

SZENT ISTVÁN EGYETEM
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

**Oxidatív stressz okozta sejtkárosodás megelőzésének
lehetőségei *in vitro* sejtmodellen**

PhD értekezés tézisei

Pásztiné Dr. Gere Erzsébet

Budapest
2013

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Iskolavezető

Prof. Dr. Rusvai Miklós
egyetemi tanár, MTA doktora
Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar
Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszék

Témavezető

Prof. Dr. Gálfi Péter
tanszékvezető egyetemi tanár, az MTA doktora
Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar
Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

Témabizottsági tagok

Dr. Székér Krisztina PhD
Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar
Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

Csibrikné Dr. Németh Edina PhD
Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar
Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

1. BEVEZETÉS

Az oxidatív stressz sejt és szövetkárosító hatása miatt akut vagy krónikus gyulladás kialakulásához vezethet. A bélhám erős fizikai és kémiai gátat képez a bakteriális fertőzések, a toxinok, az oxidatív stressz ellen és számos kémiai anyag bejutásával szemben. Az epithelium védő funkciójának sérülése bekövetkezhet a bél nyálkahártyájának károsodása és a bélflóra egyensúlyának megváltozása miatt, ami az áteresztőképesség növekedéséhez, az állatok egészségi állapotának romlásához járul hozzá normál étrend esetén is.

A kutatási munka első részében egy olyan *in vitro* rendszer kifejlesztése volt a cél, mely alkalmas a bélhám modellezésén keresztül a peroxid kezelés által előidézett akut oxidatív stressz sejtszintű hatásainak folyamatos követésére. A peroxid mennyiségének és a kezelési idő optimalizálásának előfeltétele volt, hogy a sejtek életképessége változatlan maradjon, ugyanakkor az akut gyulladással járó folyamatok detektálhatóak legyenek a gyulladással járó citokinek relatív génexpressziójának változása alapján. Az újszülött malacok jejunumából származó IPEC-J2 sejtek alkalmas modellrendszernek bizonyultak az *in vitro* kísérletekhez, mivel ezeknél a bélhámsejtekénél a glikolizációs mintázat, a proliferáció mértéke és a kolonizációs képesség jobban követi a bélflóra dinamikus egyensúlyát. A magas transzepitheliális elektromos rezisztenciát mutató, kollagén által fedett poliészter membrán inzerteken növesztett IPEC-J2 egyrétegek szoros gátat képeznek a 3D modell rendszer apikális és a bazolaterális kompartmentjei között az *in vivo* körülményekhez hasonlóan.

Az elmúlt évben a kis dózisu 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-dózisu antibiotikumokat különféle természetes anyagok, probiotikumok váltsák fel. A probiotikumok- melyek az egészséges bélflóra alkotói, és jelen vannak számos fermentált tejtermékben is- olyan élő mikrobiális táp- illetve élelmiszer kiegészítők, amelyek elfogyasztva jótékony hatással vannak a gazdaszervezet egészségi állapotára, közérzetére. A probiotikumok pozitív hatásait már számos esetben igazolták a bélrendszer fertőzéseinek, rendellenességeinek illetve betegségeinek megelőzésében és/vagy kezelésében. A jótékony hatásért egyrészt felelősek lehetnek a probiotikumok által szekretált antimikrobális anyagcseretermékek, mint a rövid szénláncú szerves savak sói (laktát, acetát és butirát), a hidrogén peroxid és a bakteriocinek, másrészt fontos tényező a probiotikumok térnyerése a

káros baktériumok kiszorítása céljából a tapadási helyekért és a tápanyagokért folytatott küzdelemben. A probiotikumok védő hatása mögött meghúzódó jelenségek részleteikben még kevésbé ismertek, további vizsgálatok szükségesek a probiotikumok hatásmódjának teljes feltérképezéséhez. A rövid szénláncú szerves savakat széleskörben alkalmazzák fertőzések és az oxidatív stressz által okozott bélnyálkahártya károsodások kivédésére sertésekben. A bél mikrobióta által előállított szerves savak egyike, a vajsav fontos szerepet tölt be a bendő, a bél anyagcsere folyamataiban.

