UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA ERŽEN

# PROUČEVANJE VPLIVA TOKSIČNIH PEPTIDOV NA ŽIVOST IN AKTIVNOST TKIVNE TRANSGLUTAMINAZE V KULTURI MIŠJIH ENTEROCITOV

# STUDYING INFLUENCE OF TOXIC PEPTIDES ON CELL VIABILITY AND TISSUE TRANSGLUTAMINASE ACTIVITY IN CULTURE OF MOUSE ENTEROCYTES

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2009

Diplomsko nalogo sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Jane Lukač Bajalo, univ. dipl. kem., spec. med. biokem. in somentorstvom izr. prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm., spec. med. biokem.

Za pomoč pri nastajanju diplomske naloge in številne koristne nasvete se iskreno zahvaljujem mentorici prof. dr. Jani Lukač Bajalo, univ. dipl. kem., spec. med. biokem.
Hvala vsem, ki so mi pomagali pri izvedbi eksperimentalnega dela, še posebej tehničnima sodelavkama Majdi in Manji ter mladim raziskovalcem Jani Dragojevič, mag. farm., Mihu Mileku, univ. dipl, biokem. in Matevžu Prijatelju, mag. farm.
Iskrena hvala moji družini in prijateljem, ki so mi med študijem in nastajanjem diplome vedno stali ob strani.

**Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Jane Lukač Bajalo, univ. dipl. kem., spec. med. biokem. in somentorstvom izr. prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm., spec. med. biokem.

Ljubljana, 2009

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stane Srčič, mag. farm.
Članica diplomske komisije: doc. dr. Saša Baumgartner, mag. farm.

# KAZALO VSEBINE

POVZETEK ..... i
SEZNAM OKRAJŠAV ..... ii
KAZALO SLIK ..... iv
1 UVOD ..... 1
1.1 Struktura in funkcija tankega črevesa ..... 1
1.1.1 Epitelij tankega črevesa ..... 3
1.1.2 Enterociti ..... 5
1.2 Tanko črevo in celiakija ..... 7
1.2.1 Klinična slika celiakije ..... 8
1.2.2 Patološke spremembe sluznice tankega črevesa pri celiakiji ..... 9
1.2.3 Etiopatogeneza celiakije ..... 10
1.3 Gluten in toksični peptidi ..... 13
1.4 Tkivna transglutaminaza ..... 14
1.4.1 Vloga tkivne transglutaminaze pri celiakiji ..... 16
1.5 In vitro testni modeli za proučevanje celiakije ..... 18
1.5.1 Celične kulture ..... 19
1.5.2 Spremljanje vplivov gliadina na enterocite v celičnih kulturah ..... 20
2 NAMEN DELA ..... 22
3 MATERIALI IN METODE ..... 23
3.1 Izolacija mišjih enterocitov ..... 23
3.2 Kultiviranje mišjih enterocitov po modificirani metodi Lukač Bajalo in sod. ..... 24
3.3 Merjenje aktivnosti tkivne transglutaminaze v celičnem lizatu ..... 27
3.3.1 Priprava celičnega lizata ..... 27
3.3.2 Merjenje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi ..... 28
3.3.3 Merjenje aktivnosti tkivne transglutaminaze ..... 29
3.4 Spremljanje celične živosti z MultiTox-Fluor Multiplex testom citotoksičnosti 33
3.5 Laboratorijski material ..... 35
4 REZULTATI IN RAZPRAVA ..... 37
4.1 Kultiviranje mišjih enterocitov z gliadinskimi peptidi ..... 37
4.2 Spremljanje specifične aktivnosti tkivne transglutaminaze med kultiviranjem z gliadinskimi peptidi ..... 41

4.2.1 Peptid 1 – koncentracija 100 µg/mL ..... 42
4.2.2 Peptid 1 – koncentracija 200 µg/mL ..... 45
4.2.3 Peptid 2 – koncentracija 100 µg/mL ..... 48
4.2.4 Peptid 2 – koncentracija 200 µg/mL ..... 51
4.3 Spremljanje celične živosti med kultiviranjem z gliadinskimi peptidi..... 55
4.3.1 Kulture brez peptidov ..... 56
4.3.2 Kulture s peptidi (P1 in P2) ..... 56
5 SKLEPI..... 60
6 LITERATURA ..... 62

# POVZETEK

Etiopatogeneza celiakije kljub številnim študijam še ni v celoti pojasnjena. Znano je, da so v razvoj bolezni vpleteni tako dejavniki okolja (zaužiti gluten žitaric) kot tudi genetski dejavniki. Za bolezen je značilen prekomeren imunski odziv, ki povzroči različne morfološke in funkcionalne spremembe na sluznici tankega črevesa. Malo je znanega zlasti o prvih fazah bolezni, kjer pridejo gliadini in ostali peptidi glutena v stik s črevesnimi epitelijskimi celicami. Za proučevanje funkcionalnih, morfoloških in biokemijskih sprememb, ki jih povzročijo različni peptidi glutena, so celične kulture enostaven in uporaben model.

Namen našega raziskovalnega dela je bil ocenjevati učinke dveh različnih gliadinskih peptidov P1 (p31-43) in P2 (p2-11) na kultivirane mišje črevesne epitelijske celice preko spremljanja celične živosti in aktivnosti tkivne transglutaminaze med 48-urnim kultiviranjem.

Celice smo med kultiviranjem opazovali tudi pod mikroskopom. Gliadinska peptida P1 in P2 nimata opaznega vpliva na morfologijo enterocitov. Spremljali smo tudi celično živost z MultiTox-Fluor Multiplex testom citotoksičnosti v kulturah z gliadinskimi peptidi in brez njih. Gliadinska peptida P1 in P2 nimata direktnega negativnega vpliva na živost črevesnih epitelijskih celic. Peptid P1 kaže morebiten toksičen vpliv preko spremljanja aktivnosti transglutaminaze, ki se je v času 48 ur značilno zvišala. Peptid P2 verjetno nima toksičnega vpliva na mišje enterocite preko spremljanja aktivnosti transglutaminaze, vendar tu rezultati niso bili tako jasni.

Izsledki našega dela so pomembni pri nadaljnjem proučevanju mehanizma toksičnosti gliadinskih peptidov in razumevanju etiopatogeneze celiakije.

**Ključne besede:** celiakija, tkivna transglutaminaza, gluten, gliadin, celična živost, kultiviranje mišjih enterocitov

# SEZNAM OKRAJŠAV

| | |
|---|---|
| A | alanin |
| Ab/Am | antibiotik/antimikotik |
| AGA | antigliadinska protitelesa |
| anti-tTG | protitelesa proti tkivni transglutaminazi |
| APC | antigen predstavljajoča celica |
| ARA | antiretikulinska protitelesa |
| BALB/C | določen sev miši |
| bis-AAF-R110 | bis-alanil-alanil-fenilalanil-rodamin 110 |
| Caco-2 | celična linija iz humanega adenokarcinoma kolona |
| CD | celični označevalec (angl.: Cluster of Differentiation) |
| D | asparaginska kislina |
| DHD | dermatitis herpetiformis Duhring |
| DMSO | dimetil sulfoksid |
| DNA | deoksiribonukleinska kislina |
| DTT | ditiotreitol |
| EC | encimski razred (angl.: Enzyme Class) |
| EDTA | etilendiamintetraocetna kislina |
| EMA | antiendomizijska protitelesa |
| F | fenilalanin |
| FBS | fetalni goveji serum (angl.: Fetal Bovine Serum) |
| G | glicin |
| GF-AFC | glicil-fenilalanil-amino-fluorokumarin |
| HEPES | 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetan-sulfonska kislina |
| HLA | humani levkocitni antigen |
| HT-29 | celična linija iz humanega adenokarcinoma kolona |
| IEC | intestinalna epitelijska celična linija (angl.: Intestinal Epithelial Cell line) |
| IEL | intraepitelijski limfociti |
| IFN | interferon |
| IgA/IgG | imunoglobulin A/imunoglobulin G |

| | |
|---|---|
| IL | interlevkin |
| IU | enota katalitične aktivnosti encima (angl.: International Unit) |
| K-562 | celična linija iz humane kronične mieloične levkemije |
| L | levcin |
| Lovo | celična linija iz humanega adenokarcinoma kolona |
| MICA | primer molekule HLA razreda I |
| NK | naravna celica ubijalka (angl.: Natural Killer cell) |
| P | prolin |
| PBS | fosfatni pufer (angl.: Phosphate Buffered Saline) |
| Q | glutamin |
| RNA | ribonukleinska kislina |
| RPMI | tip medija za celične kulture (angl.: Roswell Park Memorial Institute) |
| S | serin |
| SD | standardna deviacija |
| TG | transglutaminaza |
| TMB | 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin |
| TNF | dejavnik tumorske nekroze (angl.: Tumor Necrosis Factor) |
| tTG | tkivna transglutaminaza |
| V | valin |
| vrt/min | vrtljaji na minuto |
| Y | tirozin |

