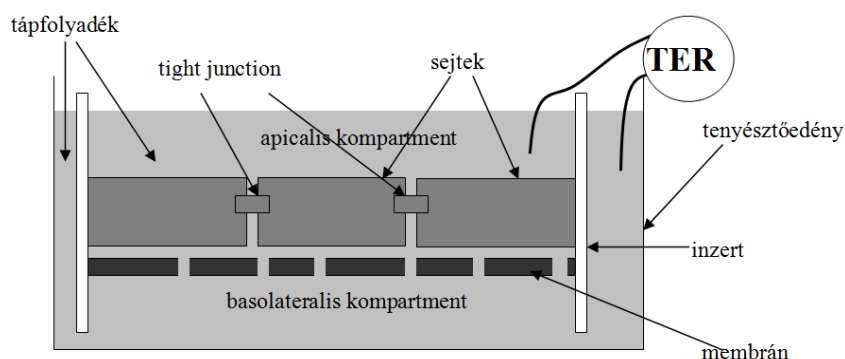


**Az OTKA által támogatott, 76133 azonosító számú „A bélhámsejtek oxidatív stressz okozta gyulladásának gátlása probiotikus tejsavbaktériumokkal: hatásmechanizmus és alkalmazhatóság antibiotikum-helyettesítő hozamfokozásra választási malacokon” című pályázat zárójelentése.**

Az elmúlt években a kis-dózisú antibiotikumok hozamfokozóként való felhasználását az Európai Közösség 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, probiotikumok váltsák fel. A probiotikumok olyan élő mikrobiális táp- illetve élelmiszer kiegészítők, amelyek elfogyasztva jótékony hatással vannak a gazdaszervezet egészségi állapotára, jó közérzetére. A probiotikumok pozitív hatásait már számos esetben igazolták a bélrendszer fertőzéseinek, rendellenességeinek illetve betegségeinek megelőzésében és/vagy kezelésében, azonban a jelenségek mögött húzódó mechanizmusok még sok esetben felderítésre várnak. Jelen pályázatban probiotikus baktériumok és anyagcsere termékeik hatását kívántuk tanulmányozni oxidatív stressz okozta citokin-termelés (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) mérséklésére.

**Előkísérletek.** Munkánk során először hidrogén-peroxiddal és a probiotikus baktériummal történő kezelés körülményeit pontosítottuk, hogy modellünk megfelelő legyen a további IPEC-J2 sertés jejunum sejtvonalon végzendő vizsgálatokhoz. Az előkísérletekhez humán vastagbél adenokarcinoma sejtvonalat (CaCo-2) használtunk, amely hasonlóan és spontán módon differenciálódik (transzepithelialis elektromos rezisztencia /TER/ mérés, **1. ábra**), mint a további kísérletekhez alkalmazott IPEC-J2 sertés jejunum sejtvonala.



**1. ábra** Az inzerten tenyésztett sejtek transzepithelialis elektromos rezisztencia /TER/ mérése

Vizsgáltuk a tenyésztés (tenyésztőedény felületén /inzert nélkül/, vagy membránon /inzerten/ szaporított sejtek), a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés (koncentráció és időtartam) és a kereskedelmi forgalomban

kapható, bizonyítottan probiotikus törzsek sejtmentes szűrlésével történő kezelés körülményeinek (/a/ előkezelés tejsavbaktériumok sejtmentes szűrlésével, majd H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés, /b/ tejsavbaktériumok sejtmentes szűrlésével és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-val egy időben történő kezelés, majd végül /c/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-val, majd a tejsavbaktériumok sejtmentes szűrlésével történő kezelés) hatását a sejtek életképességére (nekrózis, apoptózis) és IL-8 termelésére.

Eredményeink szerint az egy órás H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés esetén fellépő oxidatív-stressz következtében 24 óra múlva kialakuló sejthalál az inzert nélkül szaporított sejtek esetén már 1 mmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés során is fellép. Hasonló koncentrációjú (1 mmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) és időtartamú (1 óra) kezelésre az inzerten tenyésztett sejtek jóval ellenállóbbnak bizonyultak. Az inzerten szaporított sejtek esetében a sejthalál (nekrózis) csak 10 mmol/l vagy annál nagyobb koncentrációban alkalmazott H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelést követően (már 24 órán belül) jelentkezett. Az inzerten tenyésztett sejtek esetében a TER alakulását az 1 mmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés nem változtatta meg szignifikánsan. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelést követően kialakuló sejthalál típusa mind az inzert nélkül (1 mmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés), mind az inzerten (10 mmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés) szaporított sejtek esetében nekrotikusnak mutatkozott (DAPI festés), apoptózisra utaló jegeket nem tudtunk kimutatni (Annexin V festés). Mind az inzert nélkül, mind az inzerten tenyésztett sejtek esetében a tápfolyadékban mérhető IL-8 koncentráció emelkedése a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés koncentrációjával szignifikáns pozitív korrelációt mutatott és időfüggő volt, bár az inzerten az apikális H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelést követően az IL-8 apikálisan mérhető koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az inzert nélkül tenyésztett sejtek esetében. Az inzerten tenyésztett sejteknél az apikális H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelést követően az IL-8 apikálisan mérhető koncentrációja szignifikánsan magasabb volt, mint bazolaterálisan. A probiotikus baktérium szűrlésével (*Lactobacillus plantarum* 2142) történő kezelés legjobban a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezeléssel együtt alkalmazva csökkentette szignifikánsan az IL-8 szekréciót az inzert nélkül szaporított sejtek esetében. Vizsgálataink szerint az IL-8 szekréció csökkenés időfüggő volt. Abban az esetben, amikor a probiotikus baktériumok szűrlését a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés előtt vagy után alkalmaztuk, nem kaptunk szignifikánsan csökkenő változást a sejtek IL-8 termelésében.

Előkísérleteink alapján az IPEC-J2 sejtvonallal tervezett vizsgálatainkat a következőképpen végeztük: az oxidatív stressz okozta gyulladási folyamatok tanulmányozására a sejteket kizárólag membrán inzerten szaporítottuk, az apikális és bazolaterális kompartmentek kialakulását a TER növekedésével kontrolláltuk. Az akut oxidatív stressz kiváltására 1 mmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelést használtuk, mivel az nem okozott nekrotizist a kezelést követő 24 órában. A génexpresszióban bekövetkező változásokat a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelést követően 0,5; 1, 2, 4 órával vizsgáltuk. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hozzáadását a sejtekhez apikálisan végeztük és az IL-8 szekréciót mind az

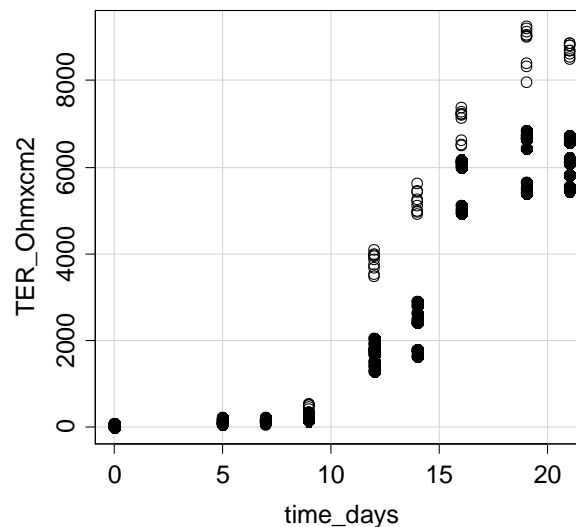
apikális, mind a bazolaterális kompartmentből meghatároztuk. Megállapítottuk, hogy a tejsavbaktériumok sejtmentes szűrletével történő kezelést a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezeléssel együtt szükséges alkalmazni.

A 2009-es kutatási évben beszereztük az IPEC-J2 sejteket, amelyek optimális szaporodását ellenőriztük. Az IPEC-J2 sejtvonalat újszülött (12 óránál fiatalabb) sertés jejunumból izolálták. A sejtek fenntartásához és szaporításához DMEM/F12 (Mediatech) tápfolyadékot használtunk, amelyet kiegészítünk 5% hőinaktivált (56°C, 30 perc) FBS-sel (Hyclone). A sejtek optimális életkörülményeinek biztosítása érdekében a médiumhoz 5 µg/ml inzulint, 5 µg/ml transferrint és 5 ng/ml szelént (ITS premix, BD Biosciences), valamint epidermális növekedési faktort (EGF, Fisher 5ng/ml) adtunk. Az alkalmazott antibiotikum penicillin/streptomycin keverék (500 I.U. penicillin/ml és/500 µg/ml streptomycin) volt. A sejtek növekedése lassú (osztódási idő kb. 48 óra), ezért a passzálás 7-10 naponta történt. A passzálást 0,05% tripszin/0,02% EDTA oldattal végeztük, mely a sejteket nem károsította. A sejtek lefagyasztásához szükséges médium megegyezett a fenntartásukhoz alkalmazott tápfolyadékkal, kiegészítve 10% DMSO-val. A lefagyasztást a következő protokoll szerint végeztük: 4 óra -80°C-on ultramélyhűtőben izopropil-alkoholt tartalmazó fagyasztóedényben (Cryo 1 Degree C Freezing Container, NALGENE), majd 4 óra elteltével a sejteket folyékony nitrogénbe tettük és ott tároltuk a további felhasználásig (az eddig lefagyasztott sejttenyészetek száma 34 cső). A fagyasztási eljárás sikerességét többször ellenőriztük (letapadás 10-15%, konfluenssé válás 1-2 nap). A további kísérletekhez a folyékony nitrogénben tárolt sejteket használtuk és minden kísérlet sorozathoz újabb nitrogénben tárolt sejttenyészeteket indítunk, hogy elkerüljük a hosszú távú fenntartás során fellépő változásokat, amelyek során a sejtek fokozottan érzékenyvé válnak az oxidatív stresszel szemben, ami Caco-2 sejtek esetében is kialakul. A sejtek Mycoplasma mentességét szintén ellenőriztük (PCR vizsgálat).