A doktori értekezés további célkitűzése annak a meghatározása volt, hogy a kiválasztott probiotikumok mint a *Lactobacillus plantarum* 2142, *Lactobacillus casei* Shirota, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12, *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940, *Enterococcus faecium* CECT 4515 sejtmentes felülűszója hogyan befolyásolja a bélhámsejtek oxidatív stresszre adott válaszát, valamint annak felmérése, hogy a felülűszó milyen mértékben képes a sejteket az oxidatív károsodástól megvédeni és mely aktív anyagcsere-termékek játszanak kulcsszerepet ebben a jótékony hatásban. A probiotikumok hatásának tanulmányozása az akut oxidatív stressz által előidézett gyulladós folyamatokban membrán inzerteken tenyésztett IPEC-J2 bélhámsejteken történt. A kiválasztott probiotikumok és anyagcsere-termékek gyulladásgátló hatásának gyors és megbízható szűrésére két gyulladós citokin, az interleukin-8, IL-8 és a tumor nekrozis faktor- α , TNF- α valamint egy védő hatású hősokk fehérje, a Hsp70 relatív génexpresszió mennyiségi változását mértük peroxiddal kezelt IPEC-J2 sejtekben a felülűszó vagy a rövid szénláncú szerves savak hozzáadását követően.

A doktori munka gyakorlati vetülete a sertésenyésztés hatékonyabbá tétele, melynek része volt egy kiterjedt kísérleti adatgyűjtés és elemzés azzal a céllal, hogy a probiotikumok és az általuk termelt anyagcsere-termékek jótékony hatásának részleteiben történő felderítésével az oxidatív stressz által előidézett gyulladós folyamatok előfordulása mérsékelhető, a kialakult bélbetegségek kezelése antibiotikum nélkül is sikeresen elvégezhető legyen.

A potenciális védő hatású anyagok, mint a rövid szénláncú szerves savak, részletesebb jellemzése reaktív oxigén fajtákkal kezelt bélhámsejteket tartalmazó 3 D modellrendszerben és sertéskísérletekben a következőket foglalta magában:

1. Az akut oxidatív stressz sejten belüli hatásainak tanulmányozása 3D bélmodellen *in vitro*

- H₂O₂ kezelési protokoll kidolgozása optimalizált inkubációs idővel és peroxid dózissal, melyekkel a vizsgált gyulladásos citokinek csúcskoncentrációja mérhető detektálható sejthalál nélkül
 - Az IL-8 kvantitatív analízise az apikális és bazolaterális kompartmentben ELISA technika segítségével
2. A peroxid-által kiváltott sejtválasz profil meghatározása
- A sejtréteg integritás analízise a TER-ben, a lipid peroxidációban és a TJ fehérjék megoszlásában bekövetkező változások alapján
 - A protein kináz C (PKC) izoenzimek vizsgálata abból a célból, hogy melyik típus(ok) lehet(nek) felelős(ek) az oxidatív stressz által okozott sejtszintű változásokért szigál transzdukciós szinten a H₂O₂ kezelést követő regenerálódási időben
3. A kiválasztott baktériumtörzsekből nyert sejtmentes felülúszó immunmoduláns hatásának szűrése
- Gyógyszerészeti és terápiás szempontból kiválasztott cél: Probiotikum felülúszó kiválasztása, mely hatékonyan mérsékli a gyulladásos folyamatokat a megemelt IL-8 és TNF- α relatív génexpresszió csökkentésével és a kedvező hatású Hsp 70 szint növelésével
4. A mikrobiális szerves savak tanulmányozása
- A potenciális védő hatás becslése tejsav és ecetsav esetében az akut oxidatív stressznek kitett bélhámsejtek károsodásának megakadályozásában
 - A butirát hatásmódjának meghatározása normál és oxidatív stressz által terhelt bélhámon az enterociták proliferációjának nyomon követésével

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1 Sejtkultúra

- Nem daganatos eredetű bélhámsejtek: IPEC-J2 polikarbonát vagy kollagén által borított poliészter membrán inzerten tenyésztve
- Humán vastagbél adenocarcinoma sejtvonal: Caco-2H és Caco-2P sejtek
- A sejtrétegek TER mérése másnaponta történt a sejttenyésztés 5-21. napja között.
- 0-10 mM H₂O₂ hozzáadása a sejtekhez szérumentes közegben, apikálisan, különböző időtartamokig.