# KAZALO SLIK

**Slika 1:** Struktura črevesne resice ..... 2
**Slika 2:** Diferencirani enterocit ..... 5
**Slika 3:** Shematski prikaz povezanosti enterocitov s tesnimi stiki ..... 6
**Slika 4:** Histološka slika normalne črevesne sluznice in za celiakijo značilne črevesne sluznice ..... 9
**Slika 5:** Shematski prikaz predstavitve glutena limfocitom T in posledica njihove aktivacije ..... 12
**Slika 6:** Reakcije, ki jih katalizira tkivna transglutaminaza ..... 16
**Slika 7:** Princip spremljanja celične živosti in citotoksičnosti z MultiTox-Fluor testom ... 33
**Slika 8:** Kulture intestinalnih epitelijskih celic ..... 38
**Slika 9:** Kulture intestinalnih epitelijskih celic ..... 39
**Slika 10:** Kulture intestinalnih epitelijskih celic po končanem kultiviranju ..... 40

# 1 UVOD

## 1.1 Struktura in funkcija tankega črevesa

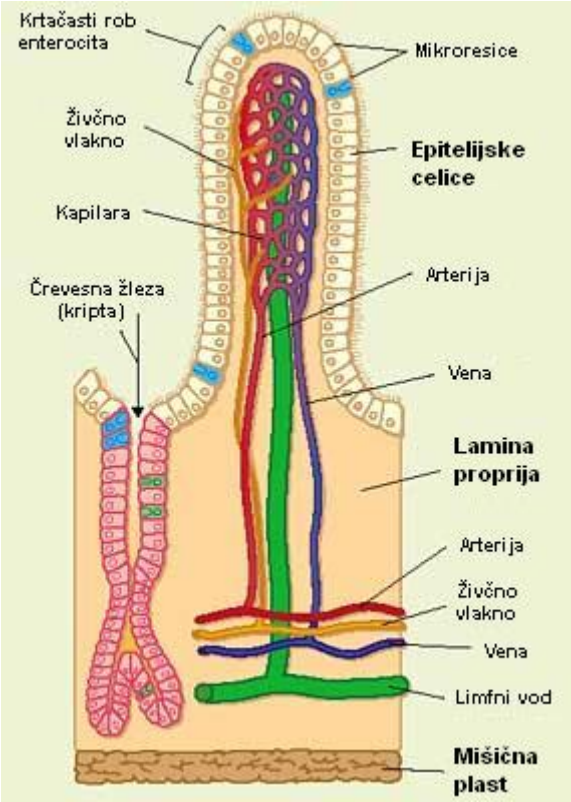
Tanko črevo predstavlja največji del prebavnega sistema, saj obsega kar 2/3 dolžine prebavne cevi. Sega od pilorusa do slepega črevesa in je pri odraslem človeku dolgo 6-7 metrov. Tanko črevo je razdeljeno na tri odseke: prvih trideset centimetrov predstavlja dvanajstnik (duodenum), preostalih 6 metrov pa si delita zgornje tanko črevo (jejunum) in spodnje tanko črevo (ileum). Omogoča potovanje hrane od želodca do kolona in s tem tudi podaljšan stik med hrano in prebavnimi encimi. Tanko črevo ima poglavitno vlogo v prebavi in absorpciji hranilnih snovi, elektrolitov in vode. Proizvaja številne encime in hormone, ki so potrebni za te procese. Poleg tega pa ima tudi druge pomembne funkcije: sekrecija, obramba pred bakterijami in endotoksini (črevesna bariera), obramba pred antigeni (črevesni imunski sistem) in tvorba hormonov ter nevrotransmiterjev (1, 2, 3, 4).

Steno tankega črevesa sestavljajo: sluznica (mukoza s submukozo), mišični sloj (muscularis externa) in seroza.

**Sluznico** tankega črevesa sestavljajo trije sloji: epitelijska plast, rahlo vezivno tkivo (lamina propria) in mišična plast (muscularis mucosae) (slika 1). Epitelijsko plast sluznice tvori enoskladen visokoprizmatski epitelij. Lamino proprio tvorijo rahlo vezivo z limfociti T in B, fibroblasti, tkivni bazofilci, plazmatke, histiociti, gladke mišične celice, žile in živci. Vnetje zviša število imunocitov v tankem črevesu, vrsta zvišanja pa je odvisna od povzročitelja. Tako akutna bakterijska okužba zviša število nevtrofilnih levkocitov, celiakija število limfocitov, paraziti število mastocitov, pri kronični vnetni črevesni bolezni pa so zvišani vsi (slika 1) (1, 2, 4).

**Mišični sloj** je sestavljen iz zunanjega vzdolžnega in notranjega krožnega sloja gladkih mišic. V procesu prebave se te mišice ritmično krčijo – peristaltična aktivnost tankega črevesa (2).

**Seroza** pokriva celotno tanko črevo, izjema je le spodnja tretjina duodenuma, ki ga pokriva adventicija (2).




**Slika 1:** Struktura črevesne resice (4).

Stena tankega črevesa je po strukturi podobna ostalim predelom prebavne cevi, vendar pa je sluznična površina tu precej večja. Površino tankega črevesa povečujejo krožne Kerckringove gube, številni prstasti izrastki, imenovani resice (vili) in tudi številne mikroresice (mikrovili), ki prekrivajo večje resice (1).

Luminalna površina tankega črevesa je nagubana v **Kerckringove gube** (plicae circulares Kerckring's), ki so krožne ali spiralaste oblike. Tvorita jih sluznica in podsluznica. Najbolj razvite so v duodenumu, jejunumu ter proksimalnem delu ileuma, kjer se nato zmanjšujejo in v terminalnem ileumu izginejo. Krožne gube površino tankega črevesa povečajo za 3-krat (1, 2).

**Črevesne resice** (vili intestinales) so podaljški enoskladnega visokoprizmatskega epitelija in lamine proprie. Resice so visoke od 0,5 do 1,5 mm in segajo v lumen tankega črevesa. Najbolj goste so v dvanajstniku in jejunumu, v ileumu pa se skrajšajo in razredčijo. Pokrivajo jih epitelijske celice, v sredini resic pa so prepleti krvnih žilic, drobnih limfnih kapilar, gladke mišične celice in rahlo vezivo s številnimi limfociti. Črevesne resice povečajo površino tankega črevesa za 10-krat (slika 1) (1, 2).

Črevesne resice so prekrite z epitelijskimi celicami, ki jih sestavljajo predvsem absorptivne celice – enterociti. Apikalni del membrane enterocitov prekrivajo številne **mikroresice** (mikrovilusi), ki so prekrite z glikokaliksom in dajejo pod mikroskopom krtačast videz (brush border). Mikrovilusi povečajo površino tankega črevesa za 20-krat (1, 2).
Skupno sluznične gube, resice in mikroresice povečajo absorptivno površino tankega črevesa za 600-krat.