## **I. KÜLÖNBÖZŐ TÍPUSÚ MEMBRÁN INZERTEKEN TENYÉSZTETT IPEC-J2 HÁMSEJTEK NÖVEKEDÉSE ÉS H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-KEZELÉST KÖVETŐ GÉNEXPRESSZIÓJA**

Vizsgálataink során a megfelelő modell kialakítása érdekében összehasonlítottuk a polikarbonát (PC) és a kollagénnel bevont poliészter (PE) inzertek hatását az IPEC-J2 sejtek polarizáltságára, valamint a hidrogén-peroxid kezelés hatását tanulmányoztuk a citokin expresszióra (**2. ábra, 1. táblázat**). A kollagénnel bevont poliészter (PE) inzerteken

tenyésztett IPEC-J2 sejtek már 1-2 nappal a kiültetés után maximálisan befedték az inzert felületét, ami mikroszkóppal jól megfigyelhető volt. A 8. naptól kezdve a transzepithelialis rezisztencia (TER) gyors növekedést mutatott és a 18-19. napra elérte a maximumát (~9-10000 Ohm $\times$ cm<sup>2</sup>), ami a sejtek maximális polarizáltsági fokát mutatta. A polikarbonát (PC) inzerten a TER alakulása az idő függvényében hasonlóan változott, a sejtek azonban csak a 20-21. napra érték el a maximális TER-értékeket, ami azonban alacsonyabb volt, mint a kollagénnel bevont (PE) inzerteken tenyésztett sejtek esetében (~6-7000 Ohm $\times$ cm<sup>2</sup>).

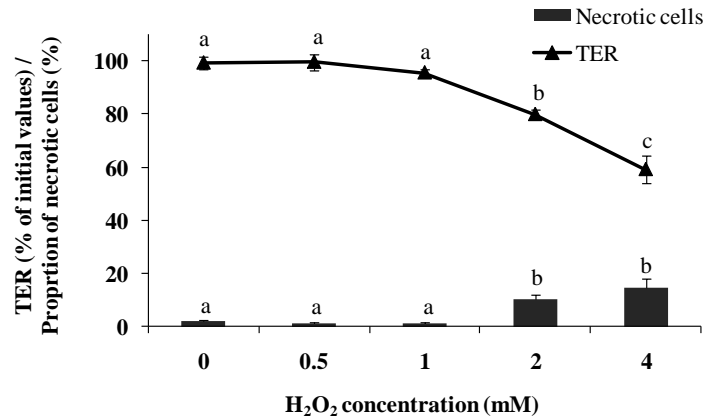


**2. ábra** A két különböző típusú inzerten tenyésztett IPEC-J2 sejtek TER értékének alakulása. Üres körök kollagénnel bevont poliészter membrán (PE), telt körök polikarbonát membrán (PC).

**1. táblázat** A TER értékének jellemzői polikarbonát és kollagénnel bevont poliészter membránon tenyésztett sejteknél. Átlag  $\pm$  SEM, n=7

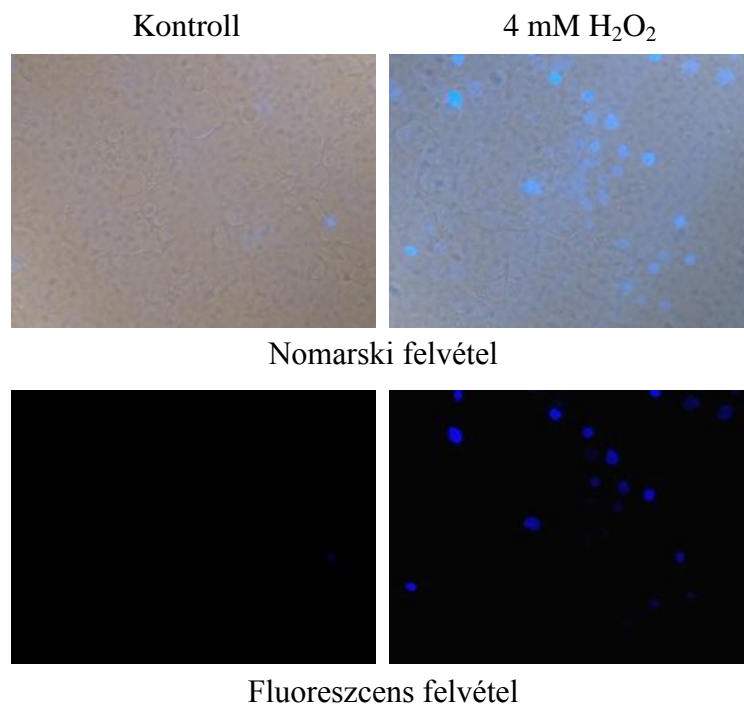
TER	Polikarbonát membrán (PC)	Kollagénnel bevont poliészter membrán (PE)
TER növekedés kezdete	8. nap	8. nap
TER növekedésének napi mértéke	663 Ohm $\times$ cm <sup>2</sup>	803 Ohm $\times$ cm <sup>2</sup>
Maximális TER	6135 $\pm$ 154 Ohm $\times$ cm <sup>2</sup>	8703 $\pm$ 46 Ohm $\times$ cm <sup>2</sup>

Megállapítottuk, hogy a kollagénnel bevont poliészter membrán inzert alkalmasabb az IPEC-J2 sejtek tenyésztésére, mint a polikarbonát inzert (TER növekedés mértéke és a végső TER magasabb az előbbi esetben). A 0.5-1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vel való kezelés nem változtatta meg az IPEC-J2 tenyészet TER-jét, 2 mM ~20%-os, 4 mM ~40%-os csökkenést okozott. A 0.5-1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vel való kezelés nem okozott az IPEC-J2 tenyészetben nekrozist, míg 2 mM a sejtek ~10%-ában, 4 mM ~15%-ában okozott nekrozist (**3.**, **4. ábrák**).



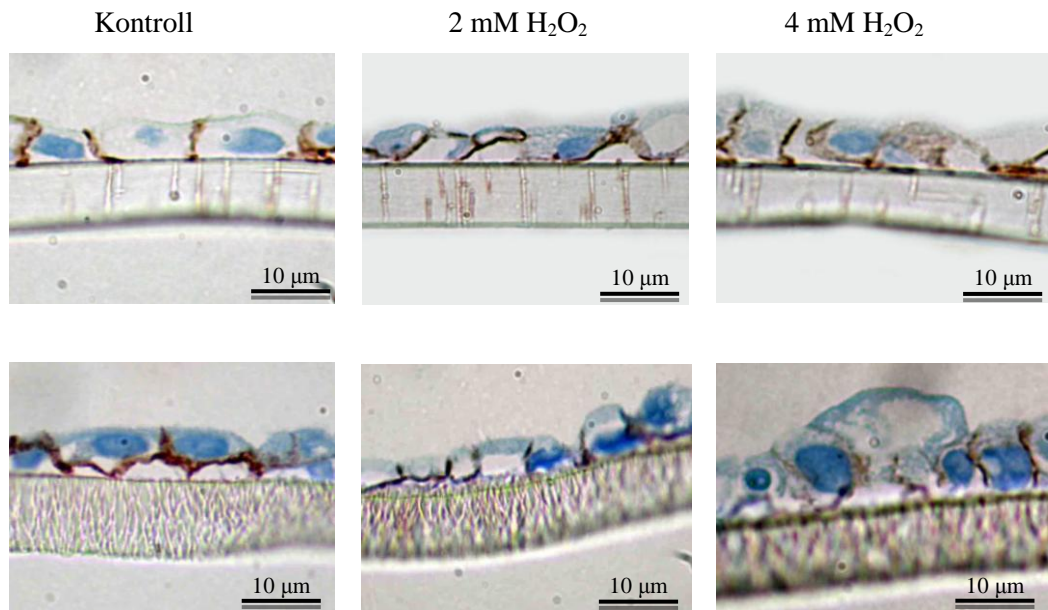
**3. ábra** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés hatása a TER és a nekrotikus sejtek %-os alakulására. A különbözően jelölt csoportok közti eltérés szignifikáns (P<0,05) Átlag ± SEM, n=3

A nagyobb hidrogén-peroxid koncentrációknál mért mérsékelt génexpresszió növekedésre a sejtenyészet sérülése adhat magyarázatot; ezt bizonyítja, hogy a hidrogén-peroxid koncentráció emelésével megnőtt a nekrotikus sejtek aránya (DAPI festés).