2.2 Citotoxicitási kísérletek

- 1 µg/ml DAPI kezelés PBS-ben 10 percig. A sejtek mosását követően 4 v/v% formaldehid PBS oldatban fixálás.

2.3 Immunhisztokémia

- Immunhisztokémiai vizsgálatokhoz a sertés ileumból nyert és 8 %-os PBS-sel pufferolt formaldehid oldatban rögzített szövetminták előkészítését követően (dehidráció, paraffinba ágyazás, metszés) az osztódó sejtek számának meghatározásához a metszeteken Ki67 immunreaktivitás ellenőrzés történt.
- Immunhisztokémiai meghatározáshoz a 3-4 µm szeletek deparaffinálása xilolban majd alkoholban történt, majd PBS-el való mosás után antigén feltárás következett. A vizsgálatokhoz felhasznált antitestek: anti-claudin-1, anti-claudin-4, és anti-E-cadherin. Az immunhisztokémiai reakciókat avidin-biotin immunperoxidáz rendszerrel (DAKO, LSAB2 Kit) és diamino-benzidin (DAB) kromogénnel váltak láthatóvá. A kontrasztfestés Mayer-féle haemalaunnal történt. A negatív kontroll metszetek az elsődleges antitestek kihagyásával készültek.

2.4 PKC izoenzimek vizsgálata Western blot technikával

- A sejt fehérjéinek gélelektroforézisét (8-16% HEPES-SDS-PAGE) és a blottolását követően a membrán blokkolása 5% (w/v) nem zsíros száraz tejpor és 0.1% (v/v) Tween 20 oldatban történt. PKC α , PKC γ , PKC δ , PKC ϵ , PKC ζ és pPKC ζ -Thr^{410/403} elleni nyúl poliklonális antitestek valamint GAPDH elleni egér monoklonális antitest kerültek felhasználásra a meghatározás során. A torna peroxidázzal konjugált másodlagos antitestek a kecske anti-nyúl, kecske anti-egér, és a szamár anti-kecske IgG-k voltak. A blottok detektálása megnövelt kemilumineszcenciával történt.

2.5 Lipid peroxidáció hidrogen peroxiddal kezelt IPEC-J2 sejtekben

- A lipid peroxidáció mértéke a konjugált diének (CD) 234 nm-en, a konjugált triének (CT) 268 nm-en és a malondialdehid (MDA) TBA 535 nm-en végzett kvantitatív analízisével követhető a sejt felülűszóban.

2.6 Kvantitatív Real Time PCR lépései

- A H₂O₂ kezelést követően jéghideg TRIzol reagens hozzáadása a sejt rétegekhez.
- Az izolált RNS AMP-D1 Dnase I-el történő kezelése
- Az első cDNS szál szintéziséhez RevertAid H Minus First Strand cDNA szintézis kit felhasználása
- A qRT-PCR méréshez iQ SYBR Green Supermix kit alkalmazása. A tesztgén: IL-6, IL-8, TNF- α és Hsp 70. A referenciagének: hypoxantin foszforibozil-transzferáz (HPRT) és ciklofilin-A (CycA).

2.7 IL-8 ELISA

- Az apikális és a bazolaterális közeg összegyűjtését követően az IL-8 meghatározása sertés-specifikus IL-8 ELISA Kit-tel történt.

2.8 Probiotikumok sejtmentes szűrletének előkészítése

- Az *L. plantarum* 2142, a *L. casei* Shirota, az *Enterococcus faecium* CECT 4515 DeMan, Rogosa, Sharpe (MRS) tápoldatban, a *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940

tripton-szója közegben, a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb 12 tenyésztése tripton-phytone-élesztő tápoldatban történt. A baktériumokat tartalmazó szuszpenziókat (végső baktérium koncentráció 10^9 CFU/ ml) 3000 g-vel, 5 °C-on, 10 percig centrifugáltam, majd a felülúszót steril kémcsőbe vittem át, és membránszűrőn átszűrtem (0,22 μ m pórusátmérő). Az ily módon nyert sejtmentes szűrletek kerültek felhasználásra a kísérletekben.

2.9 A peroxid mennyiségi meghatározása a peroxid-felülúszó kölcsönhatását követően

- A H₂O₂ koncentráció meghatározását vizes oldatokban a Nowak-féle kolorimetriás módszerrel végeztem (Nowak D., Biomed. Biochim. Acta 49, 353-362, 1990).