### 1.1.1 Epitelij tankega črevesa

Med in pod črevesnimi resicami se v lamino proprio ugrezajo enostavne ali razvejane cevaste črevesne žleze – glandulae intestinales (**Lieberkühnove kripte**). Epitelij žlez in resic tvorijo enterociti, čašaste celice, matične celice, Panethove celice in enteroendokrine celice ter intraepitelijski limfociti (IEL). Enterociti, enteroendokrine celice in čašaste celice se nahajajo v površinskem delu črevesnih žlez in v resicah, matične in Panethove celice pa se nahajajo v bazalnem delu žlez (1, 2).

Črevesni epitelij se nenehno obnavlja in se v tednu dni popolnoma obnovi in zamenja. Vse epitelijske celice izvirajo iz istih matičnih celic, ki ležijo v globini Lieberkühnovih kript. Dnevno se odlušči in izloči blizu 1,7 milijarde epitelijskih celic, ki se nadomestijo z novimi (1). Matične celice imajo pomembno vlogo tudi pri regeneraciji tkiva po poškodbi. Obnova črevesnega epitelija pa je relativno zapleten proces in je odvisen od številnih faktorjev kot so hormoni, rastni faktorji, citokini in medcelične interakcije (7, 9).
Enterociti, čašaste celice, enteroendokrine celice in Panethove celice v tankem črevesu proliferirajo iz istih matičnih celic, ki se nahajajo v bazalnem delu kript. Večina matičnih celic se deli enkrat dnevno. Matične celice se v času celične delitve razdelijo v dve hčerinski celici. Pri tem ena hčerinska celica ostane nespremenjena v kripti in tvori novo matično celico, druga pa se diferencira preko hitro deleče se progenitorne celice (delitev na vsakih 12 ur) v eno izmed preostalih epitelijskih celic – v enterocit, čašasto celico, enteroendokrino celico in v Panethovo celico. Diferenciacija enterocitov in čašastih celic poteka med migracijo proti vrhu črevesnih resic, od koder se kasneje odluščijo in izločijo v lumen črevesa. Migracija vedno poteka linearno po navpični osi kripta – resica. Celoten postopek traja pri enterocitih od 4 do 5 dni. Enteroendokrine celice potujejo iz kripte proti

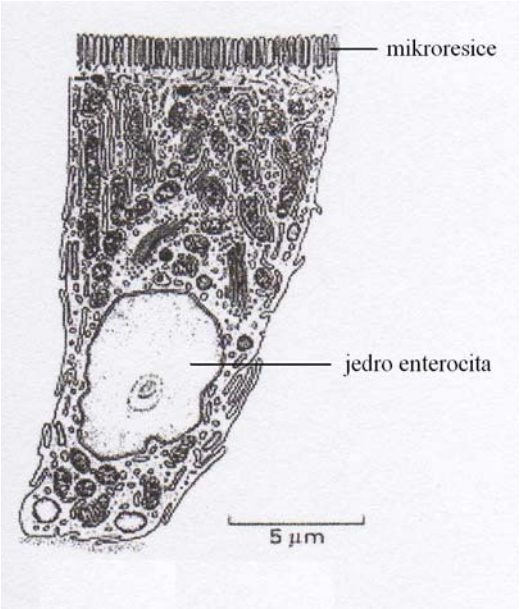
resicam na enak način kot enterociti, vendar se navadno v črevesni sluznici zadržujejo dlje časa. Migracija Panethovih celic pa poteka v obratno smer – proti dnu Lieberkühnovih kript, kjer tudi ostanejo. Celoten življenjski cikel pri Panethovih celicah traja 3-4 tedne, kar je precej več kot pri ostalih epitelijskih celicah (5, 6, 8, 9).

Epitelijske celice črevesnih resic in kript:

- ***Enterociti*** (površinske absorpcijske celice) so visokoprizmatske epitelijske celice z bazalno ležečimi, ovalnimi jedri. Apikalni del enterocitov ima številne mikroresice, ki so prekrite z glikokaliksom in dajejo pod mikroskopom krtačast videz (brush border). Življenjski cikel enterocitov se začne iz nediferencirane matične celice v kriptah, nato pa enterociti dozorevajo preko progenitorne celice med migracijo proti vrhu črevesne resice, kjer odmrejo in se odluščijo v lumen črevesa. Celoten proces pri človeku traja približno 4-5 dni (1, 2, 8).
- ***Čašaste celice*** so enocelične mukozne žleze z značilno čašasto obliko: razširjen apikalni del z mucinogenimi zrnci in ozek spodnji del, v katerem so ostali celični organeli. Njihovo število se povečuje od dvanajstnika proti terminalnemu delu ileuma. Izločajo mukus, ki prekriva sluznično površino – zaščitni mukusni sloj. Celice imajo kratko življenjsko dobo (manj kot teden dni), ko izločijo mukus odmrejo in propadejo (2, 5).
- ***Enteroendokrine celice*** so pomešane med epitelijske celice v kriptah in izločajo številne peptidne hormone in bioaktivne amine (somatostatin, sekretin, holecistokinin, serotonin, motilin…). Med vsemi celicami sluzničnega epitelija tvorijo 1 % celic (1, 2).
- ***Panethove celice*** so eksokrine celice, ki ležijo v najglobljem delu Lieberkühnovih kript. Njihova življenjska doba je približno 20 dni. Sekretorni produkti celic (baktericidni lizocim, α-defensin …) igrajo pomembno vlogo v uravnavi črevesne flore, obrambi matičnih celic v kriptah in v naravni obrambi črevesa pred patogenimi mikrobi (bakterije, paraziti). Panethove celice so stimulirane, ko pridejo v stik z bakterijami ali bakterijskimi antigeni (lipopolisaharidi, peptidoglikan…) in takrat izločajo protimikrobne snovi v lumen kript (1, 2, 5).
- ***Matične celice*** ležijo v bazalnem delu Lieberkühnovih kript. So ozke, klinaste celice z bazalno ležečim, svetlim, ovalnim jedrom. Matične celice so nediferencirane celice, ki se neprestano delijo in hkrati obnavljajo iztrošene epitelijske celice (1, 2).

### 1.1.2 Enterociti

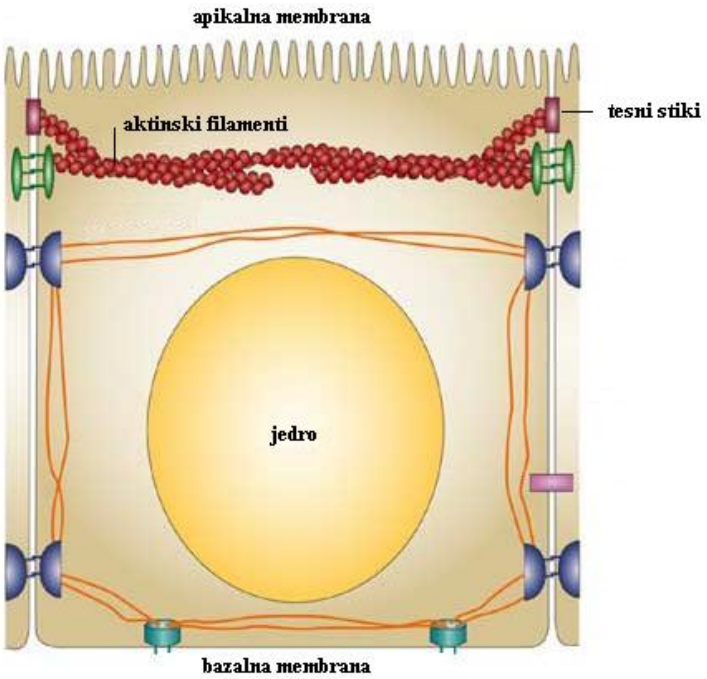
Zreli absorptivni enterociti predstavljajo kar približno 95% vseh celic, ki se nahajajo v črevesni resici. Površinske absorpcijske celice so visokoprizmatske celice z bazalno ležečimi, ovalnimi jedri in številnimi mikroresicami na apikalnem delu. Citoplazma enterocitov je bogata z mitohondriji, zrnatim in gladkim endoplazemskim retikulumom in Golgijevim aparatom (1, 2, 8). Enterociti imajo značilno stebričasto obliko; njihova višina je približno trikrat večja kot širina. Višina enterocita pa normalno znaša nekje med 29 in 34 µm (slika 2) (1, 10).