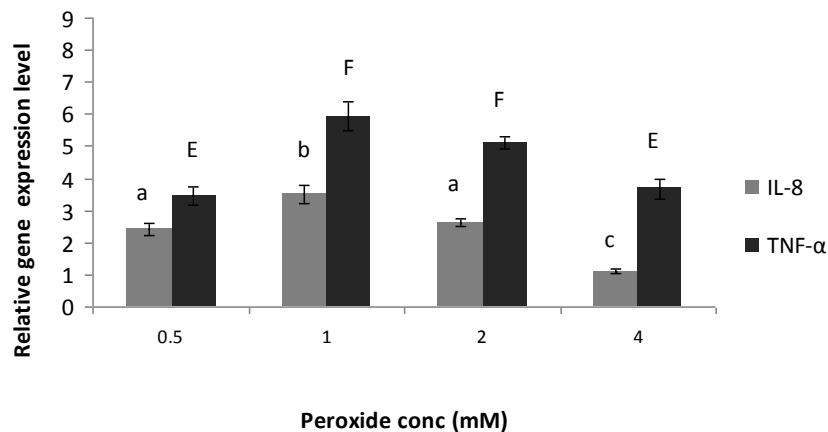
**4. ábra** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés hatása a nekrozis mértékének alakulására kollagénnel bevont poliészter membrán inzertten tenyésztett IPEC-J2 sejtenyészetben. A DAPI festés alapján (kék színben előtűnő fluoreszcencia) megállapítható, hogy a 0.5-1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal történő kezelés nem okoz sejtkárosodást. A 2 és 4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal történő kezelés a sejtek ~10 illetve ~15%-ában nekrozist okoz.

A vizsgált sejtkecses fehérjék (E-cadherin, claudin-1) eloszlásában nem tapasztaltunk változást a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés hatására (**5. ábra**).



**5. ábra** Sejtkapcsoló fehérjék kimutatása kollagénnel bevont poliészter membrán inzerten tenyésztett egyrétegű IPECJ-2 sejtenyészetben. A sejteket hidrogén-peroxid eltérő koncentrációival 1 órán át kezeltük. Az E-cadherint (felső sor) és a claudin-1 (alsó sor) kimutatása immunhisztokémiai módszerrel történt. A sejtek közötti barna színreakció az E-cadherin és a claudin-1 pozitivitást mutatja. A membrán pórusai a felvételeken jól kivehetők.

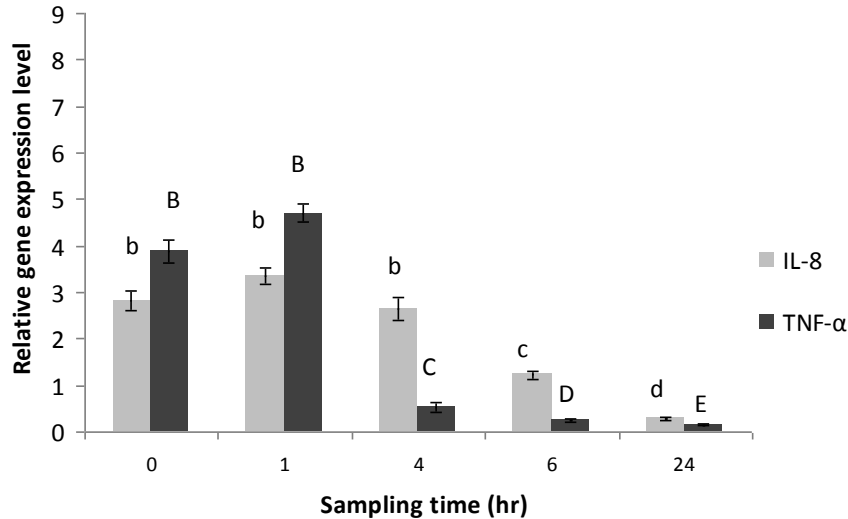
A gyulladós citokinek szintjének változását az alkalmazott peroxid mennyisége és a kezelés után választott regenerálódási idő jelentősen befolyásolja. Az IL-8 és a TNF- $\alpha$  expressziója (qRT-PCR) 1 mM hidrogén-peroxid hatására emelkedett meg a legnagyobb mértékben a PE, inzerten, a koncentráció további növekedésével az up-reguláció mértéke fokozatosan mérséklődött: az IL-8 expressziója már 4 mM hidrogén-peroxiddal való kezelésnél visszatért az alapszintre, míg a TNF- $\alpha$  esetében ez a kezelés az up-reguláció mértékét csökkentette (**6. ábra**). A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adása nem változtatta meg az IL-6 szintjét a 0.5-4 mM koncentráció tartományban.



**6. ábra** Az IL-8 szintje megemelkedett 0.5-2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatására, a legnagyobb expressziót (~3.5x) az 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés esetében tapasztaltuk. A TNF- $\alpha$  szintje 0.5-4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

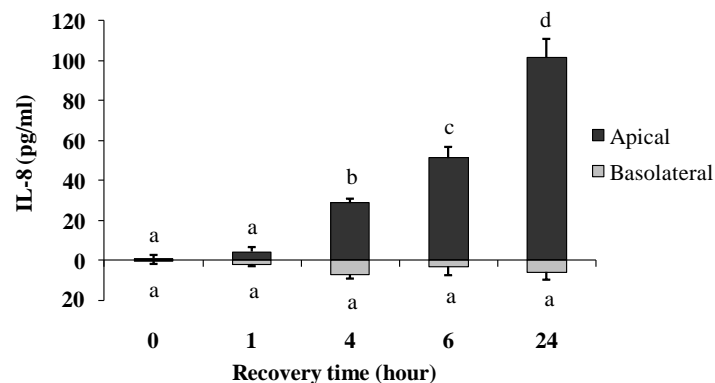
hatására megnövekedett, a leginkább (5-6x-os növekedés) 1-2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés esetében. A különbözően jelölt csoportok közti eltérés szignifikáns (P<0,05) Átlag ± SEM. n=3

A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés mintavételi idő függvényében is befolyásolta az IL-8 és TNF- $\alpha$  citokinek géneexpresszióját (7. **ábra**), míg az IL-6-ét nem változtatta meg.



**7. ábra** Az IL-8 expressziója növekedést mutatott a kezelés után 4 óráig, majd a transzkripció erőteljesen lecsökkent (~3.5x-ös down-reguláció). A TNF- $\alpha$  szintje megemelkedett a kezelés után 1 óráig, majd szintén erőteljesen lecsökkent (~6x-os down-reguláció). A különbözően jelölt csoportok közti eltérés szignifikáns (P<0,05) Átlag ± SEM. n=3

Az IL-8 citokin mennyisége az apikális médiumban idő-függő módon növekedést mutatott, míg a bazolaterális médiumban nem változott meg (8. **ábra**).



**8. ábra** Az IL-8 kimutatása ELISA módszerrel. Az IL-8 mennyisége megnőtt az apikális médiumban 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés hatására. A növekedés a kezelés után 4 órával már mérhető volt (60 pg/ml). A kezelés után 24 órával 135 pg/ml IL-8 szint volt mérhető. A bazolaterális médiumban az IL-8 mennyiségének változását nem tapasztaltuk.

A hidrogén-peroxid kezelés egyik koncentrációban és egyik inzert esetében sem volt hatással az IL-6 expresszió szintjére. A mért citokinek expressziója bár hasonlóan alakult mindkét

inzert esetében, a jobb polarizáltság (differenciáltság) miatt a kollagénnel bevont PE membrán inzert alkalmasabbnak bizonyult az IPEC-J2 sejtek tenyésztésére, mint a PC membrán inzert, továbbá az 1 mM, egy órán keresztül tartó hidrogén-peroxid kezelés tünt a legmegfelelőbbnek, mivel a TER változást nem mutatott.

*A bemutatott I. számú munkából a következő publikációnk jelent meg:*

*Erzsebet Paszti-Gere, Edina Csibrik-Nemeth, Krisztina Szeker, Rita Csizinszky, Csaba Jakab, Peter Galfi: Acute Oxidative Stress Affects IL-8 and TNF- $\alpha$  Expression in IPEC-J2 Porcine Epithelial Cells. INFLAMMATION doi: 10.1007/s10753-011-9403-8. p. 11 (2011)*

## **II. Hogyan befolyásolja az oxidatív stressz és a probiotikumokkal történő kezelés a sertésbélhámsejtek aktivitását?**

Kutatási munkánk eredeti célja egy olyan *in vitro* rendszer létrehozása volt, amely a bélgyulladást előidéző, kísérleti körülmények között hidrogén-peroxid kezeléssel kiváltott, akut oxidatív ingerek modellezésére valamint a védő hatású vegyületek tesztelésére alkalmazható. Vizsgálataink arra irányultak, hogy a probiotikumok sejtmentes felülúszója hogyan befolyásolja a bélhámsejtek oxidatív stresszre adott válaszát, és képes-e megvédeni azokat a károsodásoktól. Célunk volt továbbá, hogy a bakteriális felülúszóból olyan aktív komponenseket azonosítsunk, amelyek szerepet játszhatnak a védőhatásban.

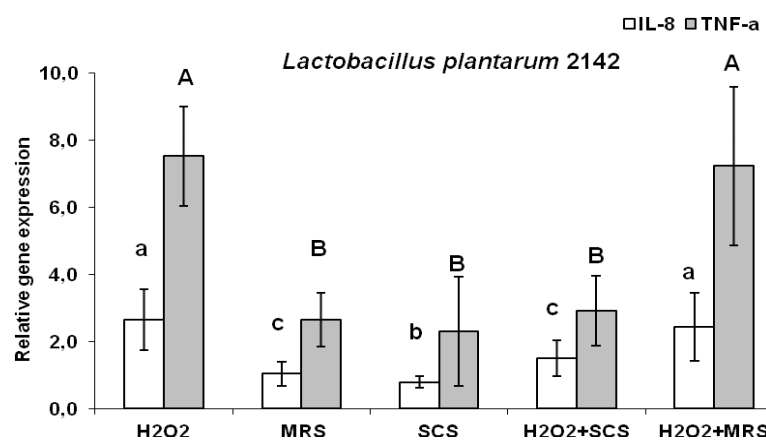
Az akut oxidatív stressz és a probiotikumok hatásának vizsgálatához kollagénnel bevont poliészter membrán (PE) inzerten tenyésztett, újszülött sertés jejunum eredetű IPEC-J2 sejtvonalat alkalmaztunk. A peroxiddal kezelt IPEC-J2 sejtekben a gyulladáshoz kapcsolódó citokinek (IL-8 és TNF- $\alpha$ ) és a védő hatású hő sokk fehérje 70 (Hsp 70) relatív génexpresszióját kvantitatív real-time PCR-rel határoztuk meg a probiotikus baktériumtörzsek (*Lactobacillus plantarum* 2142, *Lactobacillus casei* Shirota, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940, *Enterococcus faecium* CECT 4515) felülúszójának (SMSz=SCS), illetve a rövid szénláncú szerves savak hozzáadását követően. O-dianizidin festékképzési módszerrel alapuló mérésrel vizsgáltuk az általunk használt probiotikum SCS-ek és a hidrogén-peroxid közötti kémiai interakció jelenlétét.