2.10 A tejsavbaktériumok által termelt D- és L-tejsav mennyiségi analízise

- A D-és az L- tejsav (LA) mennyiségi meghatározásához laktát-dehidrogenáz alapú, enantiomer szelektív UV kit került felhasználásra.

2.11 A tejsavbaktériumok által termelt bioaktív peptidek elválasztása

- Kapilláris zóna elektroforézis segítségével származékképzés nélkül a tejsavbaktérium felülúszóban jelen lévő specifikus peptidek UV módszerrel 200 nm hullámhosszon 0.1 M foszfát pufferrel kerültek meghatározásra.
- A gél elektroforézis 15% akrilamid gél felhasználásával készült. A liofilizált minta 300 μ l mintaoldó pufferben (3% Na-dodecil-szulfát (SDS), 62 mM Trisz-(hidroximetil)-amino-metán, 8,7% glicerin, 10% β -merkaptó-etanol, pH: 6,8) lett feloldva. A futtató puffer összetétele 25 mM Tris-HCl, 200 mM glicin és 0.1 w/v% SDS volt. A gél festése Coomassie Brilliant Blue R-250 festékoldattal és ezüst nitráttal történt.

2.12 Sertéskísérletek

- Az *in vivo* kísérletek során magyar nagy fehér és magyar lapály keresztezett hízősertéseket használtunk. Az állatok súlya a kísérlet kezdetekor 30 kg volt. Az állatokat egyedileg helyeztük el, a napi súlygyarapodás illetve a takarmány-felvétel

mérése folyamatosan történt. A hőmérséklet a kísérlet ideje átlag 20 °C, a páratartalom 80% volt. A kísérletbe kezelésenként 8-8 süldőt használtunk, fele-fele ivararányban. A kontroll és kísérleti kezelések közötti különbség az volt, hogy a kísérleti kezelés során 0,15%-ban (13,6 mM) nátrium-n-butirát kiegészítés történt. A nátrium-n-butirát tartalmú táp etetése 28 napig történt. Az állatokat 115 napos korban vágtuk le.

- A sertés ileumban szaporodó tejsavbaktériumok száma MRS táptalajon vizuális telepszámlálás (20-150 telep Petri csészénként) alapján került meghatározásra. Az inkubáció 37 °C-on 72 óráig tartott.

2.13 Statisztikai analízis

- Relatív gén expresszió számításához használt szoftver: Relative Expression Software Tool (REST) 2009 Software.
- Statisztikai kiértékeléshez az R 2.11.1 szoftver csomagot (2010) alkalmaztam. Az átlagok közötti eltérések elemzése egyutas ANOVA-val történt post-hoc Tukey teszttel, ha az adatok normál eloszlásúak, a varianciák homogének voltak vagy az adatelemzést Kruskal-Wallis nemparaméteres teszttel végeztem.
- A TER változások időbeli követésénél a különböző típusú membrán inzertekre kapott eredmények analízisét ANCOVA-val készítettem. A p érték <0.05 szignifikáns különbséget jelzett.

3. EREDMÉNYEK ÉS DISZKUSSZIÓ

3.1 Az akut oxidatív stressz által előidézett változások IPEC-J2 és Caco-2 sejtekben

Az IPEC-J2 és a Caco-2 sejt vonalakat *in vitro* modellként alkalmaztam az oxidatív stressz és a bél epithelium közötti kölcsönhatás tanulmányozására. Az *in vivo* körülményeket jobban közelítő, membrán inzerten tenyésztett sejtek polarizált sejtréteget hoztak létre tight junction komplexek kiépülésével.

A két sejt vonal, a Caco-2 és az IPEC-J2 sejtek oxidatív stresszel szembeni érzékenységét összehasonlítva megállapítottam, hogy a polarizált IPEC-J2 sejtek monoréteg integritása már 1 órással 2 mM H₂O₂ kezeléssel károsodást szenvedett, miközben a Caco-2P sejtek esetében a peroxid csak 10 mM koncentrációk felett tudott szignifikáns TER csökkenést előidézni. A sejtek életképessége az alkalmazott H₂O₂ kezeléstől koncentrációfüggő módon csökkent. 1-4 mM peroxid a membránon tenyésztett Caco-2P sejtek esetében nem okozott sejthalált, 10 mM H₂O₂ hozzáadást követően is csak a sejtmagok mintegy ötöde festődött meg DAPI-val. Az IPEC-J2 sejtek oxidatív stresszel szembeni érzékenységét támasztja alá, hogy alacsonyabb, 2 és 4 mM peroxid koncentráció hatására 10-15% sejthalált detektáltam.