**Slika 2:** Diferencirani enterocit (67).

Njihova glavna funkcija je končna prebava, absorpcija vode in hranilnih snovi ter povečanje proste površine. Razen tega enterociti v svoji notranjosti pretvorijo (esterificirajo) monogliceride, digliceride in maščobne kisline v trigliceride in nato tvorijo hilomikrone, ter jih tako pripravijo za absorpcijo. Enterociti imajo dva funkcionalno zelo različna predela membrane – apikalno in bazolateralno. V krtačastem robu apikalne membrane so locirani poglavitni sluznični prebavni encimi (disaharidaze, aminopeptidaze, lipaze in alkalna fosfataza) in številne beljakovine, ki sestavljajo membranske črpalke, prenašalce ter ionske in vodne kanalčke in ti omogočajo prenos hranil, ionov, vode in zdravilnih učinkovin.

Bazolateralno membrano ločujejo z apikalno tesni stiki, ki igrajo pomembno vlogo pri paracelularni poti absorpcije in pri vzdrževanju črevesne bariere (slika 3). Tesni stik je tip povezave med membranami sosednjih celic, pri katerem postane medcelični prostor neprehoden za tekočino. Tesni stiki ustvarjajo tudi učinkovito mehansko obrambo pred vstopom makromolekul (bakterije, antigenske molekule…). Beljakovine, ki tvorijo tesni stik, so urejene v pasu okoli celice. Tesne stike sestavlja omrežje transmembranskih beljakovin, povezanih znotraj celice v vrste (večje kot je število vrst, bolj učinkovit je tesni stik). Dva glavna tipa transmembranskih beljakovin, ki tvorijo celične stike, sta okludin in klavdin. Zonulin pa je protein, ki reverzibilno uravnava permeabilnost tesnih stikov. Neprimerno reguliran zonulin ima ključno vlogo pri povečani črevesni permeabilnosti in tudi v patogenezi nekaterih avtoimunskih boleznih (npr. celiakija, diabetes mellitus tip 1…) (1, 11, 12, 33, 40).




**Slika 3:** Shematski prikaz povezanosti enterocitov s tesnimi stiki (68).

Na bazolateralni membrani so tudi številni receptorji za rastne faktorje, hormone, peptide in nevrotransmitorje ter številne ionske črpalke in prenašalci, ki sodelujejo pri prenosu spojin v kri ali limfo. Ionske črpalke vzdržujejo elektrokemični gradient prek plazemske membrane in tako omogočijo absorpcijo številnih hranilnih snovi (1).

## 1.2 Tanko črevo in celiakija

Celiakija ali glutenska enteropatija je imunska kronična vnetna bolezen predvsem proksimalnega dela tankega črevesa (redkeje tudi ileuma), ki jo povzroča preobčutljivost na zaužiti gluten žitaric in se pojavlja pri genetsko predisponiranih ljudeh (13). Za bolezen je značilen prekomeren imunski odziv, ki povzroči različne morfološke in funkcionalne spremembe na sluznici tankega črevesa. Posledično lahko pride do maldigestije in malabsorpcije določenih hranilnih snovi (14, 15). Zdravljenje celiakije predstavlja stroga doživljenjska brezglutenska dieta. Po uvedbi diete pri večini bolnikov hitro pride do izboljšanja kliničnih znakov in histoloških sprememb na sluznici tankega črevesa (14).

Prvi zapisi o celiakiji so se pojavili že zelo zgodaj, vendar je termin celiakija prvič uporabil Samuel Gee leta 1888 in natančno opisal klinično sliko celiakije pri otrocih (16). Šele v štiridesetih letih prejšnjega stoletja je Dicke W. K. odkril povezavo med toksičnim učinkom glutena in kliničnimi znaki bolezni (14, 16). Nekaj let za tem je Paulley po pregledu kirurško odvzetih bioptov tankega črevesa bolezenske znake povezal z značilnimi spremembami sluznice tankega črevesa (17). Velik napredek je predstavljalo tudi odkritje, da je celiakija povezana z določenimi HLA haplotipi razreda II ter vloga tkivne transglutaminaze (tTG) v patogenezi in diagnostiki bolezni (15).

Celiakija je danes opisana kot ena najpogostejših genetsko pogojenih bolezni (13, 15). V zadnjih petnajstih letih pa je postalo jasno, da celiakijo diagnosticiramo premalokrat, saj nastopa v atipični obliki pri otroku ali mladostniku, lahko pa gre tudi za tiho, latentno ali potencialno obliko. Tudi življenjsko obdobje, v katerem bolezen odkrivamo, se je v zadnjih desetletjih spremenilo. Vse pogosteje bolezen odkrivamo pri odraslih in celo pri starostnikih (14, 18, 19). Pogostost bolezni v Evropi in v ZDA je danes ocenjena nekje 1/130-300 prebivalcev, med družinskimi člani pa ima celiakijo kar okrog 10 % sorodnikov prvega kolena (13).

### 1.2.1 Klinična slika celiakije

Klinična slika pri celiakiji je zelo raznolika in je odraz starosti bolnika, trajanja bolezni in obsega sprememb na sluznici črevesa (13). Novo odkritih primerov celiakije s klasično klinično sliko pred 2. letom starosti je vse manj. Gastrointestinalni simptomi so sicer še pogosti, vendar so v začetku blagi. Vzroki za blažje pojavljanje klinične slike celiakije še niso dokončno pojasnjeni, možni dejavniki pa so:

- podaljšano obdobje dojenja,
- kasnejše uvajanje glutena v prehrano otrok in
- spremembe v količini in kakovosti glutena, ki ga zaužije otrok (19).

Različne klinične znake celiakije pri odraslih bolnikih nam prikazuje preglednica I. Poleg značilnih gastrointestinalnih simptomov se lahko pojavljajo tudi številni ekstraintestinalni znaki (13, 14, 19, 20, 21, 22, 23).

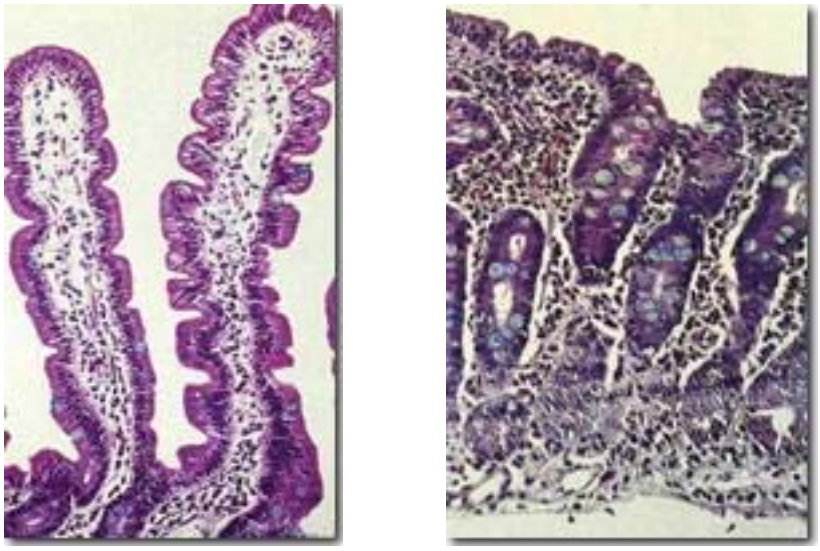
**Preglednica I:** Klinični znaki celiakije pri odraslih bolnikih.