A *L. plantarum* 2142 sejtmentes felülúszójában lévő anyagcsere termékek koncentrációfüggő változásokat okoztak a citokin génexpresszióban. Az 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal kiváltott citokin

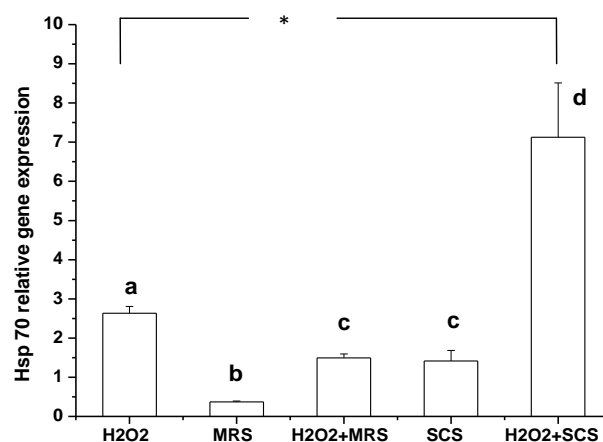


expressziót az alacsonyabb dózisban alkalmazott sejtmentes felülűszó (3,33%v/v és a 6.66%v/v) nem befolyásolta, az indikátor citokinek szintjének emelkedése ugyanolyan mértékűnek adódott a szűrletet is tartalmazó illetve a csak 1 mM hidrogén-peroxiddal kezelt minták esetében. Nagyobb koncentrációban, 13,3%v/v-ban jelenlévő sejtmentes felülűszó azonban szignifikánsan gátolta a hidrogén-peroxiddal kezelt IPEC-J2 sejtekben az IL-8 és a TNF- $\alpha$  expresszió szintjének növekedését. Kísérleti eredményeink alátámasztják, hogy a *L. plantarum* 2142 anyagcseretermékei IPEC-J2 bélhámsejteken oxidatív stressz körülményei között a gyulladási citokin génextpresszió upregulációját hatékonyan csökkentik.

A *Lactobacillus plantarum* 2142 SMSz nemcsak hatékonyan csökkentette az IL-8 és a TNF- $\alpha$  szintjét, hanem növelte a Hsp70 génextpresszióját (9., 10. ábra).



9. ábra A *L. plantarum* 2142 SCS hatása az IL-8 és TNF- $\alpha$  expresszióra. Az IPEC-J2 sejteket 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-val, illetve felülűszóval/ tápoldattal való kombinációban (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+13,3 v/v% SCS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+13,3 v/v% MRS (baktérium tenyésztésre használt tápoldat) kezeltük. A különböző betűkkel jelölt csoportok közti eltérés szignifikáns (P<0,05) Átlag  $\pm$  SEM. n=3



10. ábra A *L. plantarum* 2142 SCS hatása a Hsp70 expresszióra. Az IPEC-J2 sejteket 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-val, illetve felülűszóval/ tápoldattal való kombinációban (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+13,3 v/v% SCS,

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+13,3 v/v% MRS (baktérium tenyésztésre használt tápfolyadék) kezeltük. A különböző betűkkel jelölt csoportok közti eltérés szignifikáns (P<0,05) Átlag ± SEM. n=3

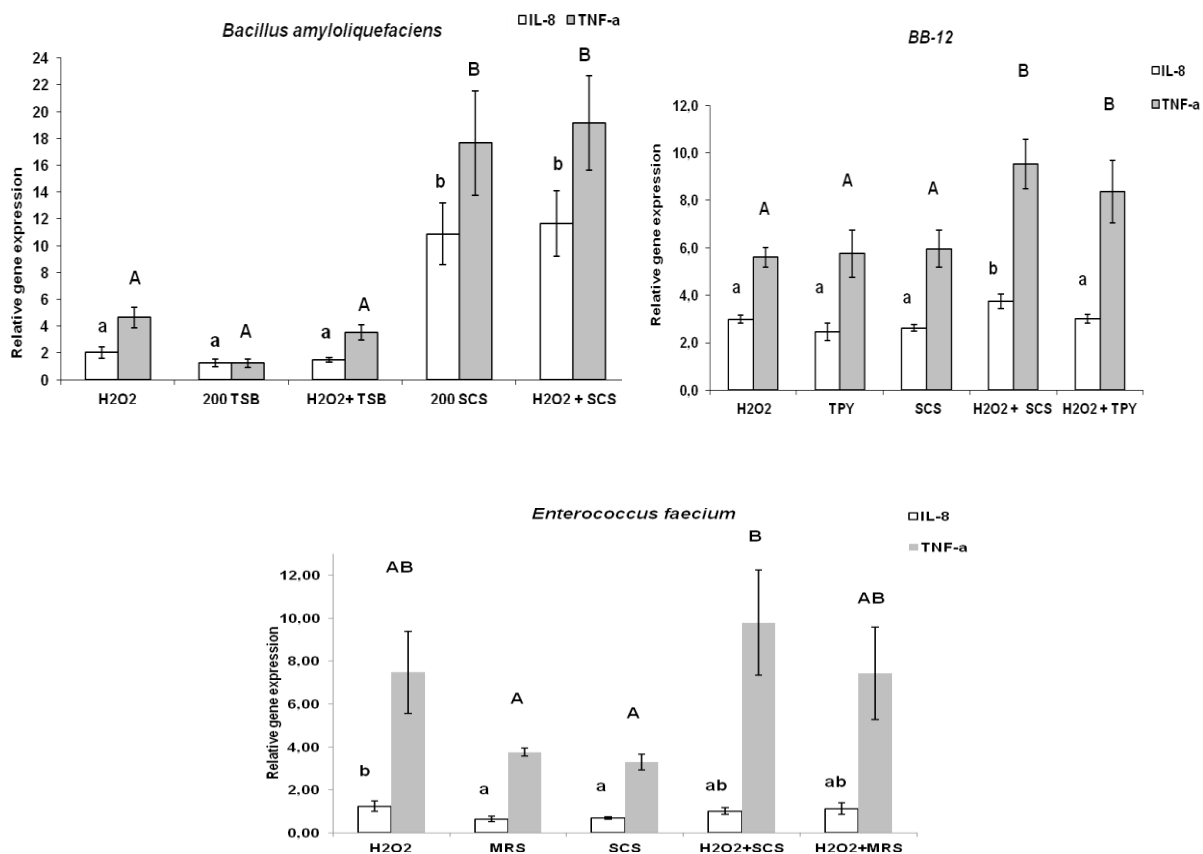
Kimutattuk, hogy a gyulladáscsökkentő hatás alapja nem a felülúszó és a hidrogén-peroxid közötti kölcsönhatás (**2. táblázat**). Nincs kémiai reakció (p> 0.05) a *L. plantarum* 2142, *E. faecium*, *L. casei* Shirota felülúszója és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> között. A *B. amyloliquefaciens* felülúszójában lévő termékek esetében szignifikáns peroxidbontás detektálható. A BB-12 tápoldata cisztein tartalma miatt önmagában is elősegítheti a peroxid bomlását

**2. táblázat** Kémiai interakció vizsgálata a kiválasztott probiotikumok anyagcseretermékei és a hidrogén-peroxid között o-DA alapú spektrofotometriás módszerrel.

