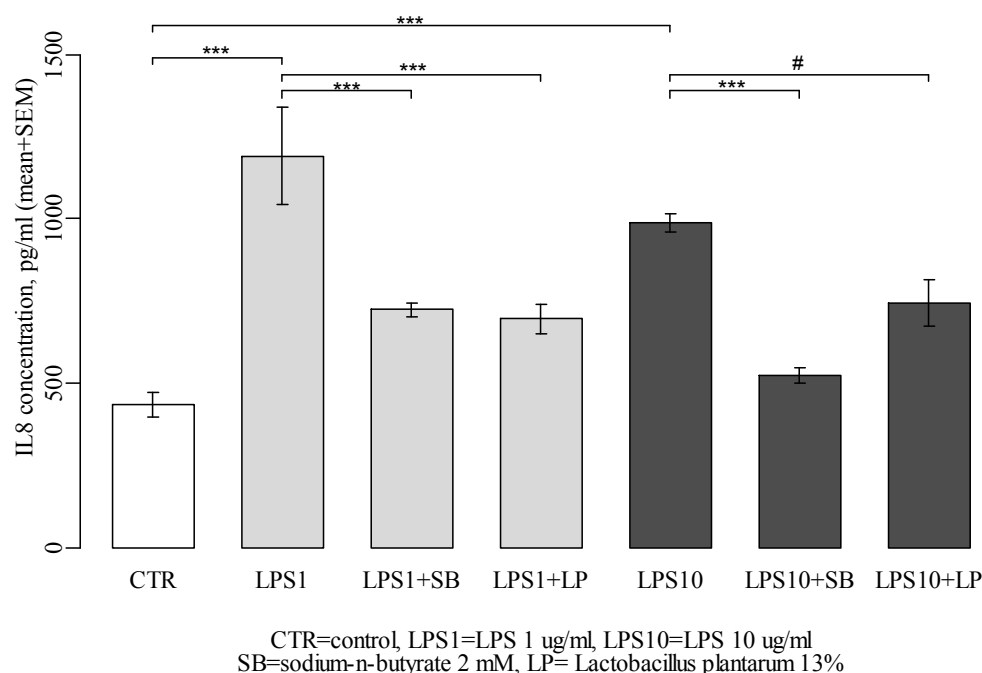
6. ábra *Lactobacillus plantarum* (felülúszó, 13,3%) illetve nátrium n-butirát (2mM) kezelés gyulladáscsökkentő hatása az LPS-sel kezelt IPEC-J2 bélhám monokultúrára – IL-8 koncentráció meghatározás a bazolaterális tápfolyadékban

A fenti eredmények alapján az *Lp2142*-t és a butirátot választottuk tesztanyagunk további kísérleteinkhez, melyeket bélhám-májsejt ko-kultúrán hajtunk végre. Az IPEC-J2 sejtekből a bazolaterális folyadéktérbe kiválasztódó IL-8 okozhat gyulladást a modellrendszerünkben alul elhelyezkedő hepatocitákon, tesztanyagaink pedig a gyulladást csillapítva akadályozhatják meg mind a bélhám, mind a májsejtek károsodását.

Lactobacillus plantarum 2142 sejtmentes szűrletének és a nátrium n-butirát gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata bélhám-májsejt ko-kultúrán

A továbbiakban a konfluens primer májsejttenyészetből és maximálisan polarizálódott IPEC-J2 sejtekből kialakított ko-kultúra modellen teszteltük a *Lp2142* és a butirát gyulladást csökkentő hatását. Az IPEC-J2 sejtekben az oxidatív stresszt *Salmonella enterica* LPS hozzáadásával váltottuk ki – a tavalyi kutatási eredményeink alapján 1 és 10 µg/ml-es

koncentrációt, 1 órás kezelési valamint 24 órás várakozási időt alkalmazva az apikális kompartmentben. A kezelések hatását az IPEC-J2 sejtréteg integritására TER méréssel követtük nyomon. A bazolaterális kompartment tápfolyadékából ELISA módszer segítségével mértük az enterociták által leadott IL-8 mennyiségét. Kísérletünket nem csak a ko-kultúrán, hanem primer hepatocita tenyészetben is elvégeztük és a vizsgált paramétereket a két rendszerben összehasonlítottuk.



7. ábra A bazolaterális térben mért IL-8 koncentráció (pg/ml) IPEC-J2-primer hepatocita ko-kultúrán LPS (1 és 10 µg/ml) kezelés, valamint védő hatású anyagok (Lactobacillus plantarum felülűszó (13,3%) illetve butirát (2mM)) hatására.

A ko-kultúrában a bazolaterális kompartmentben az apikálisan alkalmazott LPS kezelést követően az IL-8 érték szignifikánsan nőtt, mind az 1 µg/ml, mind a 10 µg/ml kezelést követően. A primer májsejtkultúra felülűszójában is jelentős értékben megnövekedett az IL-8 mennyisége mind az 1 µg/ml, mind a 10µg/ml LPS kezelés hatására. Jelentős különbséget figyelhetünk meg a két modellrendszerben a gyulladáscsökkentő hatású testanyagok hozzáadása után. A *Lp 2142* felülűszója és a butirát hatására az IL-8 szint jelentősen csökkent a bazolaterális folyadékterben a ko-kultúra modellben. Ezzel szemben a hepatocita sejtkultúrán nem tapasztaltunk IL-8 csökkentő hatást *Lp 2142* illetve butirát és LPS együttes

alkalmazásakor. A butirátot és a *Lp2142* felülúszót együttesen adva vizsgáltuk esetleges szinergikus hatásukat a két modellrendszerben. Az együttes kezelés sem a ko-kultúrán, sem a hepatocitákon nem eredményezett szignifikáns nagyobb IL-8 csökkenést ahhoz képest, amikor a két tesztanyagot külön-külön alkalmaztuk (7. ábra).