| **Vrsta manifestacije** | **Simptomi** |
|---|---|
| Gastrointestinalne | diareja, napihnjen trebuh, slabost/bruhanje, izguba telesne teže, anoreksija, bolečina v trebuhu, steatoreja, zaprtje |
| Hematološke | anemija (posledica malabsorpcije železa, folatov in vitamina $B_{12}$), pomanjkanje vitamina K, levkopenija, trombocitopenija |
| Kostne | osteoporoza ali osteopenija (posledica malabsorpcije kalcija in vitamina D), rahitis, hipoplazija zobne sklenine, artritis |
| Mišične | mišična atrofija, mišični krči |
| Nevrološke | periferna nevropatija, epilepsija, ataksija, demenca, depresija, anksioznost |
| Endokrinološke | nizka rast, zapoznela puberteta, neplodnost, ponavljajoči splavi, neredne menstruacije |
| Kožne | dermatitis herpetiformis Duhring, alopecija, vaskulitis, ponavljajoč aftozni stomatitis |
| Druge | utrujenost, povišani jetrni encimi, edemi, hiposplenizem, nočna slepota, sekundarna laktozna intoleranca |

### 1.2.2 Patološke spremembe sluznice tankega črevesa pri celiakiji

Pri bolnikih s celiakijo so prisotne značilne histološke spremembe sluznice tankega črevesa, ki so običajno najbolj izražene v dvanajstniku in proksimalnem jejunumu ter se v distalnem delu zmanjšujejo. Spremembe so najbolj izrazite na vrhovih sluzničnih gub. Pri nekaterih bolnikih pa je lahko prizadeta tudi sluznica želodca in debelega črevesa (25, 26). Najznačilnejše histološke spremembe, ki jih pri celiakiji opažamo so: popolna ali delna atrofija črevesnih resic, hiperplazija Lieberkühnovih kript in povečanje števila IEL (nad 40 na 100 epitelijskih celic) (14, 24, 25).

V lamini proprii je povečano število limfocitov, plazmatk, eozinofilcev, nevtrofilcev, mastocitov in makrofagov. Zaradi propadanja epitelijskih celic in regeneracije se poveča število celičnih delitev v kriptah (povečana proliferacija). Pogosto so pomnožene tudi enteroendokrine in Panethove celice, zmanjša pa se število čašastih celic (14, 26, 27). Epitelij lahko zamenja večskladni izoprizmatski epitelij, saj enterociti lahko izgubijo značilno stebričasto obliko. Enterociti imajo tudi krajše mikroresice (izguba krtačastega obrobka), njihova citoplazma je bolj bazofilna in jedro bolj centralno ležeče (25, 27).
Morfološka slika sluznice tankega črevesa je pri celiakiji značilna, ni pa specifična, ker lahko najdemo podobno histološko sliko pri infekcijah, alergijah in drugih spremenjenih imunoloških stanjih (slika 4) (26).



**Slika 4:** Histološka slika normalne črevesne sluznice (levo) in za celiakijo značilne sluznice (desno) (69).

### 1.2.3 Etiopatogeneza celiakije

Čeprav etiopatogeneza bolezni še vedno ni popolnoma razjasnjena, pa vemo, da so za razlago nastanka celiakije pomembni trije dejavniki: dejavniki okolja, imunološki in genetski dejavniki (28).

- ***Genetski dejavniki:***

Skupna značilnost vseh bolnikov s celiakijo je genetska predispozicija za razvoj bolezni. Da je bolezen genetsko pogojena, so pokazale predvsem družinske raziskave in raziskave dvojčkov. Te študije so izredno pomembne za proučevanje razlik med genetskimi dejavniki in dejavniki okolja pri razvoju bolezni. Prevalenca bolezni med sorodniki prvega kolena se ocenjuje med 5 in 10 %, celiakija pa se pojavi pri obeh monozigotnih dvojčkih v približno 70 – 75 % (14, 24, 28, 30).

Natančnejše genetske analize so pokazale, da je v predispozicijo za razvoj celiakije verjetno vključenih več genov na različnih kromosomih. Najbolj raziskana je povezava celiakije z nekaterimi HLA (humani levkocitni antigen) aleli, kodiranimi na kratki ročici šestega kromosoma (6p21.3). Najpogostejši genetski dejavnik za celiakijo v Evropi je HLA-DQ2 heterodimer. Zapis za to molekulo nosi približno 90 – 95 % bolnikov s celiakijo. Ostali bolniki (5 – 10 %) pa naj bi nosili zapis molekule heterodimera HLA-DQ8. Bolnike s celiakijo, ki ne nosijo zapisa za HLA-DQ2 ali HLA-DQ8, srečamo le izjemoma (24, 28, 29, 30, 31). Primarna vloga molekul HLA-DQ je predstavitev peptidov iz okolja (pri celiakiji peptidi glutena) limfocitom T, ki so pomembni za pravilno delovanje imunskega sistema (14).
Ocenjujejo, da so ti geni HLA razreda II odgovorni za približno 40 % genetskega prispevka k razvoju bolezni (29, 31). Celotne genetske predispozicije za razvoj bolezni pa ne uspemo pojasniti samo s HLA-DQ2 oziroma HLA-DQ8, ampak genetske raziskave kažejo, da je v razvoj celiakije vključenih več genov tudi na ne-HLA lokusih. Nekatere študije kažejo na možno vpletenost določenih genov na kromosomih 2, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 18 in 19 (18, 31). Nenehen napredek pri genetskih preiskavah daje upanje, da bodo raziskave genetike celiakije dale zanesljive dokaze o pomenu specifičnih lokusov v genskem zapisu za razvoj celiakije (24).

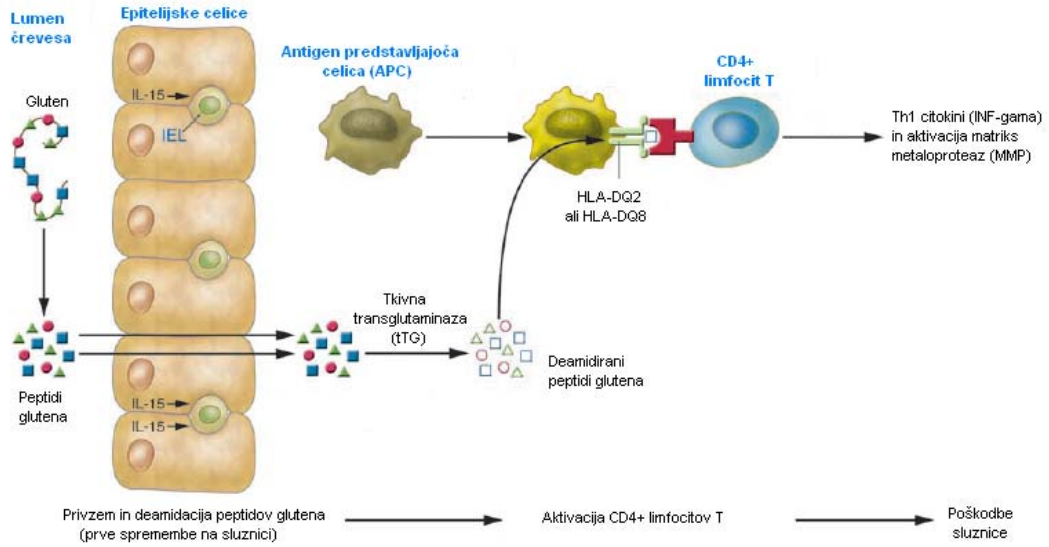
- ***Imunološki dejavniki:***

V nastanek celiakije so vpleteni celični in humoralni imunski mehanizmi (13). Za nastanek prekomernega imunskega odziva naj bi bil najbolj odgovoren α-gliadin, ki je med peptidi glutena najbolj toksičen, čeprav so škodljive tudi ostale frakcije (34). Imunski odziv na gliadin povzroči značilno spremembo sestave imunskih celic v lamini proprii in morfološke spremembe v epitelijskih celicah sluznice tankega črevesa (13). Čeprav način prehoda peptidov glutena med epitelnimi celicami in prek epitelnih celic še ni povsem pojasnjen, pa je potek okrepljenega imunskega odziva v lamini proprii raziskan (13, 29).