A vizsgált oldatok összetétele	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> koncentráció (mM)		% -ban kifejezett csökkenési mérték
	Reakcióidő		
	0 h	1 h	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,04 ± 0,09	0,86 ± 0,05	17,3
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + MRS	0,96 ± 0,10	0,83 ± 0,08	13,5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + SCS ( <i>L. plantarum</i> 2142)	1,02 ± 0,02	0,88 ± 0,04	13,7
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + SCS ( <i>L. casei</i> Shirota)	1,00 ± 0,03	0,86 ± 0,02	14,0
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + SCS ( <i>E. faecium</i> )	0,91 ± 0,07	0,84 ± 0,06	7,7
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + TPY	0,86 ± 0,04	0,54 ± 0,07	37,2
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + SCS ( <i>BB-12</i> )	0,96 ± 0,01	0,54 ± 0,11	43,7
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + TSB	0,72 ± 0,06	0,50 ± 0,05	30,5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + SCS ( <i>B. amyloliquefaciens</i> )	0,48 ± 0,04	0,03 ± 0,001	93,7

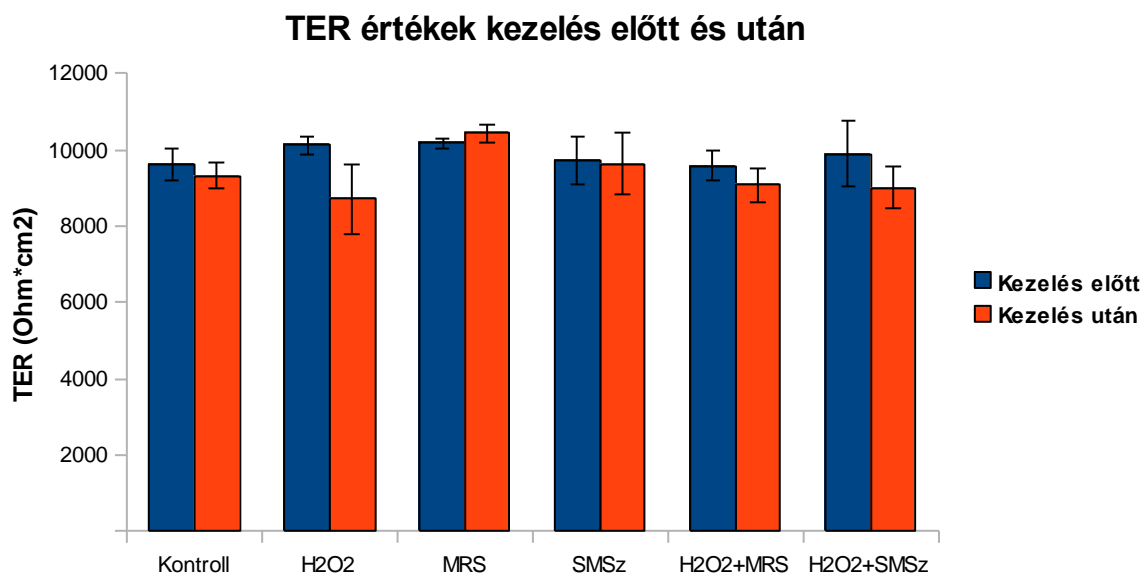
A probiotikumok jótékony hatásának kiszűrésére vizsgáltuk az akut oxidatív stressznek kitett IPEC-J2 sejtek gyulladáscsökkentő citokin génexpressziójának módosulását felülúszók jelenlétében qRT-PCR módszerrel.

Vizsgálatok alapján az *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, *Enterococcus faecium* CECT 4515 védőhatással nem rendelkezik. A *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 felülúszója pedig szignifikánsan fokozta a TNF-α génexpressziót (**11. ábra**).



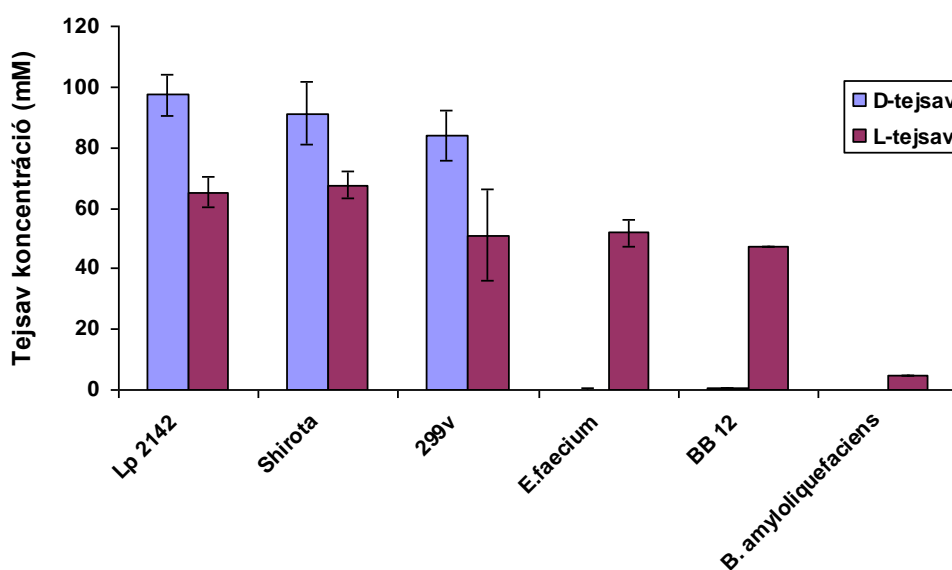
**11. ábra** A peroxid által indukált IL-8 and TNF- $\alpha$  upreguláció további növelése (immunstimuláns hatás) ( $p < 0.05$ ) figyelhető meg, TSB-ben tenyésztett, az IPEC-J2 sejtekhez 13.3 v/v%-ban hozzáadott *Bacillus amyloliquefaciens* felülúszó hatására. Nincs szignifikáns különbség a peroxiddal és tápoldattal illetve a peroxiddal és *BB-12*-vel (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) kezelt sejtek gyulladáscitokin génexpressziójában. A peroxid által előidézett gyulladáscitokin génexpresszió növekedését IPEC-J2 sejtekben az *E. faecium* felülúszója sem mérsékelte ( $p > 0.05$ ). A kísérleteket három párhuzamos mérésel végeztük, az eltérő betűk szignifikáns különbségeket jeleznek, a kisbetűk az IL-8, a nagybetűk a TNF- $\alpha$  értékekre vonatkoznak.

A **12. ábrán** a kísérletek előtti és a kezelések utáni TER értékek láthatók. Mindegyik kiindulási sejtenyészetben mért TER érték meghaladta a kísérletek elkezdésének feltételül szabott 8000 Ohm/cm<sup>2</sup> értéket, és egymástól szignifikánsan nem különböztek. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, illetve az SMSz vagy MRS hozzáadása sem változtatta meg markánsan a TER-t, ami arra utal, hogy egyik kezelés sem károsította súlyosan az enterocytá-monolayer integritását.



**12. ábra** Az IPEC-J2 sejteken mért TER értékek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SMSz (*L. plantarum* 2142 felüliszó), MRS kezelések előtt és után. Az adatok TER érték ± S. E. M-ként kerültek feltüntetésre (n=3).

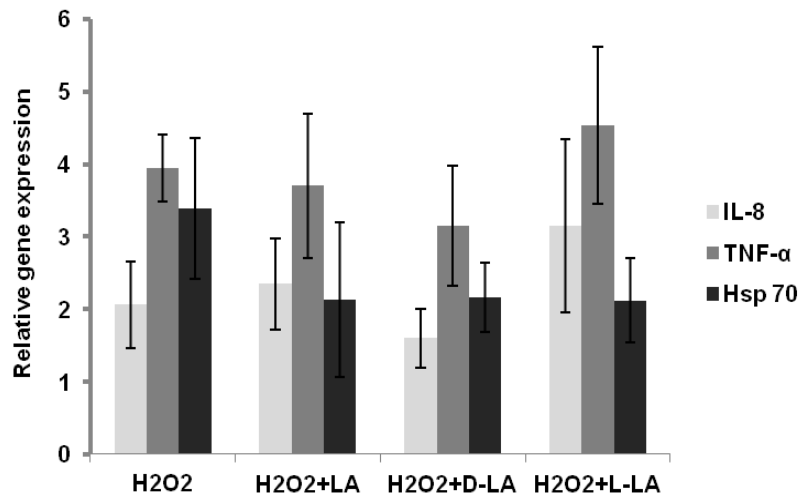
A kiválasztott baktériumtörzsek által termelt szerves savak gyulladáscsökkentésben betöltött szerepének meghatározásához végeztük el a tejsav mennyiségi meghatározását (**13. ábra**).



**13. ábra** A vizsgált baktériumtörzsek tejsav termelésének meghatározása enantiomer kimutatására alkalmas laktát dehidrogenáz enzim alapú méréssel (n=3). A tejsav koncentrációk (D- és L-tejsav) mmol/liter egységben kerültek feltüntetésre.

A racém-, D-, és L-tejsav szerepét a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kiváltotta oxidatív stresszben a gyulladáscsökkentő citokinek és a Hsp70 hő sokkfehérje termelésének mértékére a **14. ábra** mutatja be. Megállapítható, hogy nincs jelentős különbség a tejsav három módosulatának hatása között:

Statisztikailag nem bizonyítható, hogy bármelyik tejsav optikai izomer a felülszóban jelenlévő koncentrációban szignifikáns védőhatást gyakorolna az oxidatív stresszel szemben.

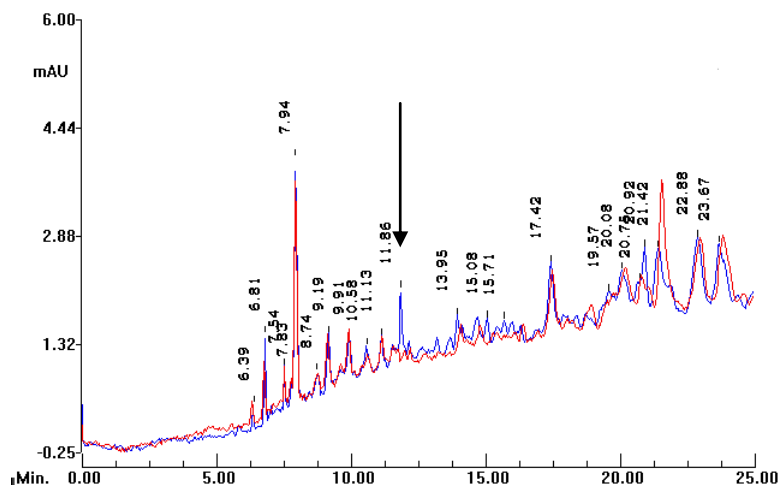


**14. ábra** Az IPEC-J2 sejteken mért IL-8, TNF- $\alpha$ , és Hsp70 relatív génexpresszió változásai H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és tejsav (LA) kezelések hatására.