Az IPEC-J2 sejtek tenyésztési körülményeinek optimalizálása céljából meghatároztam a polikarbonát és a kollagén által borított poliészter membrán inzerten kialakult sejtréteg ellenállását. Az IPEC-J2 sejtek differenciáltságának mértékében egészen a sejtenyésztés 8. napjáig nem találtam szignifikáns különbséget a membrántípustól függően. A 9.-19. nap között a kollagén által borított poliészter membrán inzerteken növesztett IPEC-J2 sejtek TER növekedési mértéke (meredekség=802.7±24.2 Ohm*cm²/nap, R=0.9608) szignifikánsan magasabb volt a polikarbonátos membrán inzerten tenyésztett sejtek TER változási üteméhez képest (meredekség =663.0±37.5 Ohm*cm²/nap, R=0.8789). A 21. napon a végső TER (8702.8±45.9 Ohm*cm²) érték szintén szignifikánsan magasabbnak adódott a kollagén által befedett poliészter membránon a polikarbonátos inzerten mért TER értékhez (6134.8±154.3 Ohm*cm²) képest.

Az oxidatív stressz által okozott sejtkárosodások egyik megnyilvánulása a lipid peroxidáció létrejötte és a sejtek antioxidáns kapacitásának kimerülése lehet a ROS dózistól és alkalmazási idejétől függően. Ezzel ellentétben, mérési eredmények szerint szignifikáns különbség a lipid peroxidáció korai fázisában jelenlévő konjugált diének és triének valamint a

kései marker, a malondialdehid szintjében a peroxid koncentráció 4 mM-ig történő emelésével a kontroll értékekhez képest nem detektálható.

Az IPEC-J2 sejtek claudin-1, claudin-4 és E-cadherin membrán-pozitivitást mutattak. A sejten belüli megoszlás és a festődési mintázat a vizsgált fehérjék esetében változatlan maradt 1 órás hidrogén peroxid kezelést követően a 0-4 mM peroxid koncentrációtartományban. Az akut oxidatív stressz által indukált sejtszintű változások mögött meghúzódó jelátviteli folyamatok felderítése céljából PKC izoenzim aktivitás feltérképezés történt. A differenciált IPEC-J2 sejtekben jelen voltak a PKC α , δ , ϵ , ζ , és η izoenzimek. A sejtek 1 órás 1 mM peroxid kezelését követően a PKC ζ szignifikáns emelkedést mutatott 6-24 órával a peroxid beadást követő regenerációs időszakban.

A membrán inzerten tenyésztett IPEC-J2 sejtekben a H₂O₂ kezelést követően (0.5-4 mM) nem változott meg az IL-6 génextpressziós szint. Ezzel szemben IL-8 és a TNF- α szintje jelentős növekedést mutatott 0.5, 1 és 2 mM H₂O₂ kezelés hatására, a legnagyobb expressziós szintet 1 órás 1 mM H₂O₂ hozzáadás váltotta ki. Az IL-8 koncentráció szignifikánsan megnőtt 4 órával a peroxidkezelést követően, a ROS beadást követő napon az apikális közegben 101 pg/ml volt.

3.2 A probiotikumok és anyagszere-termékeik védő hatása oxidatív stresszben

A probiotikum törzsek és anyagszere termékeik gyulladásban betöltött pontos szerepének meghatározásához szükséges volt a probiotikumok által kifejtett részleges agonista vagy antagonist hatás mennyiségi mérése. A 3D sejtrendszer lehetővé tette a potenciális védő anyagok, immunmodulánsok szűrését és hatásmódjuk meghatározását egyrészt a bélhám oxidatív hatásokkal szembeni erősítése illetve az endogén vagy exogén ingerek által felborított mikrobiális homeosztázis helyreállítása alapján.