Znano je, da ima pomembno vlogo pri transportu peptidov glutena povečana paracelularna črevesna permeabilnost. V akutni fazi bolezni so odkrili povečano izločanje proteina zonulina, ki sicer reverzibilno odpira tesne stike med enterociti. Ko se zonulin veže na svoj receptor na površini celice, inducira protein kinazo C. Pri tem pride do reorganizacije aktinskih filamentov znotraj celice, ki so direktno povezani s transmembranskimi proteini tesnih stikov. Na tak način peptidi prehajajo v lamino proprio preko okvarjenih tesnih stikov. Nekateri peptidi glutena naj bi torej direktno vplivali na ekspresijo zonulina. Nekateri pa predvidevajo, da lahko peptidi prestopajo bazolateralno membrano enterocitov tudi v obliki veziklov z endocitozo (17, 29, 33, 38, 39, 40).

Gluten se v črevesu ne prebavi popolnoma, saj so peptidi zaradi visoke vsebnosti prolina odporni na nekatere želodčne ter pankreatične encime in tudi encime resaste površine enterocitov. Po prehodu v lamino proprio črevesa se gliadin s pomočjo encima tkivne transglutaminaze 2 (tTG) deamidira. Peptidi, ki imajo visoko vsebnost glutamina, se z večjo afiniteto vežejo na tkivno transglutaminazo in ta deamidira glutamin do negativno nabite glutaminske kisline. Tako nastanejo epitopi z negativno nabitimi skupinami, ki se zelo intenzivno vežejo na humane levkocitne antigenske receptorje (HLA-DQ2 in HLA-DQ8) antigen predstavitvenih celic (APC), ki pa imajo pozitivna vezavna mesta. Celice APC (makrofagi, limfociti B, dendritske celice) predstavijo antigene (deamidiran gliadin) limfocitom T (CD4+), ki se namnožijo v lamini proprii. Limfociti T se pri tem aktivirajo in posledica je celični imunski odgovor s tvorbo vnetnih citokinov, zlasti IFN-γ, TNF-α in interlevkinov (slika 5) (13, 14, 15, 29, 32).

Značilen je tudi humoralni imunski odgovor, saj nekateri od citokinov povzročijo tudi aktivacijo in klonski razrast limfocitov B ter njihovo zorenje do plazmatk. Plazmatke proizvajajo specifična protitelesa tipa IgA in IgG, ki so usmerjena proti retikulinu (ARA), proti endomiziju (EMA), proti gliadinu (AGA) in proti tkivni transglutaminazi (anti-tTG) (13, 14, 15, 29, 32).




**Slika 5:** Shematski prikaz predstavitve glutena limfocitom T in posledica njihove aktivacije (31).

Tudi v epiteliju črevesne sluznice poteka imunski odziv, ki pa še ni povsem pojasnjen. Številne vnetne reakcije pripeljejo do značilne izgube funkcionalnega nagubanega sluzničnega epitelija. Med intraepitelijskimi limfociti se namnožijo citotoksični limfociti T (CD8+) (13, 22, 31). Več študij je pokazalo, da gluten lahko izzove stres tudi v epitelijskih celicah. Glavno vlogo pri vnetnem imunskem odzivu naj bi imel citokin interlevkin 15 (IL-15), ki naj bi privedel do povečanja števila IEL in tudi do citotoksičnega učinka na epitelijske celice (14, 15, 31). Ni pa pojasnjeno, kako gluten povzroči ekspresijo IL-15 in ostalih vnetnih molekul, prav tako je trenutno še neznana povezava med limfociti T CD4+ v lamini proprii in IEL CD8+ v epiteliju (29, 32). Nekatere študije so pokazale, da naj bi nekateri peptidi α-gliadina (npr. p31-43 ali p31-49), ki se ne vežejo na HLA-DQ2 ali HLA-DQ8, inducirali ekspresijo IL-15 in ekspresijo MICA molekul v enterocitih, ki so ligandi za NKG2D receptor na IEL. Prav ta interakcija med NKG2D in ligandi MICA naj bi imela citotoksičen učinek na enterocite (14, 31, 32).

## 1.3 Gluten in toksični peptidi

Med najpomembnejše dejavnike okolja za pojav celiakije štejemo predvsem gluten, ki ga v organizem vnašamo s hrano – predvsem z žitaricami (28). Nekateri kot možen vzrok za pojavljanje celiakije omenjajo tudi kasnejše uvajanje velikih količin glutena v prehrano otrok. Zato številne študije predlagajo postopno uvajanje vedno večjih količin glutena v prehrano otrok v obdobju med 4. in 6. mesecem starosti (14, 29).

V živilski industriji delimo beljakovine žit glede na topnost na (34):

- neglutenske beljakovine:
  - albumini (topni v vodi),
  - globulini (topni v raztopini soli),
- glutenine (topni le v razredčenih kislinah in bazah) in
- prolamine (netopni v vodi, topni v alkoholu):
  - gliadini (pšenica),
  - sekalini (rž),
  - hordeini (ječmen) in
  - avenini (oves).

Gluten je v vodi netopna proteinska frakcija pšenice, rži, ječmena in ovsa ali njihovih križancev oziroma variacij, na katere so nekateri ljudje občutljivi. Prolamini koruze, riža in ajde za bolnike s celiakijo niso škodljivi. Gluten sestavljajo v glavnem dve večji skupini beljakovin: gliadini in glutenini. Gliadini so heterogena zmes proteinov, ki vsebuje vsaj 50 različnih komponent in jih ločimo na osnovi elektroforezne mobilnosti na α, β, γ in ω gliadine. Vse komponente vsebujejo visoko vsebnost glutamina (okoli 35 %) in prolina (okoli 15 %) ter nizko vsebnost lizina (pod 2 %). Glutenini so visoko molekularni polimeri, sestavljeni iz manjših podenot (28, 34, 35, 36, 40).

Znano je, da nenormalen imunski odgovor lahko izzovejo α-gliadini, γ-gliadini in tudi glutenini, so pa sorodni peptidi prisotni tudi v ječmenu, rži in v manjši meri tudi v ovsu. Za večino teh peptidov velja, da postanejo imunostimulatorni šele po deamidaciji z encimom tkivna transglutaminaza. Do sedaj pa so največ pozornosti namenili raziskovanju toksičnosti gliadinov (35, 37). Znano je že celotno aminokislinsko zaporedje več gliadinov, v zadnjih letih pa raziskujejo predvsem kateri fragmenti oziroma aminokislinske sekvence gliadinov so toksične pri bolnikih s celiakijo. Nekateri fragmenti peptidov glutena so lahko

toksični (povzročijo poškodbe sluznice *in vitro* ter *in vivo*), nekateri pa so imunogeni in so sposobni stimulirati od HLA-DQ odvisen imunski odgovor, vendar pa ni nujno, da bodo povzročili poškodbe na črevesni sluznici (38).