Eredményeink szerint a *Lactobacillus plantarum* 2142 által termelt tejsav (racém, L-és D-tejsav) nem csökkentette szignifikánsan a gyulladásos citokinek expresszióját. Fehérjeanalitikai módszerek segítségével sikerült kimutatni a *Lactobacillus plantarum* 2142 által termelt eltérő molekulatömegű fehérje jellegű anyagok jelenlétét.

A *L. plantarum* 2142 gyulladáscsökkentő hatásának hátterében jelentőségük lehet a peptid és fehérje termékeknek. A 7-200 kDa molekulásúlyú fehérjék kimutatásához használt 15% SDS-PAGE elválasztás (festési eljárás: Coomassie Brilliant Blue R-250 és ezüst-nitrátos festés) három párhuzamos minta elemzése során két különböző fehérjét mutatott ki a *L. plantarum* 2142 SMSz-ben, amelyeket az MRS nem tartalmaz. A nagyobb mennyiségben jelen lévő, erősebb sávot adó fehérje mérete a 20-29 kDa közti tartományban van (kb. 21,5 kDa), a halványabb sávot adó másik termék molekulatömege 29 és 37 kDa közötti (kb. 31,5 kDa).

Kapilláris zónaelektroforézis segítségével kis molekulatömegű peptidok (<7 kDa) jelenlétét mutattuk ki. A **15. ábrán** látható elektroforetogramon egy olyan SMSz-ben jelenlévő anyag csúcsa látható, amely a kontrollként használt tápleves, az MRS görbéjén nem található meg. Ez a *L. plantarum* 2142 -specifikus peptid 11,86 perces retenciós idővel volt eluálható a kapillárisról.



**15. ábra** A kapilláris zónaelektroforézis (UV detektálás, 200 nm) során kapott elektroforetogram, amely a *Lactobacillus* felülúszó (SMSz, kék görbe) és a tápleves (MRS kontroll, piros) kis molekulatömegű peptidjeit mutatja. Nyíl jelzi a *Lactobacillus plantarum* 2142-specifikus peptidet ( $t_{ret}=11,86$  percnél)

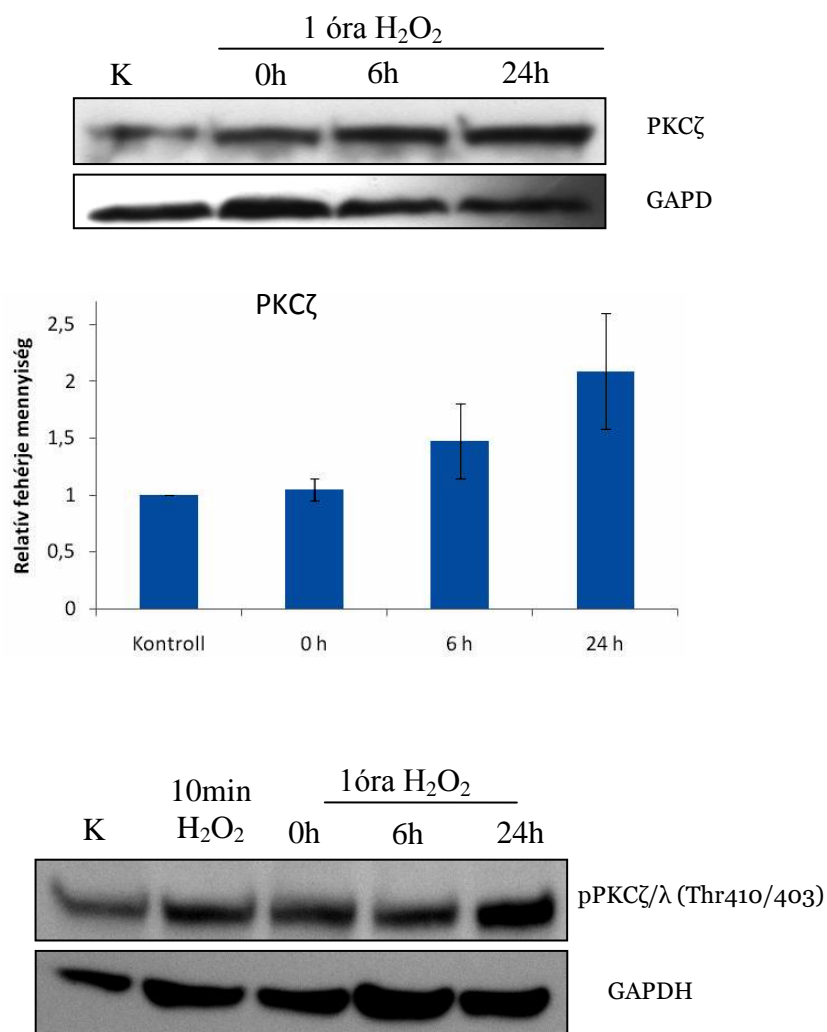
***A bemutatott II. számú munkából a következő publikációt nyújtottuk be:***

*Erzsebet Paszti-Gere, Krisztina Szeker, Edina Csibrik-Nemeth, Rita Csizinszky, Andras Marosi, Orsolya Palocz, Orsolya Farkas, Peter Galfi: Metabolites of Lactobacillus plantarum 2142 prevent oxidative stress-induced overexpression of proinflammatory cytokines in IPEC-J2 cell line INFLAMMATION (pozitív bírálói visszajelzéssel) (2011)*

**III. IPEC-J2 SERTÉS VÉKONYBÉLHÁM SEJTEK PKC IZOENZIM MINTÁZATA (Jelátviteli mechanizmusok aktiválódása oxidatív stressz esetén)**

Számos irodalmi adat támasztja alá a protein kináz (PKC) izoenzimek kulcsszerepét oxidatív stressz háttérben meghúzódó jelátviteli folyamatok esetén. A protein kináz C (PKC) izoenzimjei közé tartoznak a PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ I, PKC $\beta$ II, PKC $\gamma$  (cPKC), az n PKC-k, mint a PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$ , PKC $\theta$ , PKC $\eta$  és az atípusosak, mint a PKC $\lambda$ , PKC $\zeta$  és PKC $\iota$ .

Western-blot módszerrel végzett kísérleteink során azt találtuk, hogy a kollagénnel bevont poliészter inzerteken polarizálódott (differenciálódott) IPEC-J2 sejtek PKC $\zeta$  szintje magas volt, továbbá kimutathatóak voltak a PKC $\alpha$ , PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$  és PKC $\eta$  izoenzimek. Ugyanakkor teljesen hiányzott a PKC $\gamma$ . Ez összhangban van azokkal a tanulmányokkal, amelyek szerint a PKC $\gamma$  elsősorban a bélhám kripta sejteire (nem differenciált) jellemző, míg a villus sejtekből (differenciált) szinte teljesen hiányzik. Az 1 mM hidrogén-peroxid kezelés hatására a PKC $\alpha$  szintje a kezelés után 6 órával megemelkedett, míg a PKC $\epsilon$  szintje emelkedő, majd csökkenő tendenciát mutatott. Legjelentősebb változásokat a PKC $\zeta$  szintjében mutatkozott, ennek tendenciája növekvő volt (**16. ábra**). A PKC $\delta$  és PKC $\eta$  szintje változatlan maradt.



**16. ábra** A kísérletek során a pPKCζ (felső kép) és a pPKCζ/λ (Thr410/403) (alsó kép) foszforilált alakjait is vizsgáltuk. A foszforiláció a molekula aktiválódását, és a további jelátviteli mechanizmusban betöltött szerepét mutatja. A vizsgálatok szerint a p-PKCζ/λ molekulában a 410/403 helyen lévő tirozin foszforiláció a hidrogén-peroxid kezelést követően fokozódik. Feltehetően ezek a mechanizmusok játszanak szerepet a citokinek expressziójának változásában.

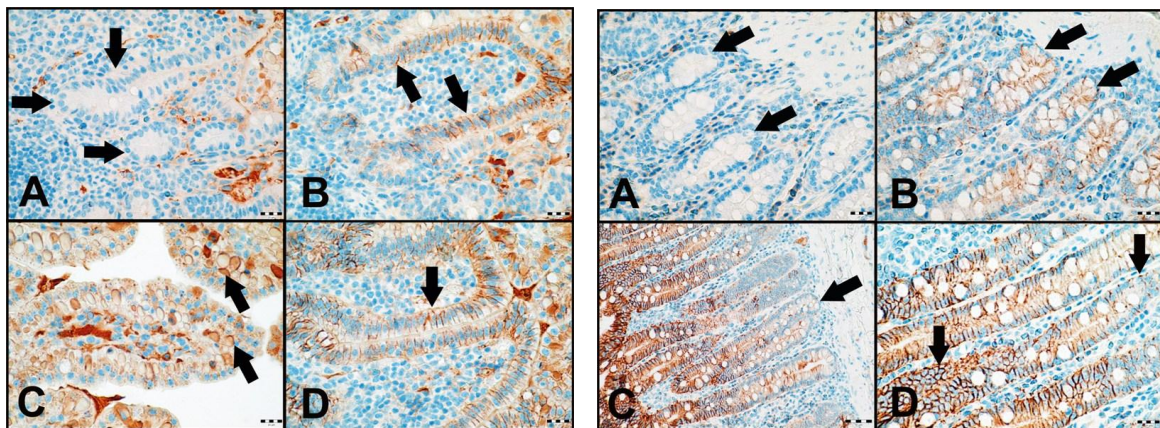
A PKCζ izoenzim több tanulmányban is szerepel, mint az oxidatív károsodásra reagáló PKC enzim, ezért vizsgálata közelebb vihet majd a probiotikumok gyulladásozó folyamatokban betöltött védő hatásának alaposabb megértéséhez.