Kimutattam, hogy a *L. plantarum* 2142 sejtmentes szűrlet hatékonyan csökkentette az 1 órás 1 mM H₂O₂ kezelés által előidézett oxidatív stressz által indukált IL-8 és TNF- α relatív génextpresszió növekedést. A 13.3%-ban alkalmazott szűrlet 1.8 szoros IL-8 és 2.6 szoros TNF- α csökkenést idézett elő. A védő hatású Hsp 70 szint 2.7-szeresére nőtt a peroxidos mintákhoz viszonyítva a tejsavbaktérium szűrletének hatására. A sejtmentes felülúszó gyulladáscsökkentő hatása nem a szűrlet peroxid bontó hatásán alapul.

Bizonyítást nyert, hogy sem az ecetsav, sem a racém, L- és D-tejsav nem fejtett ki jótékony hatást a túlzott mértékű oxidatív stresszrel szemben. A felülúszóban jelen lévő metabolitok között egy 21 és egy 31 kDa *L. plantarum* 2142- specifikus fehérje található.

Kapilláris zóna elektroforézissel a felülúszóban egy további, kis molekulásúlyú peptid detektálható.

Az IPEC-J2 sejtek 2 mM nátrium-butiráttal történő kezelése a TER szignifikáns mértékű növekedéséhez járult hozzá peroxidos mintákban a csak peroxiddal inkubált pozitív kontrollhoz képest a 24 órás regenerálódási periódus végéig. A takarmány butiráttal történő kiegészítése megemelte a tejsavbaktériumok számát és a termelt L-tejsav mennyiségét. A Ki 67-es pozitív kripták száma szignifikáns emelkedést mutatott a butiráttal etetett sertések ileumában. Az ileum nyálkahártyáján található mikrovillusok száma jelentősen megnőtt a 0.15% nátrium-butiráttal kiegészített étrend hatására (27 ± 3 mikrovillus/nyálkahártyaredő a butiráttal kezelt mintákban, 19 ± 2 mikrovillus/nyálkahártyaredő a kontrollokban).

4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Egy olyan IPEC-J2 sejteken alapuló 3D rendszert hoztam létre, mely alkalmasnak bizonyult sertés specifikus, akut oxidatív stressz által előidézett gyulladásos folyamatok különösen a citokin hálózatban bekövetkező transzkripciós és transzlációs változások nyomon követésére.
2. A *L. plantarum* 2142 sejtmentes szűrlet mérsékelte a peroxid által indukált IL-8 és TNF- α mRNS szintjét és szignifikánsan növelte a Hsp70 mRNS expresszióját. Megerősítésre került, hogy a gyulladáscsökkentő hatás alapja nem a peroxid és a *L. plantarum* 2142 sejtmentes szűrlete közötti kölcsönhatás.
3. A gyulladásos citokin hálózat megváltozott mintázatát figyeltem meg a *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 szűrlet alkalmazása során.
4. A D-tejsav, az L-tejsav és a racém elegyük valamint az esetsav sem mérsékelte jelentős mértékben a peroxid által megemelt IL-8 és TNF- α relatív génexpressziót, ami arra utal, hogy az oxidatív stressz gátlásában nem kapnak szerepet a probiotikumok felülűszójában jelenlévő rövid szénláncú szerves savak.
5. A butirát *in vivo* elősegítette a bélhámsejtek szaporodását és a mikrovillusok keletkezését, valamint *in vitro* az *E. coli* 30037 növekedését gátolta és egyben segítette a tejsavbaktériumok térnyerését.

5. KÖZLEMÉNYEK

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

Pászti-Gere E., Csibrik-Németh E., Szekér K., Csizinszky R., Jakab Cs., Gálfi P.: **Acute oxidative stress affects IL-8 and TNF- α expression in IPEC-J2 porcine epithelial cells**, Inflammation, 35 (3). 994-1004, 2012

Pászti-Gere E., Szekér K., Csibrik-Németh E., Csizinszky R., Marosi A., Palócz O., Farkas O., Gálfi P.: **Metabolites of *Lactobacillus plantarum* 2142 prevent oxidative stress-induced overexpression of proinflammatory cytokines in IPEC-J2 cell line**, Inflammation, 35 (4). 1487-1499, 2012