Za toksičnost fragmentov A-gliadina naj bi bili odgovorni predvsem dve aminokislinski zaporedji: glutamin-glutamin-glutamin-prolin (QQQP) in prolin-serin-glutamin-glutamin (PSQQ). Za fragmenta A-gliadina 31-43 in 44-55 je dobro znano, da *in vitro* ter *in vivo* povzročata poškodbe črevesne sluznice pri bolnikih s celiakijo. Oba peptida vsebujeta aminokislinski sekvenci QQQP in PSQQ. Peptid 31-43 je sposoben izzvati prirojen imunski odziv v epiteliju sluznice tako, da stimulira ekspresijo IL-15. Se pa ta peptid ne veže na HLA-DQ2/DQ8 molekule, zato ne povzroči imunskega odgovora limfocitov T (CD4+) v lamini proprii. Sekvenco QQQP pa vsebuje tudi peptid 31-49, ki je prav tako toksičen za bolnike s celiakijo in je aktiven tudi *in vitro* v kulturah sluznice bolnikov. Peptid s 33 aminokislinami s sekvenco 57-89 pa je glavni modulator pridobljenega imunskega odziva v lamini proprii, kjer stimulira specifične limfocite T (CD4+). Je zelo imunogen, saj vsebuje kar šest epitopov in je zlasti odporen na razgradnjo z encimi resaste površine enterocitov (37, 38, 39).
V zadnjih letih je bilo sintetiziranih in testiranih mnogo različnih fragmentov α-gliadinov, pri čemer so ocenjevali njihovo toksičnost oziroma imunogenost (38).

## 1.4 Tkivna transglutaminaza

Encim tkivna transglutaminaza 2 (TG2) (EC 2.3.2.13) spada v družino transglutaminaz, ki je sestavljena iz devetih proteinov prisotnih v različnih predelih telesa. Vsi encimi pa katalizirajo nastanek kovalentne vezi med aminsko skupino enega in γ-karboksamidno skupino drugega proteina. V družino transglutaminaz spadajo (47, 48, 49, 50):

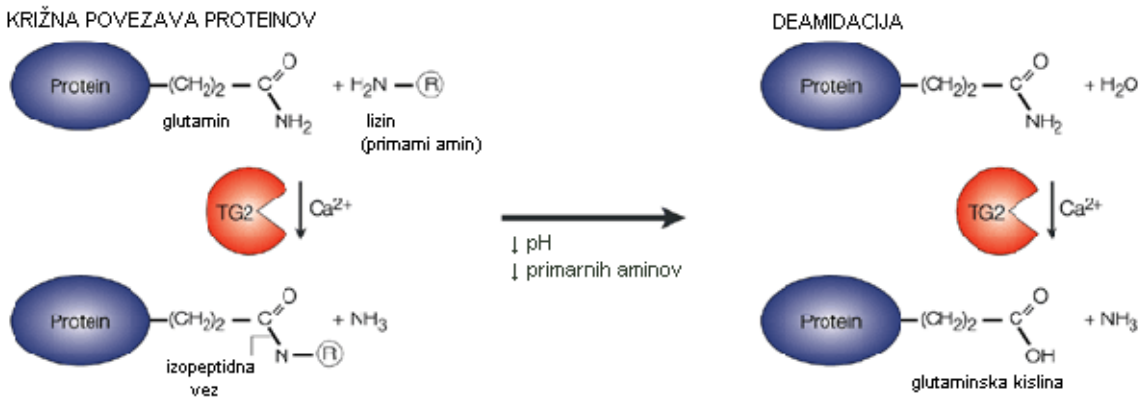
- ***Faktor strjevanja krvi XIII*** se nahaja v plazmi, kjer se pod vplivom trombina in $Ca^{2+}$ ionov aktivira do faktorja XIIIa. Ta sodeluje v zadnji fazi koagulacije krvi, kjer katalizira prečno povezovanje fibrina v fibrinsko mrežo.
- ***TG1*** (keratinocitna TG) je membranski encim in je vpletena v diferenciacijo keratinocitov. Encim sodeluje pri prečnem povezovanju proteinov in lipidov, ki tvorijo ovojnico celic epidermisa.

- ***TG2*** (tkivna TG) je prisotna v različnih tkivih po celotnem organizmu, kjer opravlja številne pomembne biološke funkcije.
- ***TG3*** (epidermalna TG) je prisotna v citoplazmi epidermalnih celic in tudi v lasnih foliklih, kjer sodeluje pri diferenciaciji keratinocitov (prečno povezovanje proteinov celične ovojnice).
- ***TG4*** je prisotna v prostati, sodeluje pa v reproduktivni funkciji pri glodavcih.
- ***TG5*** je prav tako prisotna v epidermisu, kjer sodeluje pri diferenciaciji keratinocitov. Encim pa je prisoten še v nekaterih drugih tkivih (lasni folikli, skeletne mišice…).
- Pri ostalih proteinih iz družine transglutaminaz (TG6, TG7, Band 4.2) pa je njihova prisotnost in funkcija v telesu še neznana oziroma še ni popolnoma pojasnjena.

TG2 se v tkivu nahaja intracelularno (v citoplazmi in tudi v jedru), lahko pa se nahaja tudi ekstracelularno in celo na celični površini. V tankem črevesu zdravih ljudi se TG2 nahaja predvsem v submukozi, zelo majhne količine encima pa najdemo tudi v epiteliju črevesne sluznice. Pri bolnikih s celiakijo se močno poveča encimska aktivnost TG2, spremeni pa se tudi lokacija encima v tkivu. Več TG2 se pri bolnikih nahaja v epiteliju, zlasti v vilusnih enterocitih (tako v citoplazmi, kot v resasti površini enterocita), močno pa se količina encima poveča tudi v ekstracelularnem matriksu lamine proprie. Predvidevajo, da se encim premesti iz intracelularnega v medcelični prostor v lamini proprii (41, 42, 45).

Tkivna transglutaminaza je od kalcija odvisen znotrajcelični encim, ki katalizira kovalentno križno povezavo med glutaminskim ostankom enega proteina in lizinskim ostankom drugega proteina, lahko pa lizin nadomesti tudi kakšen drug primarni amin. V primeru pomanjkanja ustreznega amina, pa substrat reagira z vodo in poteče deamidacija glutamina do glutaminske kisline. Reakcija deamidacije je favorizirana v rahlo kislem okolju (slika 6) (24, 42).

TG2 se nahaja v številnih tkivih, kjer sodeluje v različnih bioloških procesih. Njena funkcija naj bi bila odvisna tudi od njene lokacije v tkivu. Intracelularna TG2 naj bi bila vključena v procese celične proliferacije in diferenciacije ter apoptozo celic. V zadnjih stopnjah apoptoze pride v celici pod vplivom TG2 do polimerizacije intracelularnih proteinov, s tem se stabilizira struktura umirajoče celice preden pride do fagocitoze. Ekstracelularno pa je TG2 vpletena zlasti v regeneracijo poškodovanega tkiva in angiogenezo ter formacijo ekstracelularnega matriksa (41, 42, 43).




**Slika 6:** Reakcije, ki jih katalizira tkivna transglutaminaza (70).

### 1.4.1 Vloga tkivne transglutaminaze pri celiakiji

Pri celiakiji ima TG2 pomembno vlogo tako v patogenezi, kot tudi pri diagnostiki bolezni. Encim katalizira nastanek imunogenih peptidov, ki imajo ključno vlogo pri razvoju bolezni. Številni peptidi glutena so dobri substrati za TG2 zaradi visoke vsebnosti glutamina, ki ga TG2 deamidira do negativno nabite glutaminske kisline. Deamidirani peptidi imajo tako večjo afiniteto za vezavo na HLA-DQ2 ali HLA-DQ8 molekule in s tem sprožijo celični imunski odziv z limfociti T (CD4+) v lamini proprii (42, 44, 46).

Zadnja leta so ugotavljali predvsem katero aminokislinsko zaporedje je najboljši substrat za TG2, zlasti sekvence okoli reaktivnega glutaminskega ostanka. Ugotovili so, da je ključnega pomena predvsem razdalja med glutaminom in sosednjim prolinskim ostankom. Zelo dobri substrati za encim TG2 so torej peptidi, ki vsebujejo zaporedje QxP (x je katerakoli aminokislina), ne pa tudi zaporedji QP ali QxxP (36). Dva α-gliadinska peptida (62-75 in 57-68) imata zelo podobno zaporedje sedmih aminokislin. V nativni obliki jih intestinalni limfociti ne prepoznajo, po deamidaciji s TG2 pa postaneta zelo dober antigen za limfocite T. Dokazali so, da TG2 specifično deamidira glutaminski ostanek Q65 pri obeh peptidih (43, 46).