*A bemutatott III. számú munka alapjául szolgált a következő publikáció:*

*Dorota Garczarczyk, Krisztina Szeker, Peter Galfi, Adam Csordas, Johann Hofmann: Protein kinase Cy in colon cancer cells: Expression, Thr<sup>514</sup> phosphorylation and sensitivity to butyrate-mediated upregulation as related to the degree of differentiation CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTION 185(1): 25-32. (2010)*

#### IV/A Tight junction vizsgálatok: Claudin-1, -4 és -7 immunhisztokémiai kimutatása sertésjejunumból

A claudin-1, -4, és -7 immunhisztokémiai vizsgálatát újszülött és kifejlett sertések jejunumában is elvégeztük (17. ábra).



**17. ábra** Bal oldal: A. Az újszülött malac jejunum claudin-1 negatív (nyilak). (IH, 400x, Szakaszc: 20  $\mu$ m). B. Claudin-4 membrán pozitívitas újszülött malac jejunumban (nyilak) (IH, 400x, Szakaszc: 20  $\mu$ m). C. Fals claudin-4 pozitívitas a villus apikális részén a tubulovezikuláris rendszerben (nyilak) (IH, 400x, Szakaszc: 20  $\mu$ m). D. Intenzív diffúz lineáris membrán claudin-7 pozitívitas a formalinnal fixált paraffinba ágyazott jejunum mintákban (nyilak). Jobb oldal: A. Claudin-1 negatívitas felnőtt sertés jejunumban (nyilak). B. Claudin-4 membrán pozitívitas felnőtt sertés jejunumban (nyilak). C. Gyenge claudin-7 pozitívitas a kripta sejtekben (nyilak) és erőteljesebb claudin-7 pozitívitas a felnőtt sertés jejunumában található villusok proximális bélhámsejtjeiben. D. Diffúz lineáris claudin-7 pozitívitas a felnőtt sertés jejunumban (nyilak) (IH, 400x, Szakaszc: 20  $\mu$ m).

**A bemutatott IV.A számú munkából a következő publikációt nyújtjuk be:**

Csaba Jakab, Erzsebet Paszti-Gere, Gyula Balka, Peter Gálfi: Expression of claudin-1, -4, -7 proteins in small intestine of swine (Immunohistochemical study) (közlésre előkészítve ACTA VETERINARIA HUNGARICA)(2012)

#### IV/B Tight junction vizsgálatok: A gentamicin permeációja IPEC-J2 egyrétegű sejtenyészeten

Kísérleteinket teljesen polarizálódott ( $TER > 8000 \text{ Ohm} \times \text{cm}^2$ ), inzerten tenyésztett IPEC-J2 sejtenyészeten végeztük. A sejteket apikálisan kezeltük önmagában 1 mg/ml gentamicin-szulfáttal, illetve 1 % DMSO-val kiegészített gentamicin-szulfáttal, majd 0 (kontroll), 1 illetve 6 óra múlva mintát vettünk az apikális és bazolaterális tápfolyadékából a gentamicin mennyiségi meghatározásához. A vizsgálat kontrolljaként IPEC-J2 sejtréteget nem tartalmazó



inzertek szolgáltak. A gentamicin-szulfát meghatározását nagyhatékonyságú folyadékkromatográfias módszerrel végeztük, Merck LaChrome Elite HPLC-s készülékkel. A meghatározás származékképzéssel történt, FMOOC reagens segítségével. Kromatográfias módszerünket a hatályos irányelvek alapján validáltuk.

Eredményeink szerint a sejt nélküli inzerteken végzett vizsgálatban 6 óra alatt a gentamicin koncentrációja az apikális és a bazolaterális kompartmentben teljesen megegyezett (**3. táblázat**). Az egyrétegű sejten végzett mérések során azonban a gentamicin sem önmagában, sem 1% DMSO jelenlétében nem jelent meg a bazolaterális kompartmentben, ami igazolja a tight junction kapcsoló struktúra jelenlétét.

**3. táblázat** A gentamicin koncentrációi (%) az IPEC-J2 sejt egyréteget tartalmazó és a sejtmentes membrán inzertek apikális és bazolaterális kompartmentjeiben. A 100% a kezdeti apikális gentamicin koncentrációt jelenti.

Kezelés	Idő (h)	Inzert sejt nélkül		Egyrétegű sejtvonal	
		Apikális kompartment (%)	Bazolaterális kompartment (%)	Apikális kompartment (%)	Bazolaterális kompartment (%)
Gentamicin	0	100,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	1	72,38 ± 1,07	26,47 ± 1,52	100,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	6	52,13 ± 0,53	46,81 ± 0,32	99,94 ± 0,01	0,05 ± 0,01
Gentamicin + 1% DMSO	0	100,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	1	72,67 ± 1,15	27,12 ± 1,29	100,00 ± 0,01	0,00 ± 0,00
	6	54,45 ± 1,23	44,98 ± 1,31	99,93 ± 0,02	0,05 ± 0,01

**A bemutatott IV. B számú munkából a következő publikációt nyújtottuk be:** Akos Jerzsele, Gabor Nagy, Krisztina Szeker, Rita Csizinszky, Csaba Jakab, Peter Galfi: 1% DMSO supplementation does not enhance penetration of gentamicin-sulphate across cell monolayer membranes in vitro (benyújtva JOURNAL OF MEMBRANE SCIENCE) (2011)

## V. IN VIVO VIZSGÁLATOK

A probiotikumok a legígéretesebb antimikrobiális szerek közé tartoznak, amelyeket azért fejlesztettek ki, hogy megóvják az állatok egészségét, és megnöveljék a tápanyag hasznosítás hatékonyságát. A probiotikumokról igazolták, hogy azonos hatásfokkal rendelkeznek, mint a szintetikus antimikrobiális hozamfokozók (többek között antibiotikumok), melyeket korábban profilaktikumként alkalmaztak annak érdekében, hogy visszaszorítsák a káros bélbaktériumok növekedését és aktivitását. Európában, 2006 januárjában azonban teljesen betiltották a szintetikus hozamfokozók használatát. Azonban az antibiotikum hozamfokozók betiltása gazdasági hátrányokhoz vezethet az EU országaiban az együregű gyomrú állatok takarmányozásában, mivel az EU-n kívüli országokban még megengedett a hasmenés és az elhalásos bélgyulladás megelőzésére ilyen anyagok alkalmazása. Következésképpen a takarmányozásban a probiotikummal való takarmánykiegészítés elterjedésének kell a gazdasági hátrányt egyensúlyba hoznia. Az együregű gyomrú állatoknál különösképpen a probiotikumok segíthetnek abban, hogy az antibiotikum hozamfokozók betiltása után jelentősen megnövekedett terápiás célú antibiotikum kezelések visszaszoruljanak. Jelenleg az emésztőcső egészségi állapotának megőrzése a takarmányiparnak is fő kutatási területe, és a probiotikumok takarmány kiegészítőként való kifejlesztése és használata jelenti a legjobb alternatívát a probléma megoldásához

### **A takarmányfelvétel és a takarmányhasznosítás tanulmányozása sertésekben**

A kísérleteket az Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézetben (2053 Herceghalom, Gesztenyés út 1.) végeztük az alábbiakban részletezett metodika szerint. A kísérleti teremben egyedi elhelyezés volt, így egyedi súlygyarapodást és takarmány-felvételt mértünk. A hőmérséklet a kísérlet ideje átlag 20 °C, míg a páratartalom 80% volt. Kísérleti állatok MNF<sub>x</sub>ML állományból származtak, kezelésként 8 süldőt használtunk, fele-fele ivararányban. A kísérlet során használt takarmány összetételét a **4. táblázat** tartalmazza. Mindegyik kezeléshez ezt a takarmányt használtuk, a kontroll és kísérleti kezelések közötti különbség az volt, hogy a kísérleti kezelés során 0,15%-ban (13,6 mM) Na-n-butirát kiegészítést alkalmaztunk. A Na-n-butirát tartalmú táp etetése 28 napig történt. Az állatokat 115 napos korban az Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézethez tartozó vágóhídon, engedélyezett körülmények között vágtuk le.