Pásztiné Gere E., Palócz O., Marosi A., Fébel H., Jakab Cs., Gálfi P.: **Az n-butirát hatásának *in vivo* és *in vitro* vizsgálata oxidatív stressz okozta bélgyulladásokban**, Magyar Állatorvosok Lapja, 134. 726-732, 2012

Pászti-Gere E., Szekér K., Csibrik-Németh E., Csizinszky R., Palócz O., Farkas O., Gálfi P.: ***Lactobacillus plantarum* 2142 prevents intestinal oxidative stress in optimized *in vitro* systems**, Acta Physiologica Hungarica, 100 (1). 90-99, 2013

Jerzsele A., Pászti-Gere E., Szekér K., Nagy G., Csizinszky R., Jakab Cs., Gálfi P.: **Gentamicin sulphate permeation through intestinal epithelial cell monolayer**, submitted to Tissue Barriers

TOVÁBBI KÖZLEMÉNYEK

Jerzsele A., Szekér K., Csizinszky R., Pászti-Gere E., Jakab Cs., Mallo JJ., Gálfi P.: **Efficacy of protected sodium butyrate, a protected blend of essential oils, their combination, and *Bacillus amyloliquefaciens* spore suspension against artificially induced necrotic enteritis in broilers**, Poultry Science 91 (4). 837-843, 2012

Pászti-Gere E., Gálfi P.: **Az oxidatív stressz: Bélbetegségek és agyi katasztrófák közös háttértörténete**, Élet és Tudomány Doktorandusz Cikkpályázat III. helyezés 2011

Gere E., Bérczi B., Simándi P., Wittmann G., Dombi A.: **Simultaneous determination of hydrogen peroxide and organic hydroperoxides in water**, International Journal of Environmental Analytical Chemistry 82. 443-450, 2002

Pászti-Gere E., Farkas O., Prodán M., Forgács E.: **Molecular mapping of interactions between cholesterol and model drugs by reversed-phase bioaffinity chromatography**, Chromatographia 57 (9-10). 599-604, 2003

Pászt-Gere E., Prodán M., Forgács E.: **Effect of monovalent cations on the binding of amino acids to cholesterol**, Pharmazie 58 (1). 44-48, 2003

Prodán M., Pászt-Gere E., Farkas O., Forgács E.: **Validation and simultaneous determination of caffeine and paracetamol in pharmaceutical preparations**, Chemia Analityczna 48 (6). 901-907, 2003

Farkas O., Pászt-Gere E., Forgács E.: **Study of the Interaction of Structurally Similar Bioactive Compounds by Thin-Layer Chromatography**, Journal of Chromatographic Sciences 41 (4). 169-172, 2003

Gere-Pászt E., Cserháti T., Forgács E., Deyl Z., Miksik I., Eckhardt A., Illés Z.: **Interaction of Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin with Peptides, Studied by Reversed-Phase Thin-Layer Chromatography**, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 28. 2619-2632, 2005

Gere-Pászt E. and Jakus J.: **The effect of N-acetylcysteine on amphetamine-mediated dopamine release in rat brain striatal slices by ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatography**, Biomedical Chromatography 23 (6). 658-664, 2009

Gere-Pászt E. and Jakus J.: **Protein phosphatases but not reactive oxygen species play functional role in acute amphetamine-mediated dopamine release**, submitted to Cell Biochemistry and Biophysics

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ, NEMZETKÖZI KONFERENCIÁN BEMUTATOTT PREZENTÁCIÓK

Szekér K., Pászt-Gere E., Csibrik-Németh E., Csizinszky R., Gálfi P.: **Attenuation of oxidative stress-induced cytokine gene overexpression by probiotic lactobacilli** International Scientific Conference Probiotics and Prebiotics, Kosice, Slovakia, 2011

Pászt-Gere E., Szekér K., Csibrik-Németh E., Csizinszky R., Jakab Cs., Gálfi P.: **How do IPEC-J2 cells function under acute oxidative stress? In vitro study on potential merit of probiotics in therapy of intestinal inflammation** 9th JMICS Florence, Italy, 2011

Pászt-Gere E., Szekér K., Csibrik-Németh E., Csizinszky R., Palócz O., Farkas O., Gálfi P.: **The effect of oxidative stress and probiotics on polarized IPEC-J2 and Caco-2 cell activity** International Scientific Conference Probiotics and Prebiotics, Kosice, Slovakia, 2012