Az IL-8 koncentrációja mellett vizsgáltuk egy másik gyulladásos citokin, az IL-6 koncentrációjának változását LPS kezelés illetve a védő hatású anyagok hatására. Tapasztalataink hasonlóak voltak, mint az IL-8 meghatározásakor; a *Lp 2142* felülúszója és a butirát hatására a bazolaterális térben mért IL-6 szint szignifikánsan csökkent a ko-kultúra modellben. A hepatocita monokultúrán viszont nem tapasztaltunk IL-6 csökkentő hatást *Lp 2142* illetve butirát és LPS együttes alkalmazásakor.

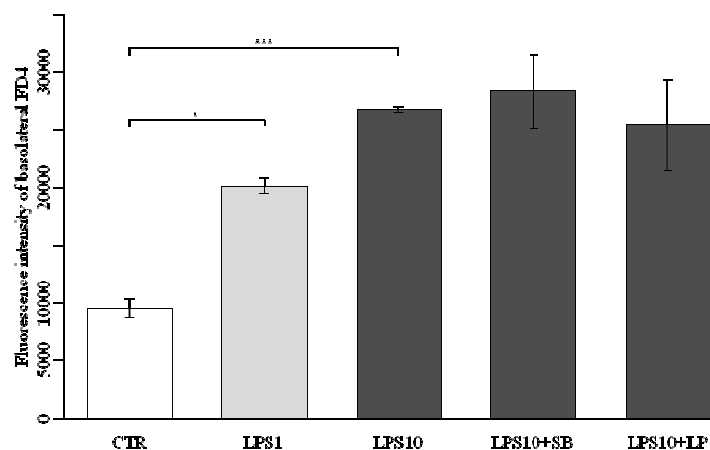
Vizsgáltuk mind a ko-kultúra, mind a hepatocita mono-kultúra esetében a CYP1A1, CYP1A2 és CYP3A29 enzimek expresszióját. A relatív génexpresszió mértékét qPCR-rel a májsejtekből határoztuk meg. Megállapítható, hogy a vizsgált gének expressziója a ko-kultúra májsejtjeiben az alkalmazott LPS koncentrációtól függően változott - 1 µg/ml -es LPS kezelés down-, a 10 µg/ml-es kezelés up-regulációt eredményezett. Ugyanakkor a gyulladáscsökkentő anyagok alkalmazásakor nem találtunk egyértelmű CYP enzimeket befolyásoló hatást sem a mono-kultúra, sem pedig a ko-kultúra esetében.

Megállapítható, hogy az általunk kidolgozott enterocita-hepatocita ko-kultúra jól alkalmazható az enterohepatikus kommunikáció modellezésére, és a vizsgált *Lp2142* felülúszó és a Na-butirát alkalmasak lehetnek bakteriális eredetű bélgyulladás csillapítására.

További kísérletek IPEC-J2 monokultúrán illetve primer hepatocita monokultúrán

A gyulladásos citokin markereken kívül vizsgáltuk a bélhám integritását, melynek szintén nagy jelentősége van a fertőzések és az oxidatív stressz kivédése szempontjából. Az LPS kezelés hatását a sejtréteg integritására transzepiteliális elektromos ellenállás (TER) méréssel és fluoreszcein izotiocianát-dextrán (FD4) átjutás vizsgálatokkal, a reaktív oxigén fajták (ROS) termelődésének mértékét az LPS (1 és 10 µg/ml, 1 órán át alkalmazva) által kiváltott gyulladásos folyamatban Amplex-red alapú fluorimetriás méréssel követtük nyomon. Vizsgáltuk, hogy a *Lp 2142* sejtmentes felülúszója valamint a butirát milyen mértékben képes a sejteket az LPS által okozott barrier károsodástól megvédeni. Megállapítottuk, hogy az LPS számottevő ROS képződés nélkül idézte elő a sejt-egyrétegen keresztül a paracelluláris permeabilitás növekedését, melyet az FD4 apiko-bazolaterális transzport jelentős mértékű

növekedése mutatott (8. ábra). Az FD4 mennyisége a *Lp2142* és a butirát hatására nem csökkent szignifikánsan. A TER mértéke sem az LPS kezelés, sem a tesztanyagok hatására nem változott számottevően.



8. ábra A paracelluláris permeabilitás változása IPEC-J2 mono-kultúrán LPS, *Lactobacillus plantarum* 2142 sejtméntes szűrlet (LP) illetve butirát (SB) hatására.

Az Amplex Red próba alapján kijelenthetjük, hogy a mono- illetve ko-kultúra kísérletekben az általunk használt LPS koncentrációtartományban (1-10 $\mu\text{g/ml}$) intracelluláris ROS képződés nem tapasztalható. Nagyobb koncentrációjú LPS kezelés ($\geq 50 \mu\text{g/ml}$) intracelluláris H_2O_2 képződéshez vezet, azonban az LPS-t –citotoxikus hatása- miatt ebben a koncentrációtartományban ko-kultúra kísérleteinkben nem használtuk.