**4. táblázat** Hízó I. táp összetétele és számított tápanyag-tartalma (%)

Megnevezés	Hízó I. táp	
	Kísérleti	Kontroll
<b>Kísérleti adalékanyag /Na-n-butirát/ Zeolit univerzal</b>	<b>0,15</b>	<b>0,15</b>
Kukorica	57,91	57,91
Extrahált szója 46%	16,97	16,97
Extrahált napraforgó 37%	10,00	10,00
Korpa	11,37	11,17
Takarmány mész	1,30	1,30
MCP	1,10	1,10
NaCl	0,50	0,50
L-lizin-HCl	0,20	0,40
Hízó 0,5%-os premix*	0,50	0,50

\*Premix összetétele: Fe 22400 mg/kg; Mn 16880 mg/kg; Cu 2800 mg/kg; Zn 20000 mg/kg; Se 84 mg/kg; Co 103 mg/kg; I 120 mg/kg; A-vitamin (E672) 2055863 NE/kg; D<sub>3</sub>-vitamin (E671) 400000 NE/kg; E-vitamin ( $\alpha$ -tokoferol) 4263 mg/kg; K<sub>3</sub>-vitamin 102 mg/kg; B<sub>1</sub>-vitamin 72 mg/kg; B<sub>2</sub>-vitamin 269 mg/kg; B<sub>6</sub>-vitamin 168 mg/kg; B<sub>12</sub>-vitamin 1,88 mg/kg; Pantoténsav 794 mg/kg; Folsav 46 mg/kg; Biotin 4,8 mg/kg; Niacin 4409 mg/kg; Kolinklorid 72100 mg/kg; C-vitamin 1140 mg/kg

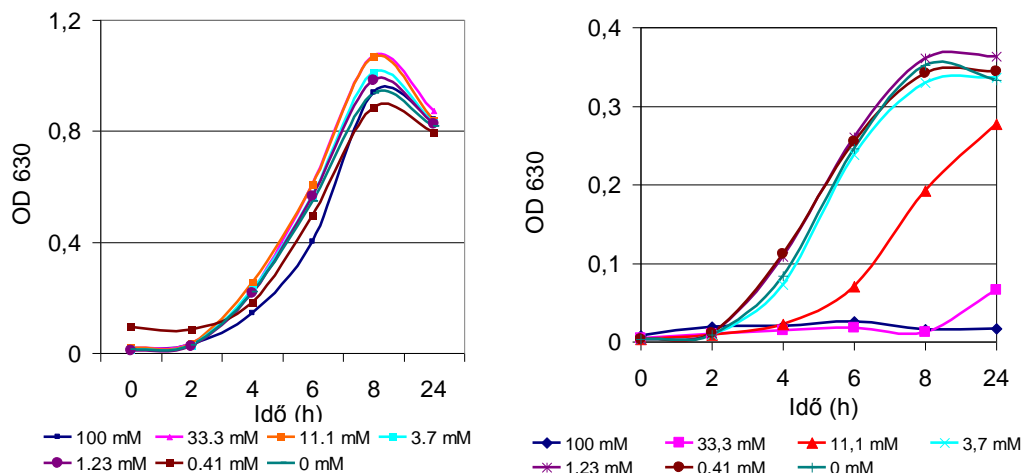
Munkánk során tanulmányoztuk a takarmányfelvétel és takarmányértékesítés mértékét (**5. táblázat**), továbbá az aktív komponens vékonybél irritáció mérséklésében kifejtett lehetséges védő hatásait az élő állatok szervezetében.

**5. táblázat** A butirát hatása a sertések takarmányfelvételére és hasznosítására

Paraméterek	Kontroll	Kísérleti
Kezdő tömeg, kg	36,8 $\pm$ 1,3	37,1 $\pm$ 1,3
Végső tömeg, kg	57,9 $\pm$ 2,7	59,8 $\pm$ 1,7
Napi testtömeg gyarapodás, g		
Hetek 1-2	625 $\pm$ 48	750 $\pm$ 45
Hetek 3-4	884 $\pm$ 62	866 $\pm$ 44
Hetek 1-4	754 $\pm$ 52	808 $\pm$ 34
Napi takarmány felvétel, kg		
Hetek 1-2	1,8 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,1
Hetek 3-4	2,3 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,1
Hetek 1-4	2,0 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,1
Takarmányértékesítés		
Hetek 1-2	2,83 $\pm$ 0,1	2,61 $\pm$ 0,2
Hetek 3-4	2,58 $\pm$ 0,1	2,77 $\pm$ 0,1
Hetek 1-4	2,71 $\pm$ 0,1	2,75 $\pm$ 0,1

Az értékek megadása átlag $\pm$  S. E. M-ben történt (n=16, 115 nap).

A minták és az antibiotikumtól valamint a hozamfokozótól mentes takarmány butirát tartalmát gázkromatográfiával határoztuk meg. A *L. plantarum* 2142 szaporodásának propagációját a Na-n-butirát (10 mM fölötti koncentrációk esetén) indirekt módon segítette elő a bélflóra egyéb baktérium törzseinek, mint az *E. coli* szaporodásának visszaszorításával (**18. ábra**).



**18. ábra** A *L. plantarum* 2142 (bal oldali ábra) és az *E. coli* (jobb oldali ábra) szaporodása, Na- butirát kiegészítés (butirát koncentráció 0-100 mM) hatására pH=6-on. A baktériumok szaporodásának meghatározása optikai denzitásméréssel (OD) történt.

A mikrobiológiai analízisek során a tejsavbaktériumok tenyésztését MRS táptalajon (deMan Rogosa and Sharpe) végeztük 37°C-on 72 óráig. Az alacsony pH és a magas acetát koncentráció miatt a tejsavbaktériumok szelektív szaporodása révén a teljes tejsavbaktériumszám meghatározásra került vizuális kolónia számlálás alapján. A butirát kiegészítés hatására a vékonybélben szignifikánsan megemelkedett a tejsavbaktériumszám és ennek következtében a probiotikum által termelt tejsav mennyisége (**6. táblázat**).

**6. táblázat** A butirát tartalmú takarmány etetés hatása a tejsavbaktérium koncentrációra, a tejsavtartalomra és a pH-értékre sertések ileumában

Paraméterek	Kontroll	Kísérleti
Lactobacillus szám Log <sub>10</sub> CFU/g ileum tartalom	8,43±0,32 <sup>a</sup>	9,29±0,40 <sup>b</sup>
D-Tejsav (mM/kg) <sup>2</sup>	1,90±1,80	2,37±2,03
L-Tejsav (mM/kg) <sup>2</sup>	21,32±3,81 <sup>a</sup>	30,78±7,34 <sup>b</sup>
pH <sup>3</sup>	6,26±0,16	6,21±0,13

Átlag±S. E. M.

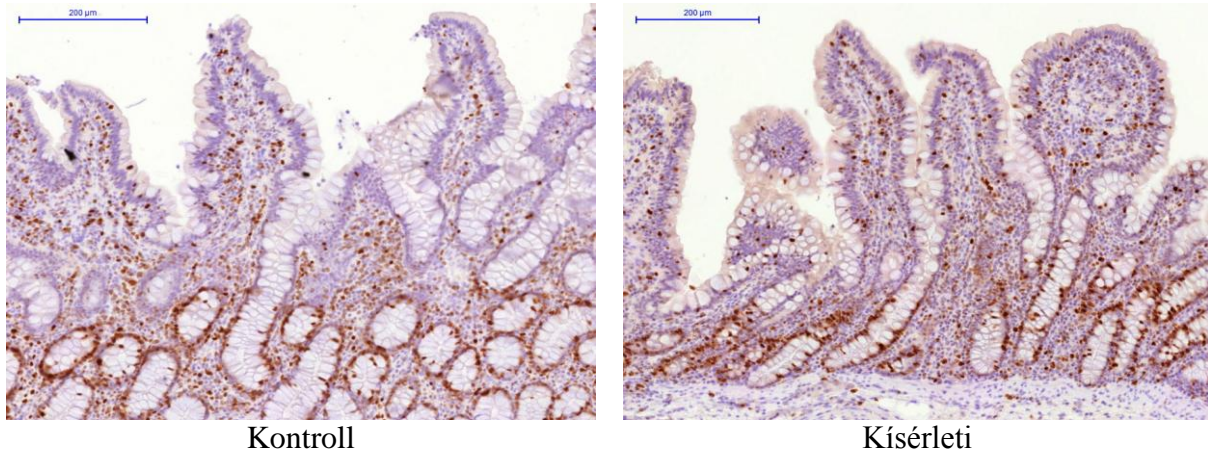
<sup>2</sup>mM/kg nedves tömeg

<sup>3</sup>Az ileum tartalom pH-értéke

<sup>ab</sup>Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jeleznek (p<0.1).

Immunhisztokémiai vizsgálatokhoz a szövetmintákat előkészítettük (dehidráálás, paraffinba ágyazás, metszés). Az osztódó sejtek számának meghatározását Ki67 proliferációs marker

festéssel végeztük. A szaporodó sejtek Ki67-et expresszálnak a kései G1, S, G2 and M fázisokban, a nyugvó G0-ban nem. A Ki67 pozitív sejtek mennyiségét 10 látómező alapján határoztuk meg a kriptasejtek között (**19. ábra**). A butiráttal kezelt sertés bélhámsejtekben a proliferáció mértéke szignifikánsan magasabb volt a kontroll értékekhez képest (**7. táblázat**).



**19. ábra** A takarmányba kevert butirát hatása a vékonybél (ileum) kripta sejteinek Ki67 pozitivitására (Fénymikroszkópos felvétel, vonal 200 µm).

**7. táblázat** Ki67 pozitív sejtek sertések ileumában

Paraméter	Kontroll	Kísérleti
Ki67 pozitív sejt/kripta	15,75±1,17 <sup>a</sup>	19,61±1,37 <sup>b</sup>

Átlag±SEM

<sup>ab</sup>Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jeleznek ( $p < 0.1$ ).

Az ileum nyálkahártyaredőin előforduló bélbolyhok száma szignifikánsan magasabb volt a kontroll értékekhez képest (**8. táblázat**)

**8. táblázat** A butirát tartalmú takarmány etetés hatása az ileum nyálkahártyaredőin előforduló bélbolyhok számára

Paraméter	Kontroll	Kísérleti
Bélboholy/nyálkahártyaredő	19,30±1,73 <sup>a</sup>	26,77±2,45 <sup>b</sup>

Átlag±SEM

<sup>ab</sup>Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jeleznek ( $p < 0.1$ ).

A vizsgálati eredmények kiértékelése, publikációra való előkészítése folyamatban van.