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ, HAZAI KONFERENCIÁN BEMUTATOTT PREZENTÁCIÓK

Csibrikné Németh E., Pásztiné Gere E., Csizinszky R., Szekér K., Gálfi P.: **IPEC-J2 sertés bélhámsejtek oxidatív stressz okozta gyulladásának gátlása probiotikus baktériumokkal** MTA KK Szabadgyökök és Mikroelemek Miniszimpózium Budapest 2010

Pásztiné Gere E., Szekér K., Csibrikné Németh E., Csizinszky R., Gálfi P.: **Az oxidatív stressz és a probiotikumok hatása a bélhámsejtek működésére** Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság VI. kongresszusa, Gödöllő 2011

Szekér K., Csibrikné Németh E., Csizinszky R., Pászti-Gere E., Jakab Cs., Gálfi P.: **Különböző típusú membrán inzerteken tenyésztett sertés vékonybél hámsejtek növekedési és H₂O₂-kezelést követő génexpressziós jellemzőinek összehasonlítása** Állatorvostudományi Akadémiai Beszámolók Budapest 2011

Pászti-Gere E., Szekér K., Csibrikné Németh E., Csizinszky R., Gálfi P.: **Probiotikumok védőhatásának tanulmányozása oxidatív stressz okozta gyulladásokban IPEC-J2 sejtvonalon** Állatorvostudományi Akadémiai Beszámolók Budapest 2011

Jerzsele Á., Szekér K., Csizinszky R., Nagy G., Pászti-Gere E., Gálfi P., Jakab Cs., Gyetvai B.: **A gentamicin permeációja önmagában és 1% DMSO jelenlétében egyrétegű sejttenyészetben** Állatorvostudományi Akadémiai Beszámolók Budapest 2012

Pászti-Gere E., Szekér K., Csibrikné Németh E., Csizinszky R., Gálfi P., Jakab Cs., Farkas O., Gálfi P.: **Hogyan befolyásolja az oxidatív stressz és a probiotikumokkal történő kezelés a sertés bélhámsejtek aktivitását?** Állatorvostudományi Akadémiai Beszámolók Budapest 2012

Pászti-Gere E., Gálfi P.: **Az oxidatív stressz által előidézett citokin génexpresszió változás IPEC-J2 bélhámsejtekben** TECAN Fiatal Kutatói Pályázat és Szimpózium II. helyezés Budapest 2012

Palócz O., Farkas O., Pászti-Gere E., Gálfi P.: **LPS és reaktív oxigén vegyületek hatása IPEC-J2 sejtek által termelt gyulladásos citokinek valamint Toll-like receptorok génexpressziójára** Állatorvostudományi Akadémiai Beszámolók Budapest 2013

Farkas O., Palócz O., Csikó Gy., Pászti-Gere E., Mátis G., Kulcsár A., Petrilla J., Neogrady Zs. Gálfi P.: **Oxidatív stressz és gyulladás hatásának vizsgálata *in vitro* bélhám- és májsejt ko-kultúra modellen** Állatorvostudományi Akadémiai Beszámolók Budapest 2013

Farkas O., Palócz O., Pászti-Gere E., Nagy G., Jakab Cs., Mallo JJ., Gálfi P.: **A takarmánykiegészítők bélhám integritásra gyakorolt hatásának *in vitro* vizsgálata** Állatorvostudományi Akadémiai Beszámolók Budapest 2013

Pászti-Gere E., Farkas O., Palócz O., Gálfi P.: **Sertés vékonybélben keresztül történő transzportfolyamatok modellezése és szabályozása 3 D IPEC-J2 sejtmoddellen** Akadémiai Beszámolók Budapest 2013

EGYÉB KONFERENCIA ELŐADÁSOK

Inya-Agha O., Steward S., Gere-Pászti E., Morris M.: **Characterization of a liquid-core waveguide for capillary electrophoresis** Frederick Conference on Capillary Electrophoresis, Frederick, Maryland, USA 2001

Gere-Pásztai E., Zhang M., Gnegy ME., Jakus J.: **Neurocellular localization of N-acetylcysteine effect in amphetamine-mediated dopamine release using ion pair forming RP-HPLC** Advances in Chromatography Budapest 2003