TG2 ima tudi sposobnost, da se sama križno poveže s peptidi glutena in pri tem tvori večje komplekse. Takšni kompleksi predstavljajo nove antigene, ki sprožijo imunski odziv z limfociti T in B. Posledično se tvorijo specifična protitelesa proti tkivni TG2 (anti-tTG), TG2 pa je hkrati avtoantigen tudi za protitelesa EMA. V zgodnjih fazah celiakije so

kompleksi gliadin-TG2 lahko specifični indikatorji bolezni in morda v prihodnosti prav ti kompleksi predstavljajo zanesljiv marker v diagnostiki bolezni. Protitelesa se producirajo v intestinalni mukozi in se nato nalagajo vzdolž vilusne in kriptne bazalne membrane preden jih lahko zaznamo v cirkulaciji in preden se pojavijo poškodbe sluznice. TG2 avtoprotitelesa so specifični indikator bolezni, saj so skoraj izključno prisotna le pri bolnikih s celiakijo. V diagnostične namene dokazujemo prisotnost protiteles anti-tTG razreda IgA, ki imajo zelo visoko specifičnost in občutljivost (24, 44, 45).

Poleg tkivne transglutaminaze (TG2) pa so s celiakijo povezani tudi ostali encimi iz družine transglutaminaz. Ti so vključeni zlasti v patologijo nevroloških, mišičnih in kožnih zapletov, ki se lahko pojavljajo skupaj s celiakijo. Nekateri bolniki s celiakijo lahko izražajo nevrološke klinične znake (npr. periferna nevropatija, ataksija…). Pred kratkim so odkrili pri bolnikih z glutensko ataksijo značilna protitelesa proti TG6 (nevronska TG), ki pa niso prisotna pri zdravih ljudeh (49, 52). Pri nekaterih bolnikih (približno 10 %) se skupaj s celiakijo pojavlja tudi kožna bolezen dermatitis herpetiformis Duhring (DHD). Tudi v tem primeru so odkrili, da imajo pomembno vlogo tudi ostali encimi iz družine transglutaminaz. Pri bolnikih z DHD so v serumu odkrili protitelesa proti TG2, TG3 in EMA protitelesa, TG3 protitelesa pa so bila prisotna tudi v kožnih lezijah bolnikov. Prav TG3 (epidermalna TG) naj bi bila v primeru DHD tudi dominantni avtoantigen (50, 51).

Ni še povsem pojasnjeno, zakaj se zveča aktivnost TG2 le pri bolnikih s celiakijo. Nekateri menijo, da določeni peptidi glutena sprožijo prirojen imunski odziv, ki v tkivu inducira blago vnetje. S tem pa se sproži tudi sproščanje aktivne TG2 iz poškodovanega tkiva. TG2 še naprej producira imunogene deamidirane peptide glutena, kar sproži še obširnejši imunski odziv (44). Še vedno ostaja tudi vprašanje, kje deamidacija peptidov sploh poteka in kakšna je vloga enterocitov v patofiziologiji celiakije. Zelo verjetno pa je, da TG2 pride v stik s peptidi gliadina na površini ali pa v notranjosti enterocitov (42).

## 1.5 In vitro testni modeli za proučevanje celiakije

Browning in Trier sta leta 1969 prva uspešno kultivirala intestinalne biopte (humane in živalske). Kljub številnim poskusom, da bi izboljšali eksperimentalne pogoje (zlasti sestavo medija za kultiviranje), se je intestinalna kultura ohranila le za kratek čas. Večina študij je zabeležila povprečen čas preživetja humane ali živalske kulture v optimalnih pogojih le 24-72 ur. Glede na številne študije so ključni faktorji za preživetje intestinalne mukoze v kulturi: velikost oziroma debelina tkiva (da ne pride do centralne nekroze naj bodo delčki veliki 1-4 $mm^2$), stik tkiva s plinom in medijem za kultiviranje, sestava medija ter sestava plinov in temperatura v inkubatorju (53, 54, 55).

***Organska kultura*** so nerazbiti koščki tkiva, ki ohranjajo tridimenzionalno strukturo in vse histološke značilnosti tkiva. Gojimo jo na posebni membrani ali gelu na meji med plinsko in tekočo fazo. Celice se, razen na robu koščka, ne morejo razmnoževati. V sredini pogosto pride do nekroze zaradi pomanjkanja hrane in kisika. Zato moramo za vsak poskus pripraviti sveže kulture, kar pa povzroči slabšo ponovljivost (54).

Organske kulture so bile v preteklosti tudi model za proučevanje nekaterih bolezni tankega črevesa (npr. celiakije, Crohnove bolezni …). Trier in Browning sta prva odkrila, da se črevesna sluznica bolnikov s celiakijo v kulturi v pogojih brez glutena regenerira. Poudarila pa sta tudi povečano celično proliferacijo in migracijo pri bolnikih s celiakijo v primerjavi s kulturo normalne sluznice (55). Kasneje so organske kulture humanih bioptov uporabljali za podrobnejše proučevanje patogeneze celiakije in tudi vpliva toksičnih peptidov glutena na sluznico tankega črevesa (36). Spremljali so predvsem:

- histološke spremembe na črevesni sluznici (določanje višine resic in globine kript, določanje višine enterocitov in sprememb mikroresic, spremljanje črevesne permeabilnosti…),
- povečan imunski odziv v sluznici (štetje IEL, določanje specifičnih protiteles…),
- biokemijske spremembe na sluznici (spremljanje aktivnosti encimov resaste površine enterocitov…).

Kasneje so nekateri pri proučevanju vpliva toksičnih peptidov glutena *in vivo* študije in študije na bioptičnih vzorcih bolnikov zaradi praktičnih in etičnih razlogov raje zamenjali z živalskimi organskimi kulturami (črevesje zarodkov podgan, piščancev…) (39).

Nadaljnji razvoj pa je pripeljal do vpeljave celičnih kultur, kjer so celice individualne. Prvi poskusi, kjer so skušali osnovati celično kulturo z encimskim ali kemijskim ločevanjem celic niso bili uspešni, oziroma je bila celična kultura uporabna le za kratkoročne poskuse. Po številnih modifikacijah v pridobivanju ločenih celic v kulturi in modifikaciji pogojev kultiviranja, so številni avtorji uspešno uvedli dolgo živeče primarne kulture ali celične linije. Quaroni (1979) je bil prvi, ki je zabeležil osnovanje dolgo živeče epitelijske celične kulture podganjega črevesa (npr. IEC-6). Celične linije humanega karcinoma kolona HT-29 in Caco-2 pa je osnoval Jorgen Fogh v letu 1964 in 1974. Največ se uporabljajo Caco-2 celice, ki tudi izkazujejo visoko stopnjo diferenciranosti in Caco-2 celična linija ima izredno morfološko in biokemijsko podobnost z epitelijem tankega črevesa. Caco-2 celice zelo dobro izkazujejo lastnosti diferenciranih enterocitov. V kulturi se med celicami vzpostavijo tesni stiki, celice imajo na apikalnem delu prisotne mikroresice, dosegajo pa tudi visoko stopnjo aktivnosti disaharidaz in peptidaz. Kljub temu, da Caco-2 kulture odražajo lastnosti zrelih intestinalnih celic, ostajajo določene omejitve pri uporabi teh kultur – celice so namreč maligno transformirane in imajo verjetno drugačne kontrolne mehanizme kot normalne celice. Pri *in vitro* študijah patogeneze vnetnih črevesnih bolezni pa je potreben celični model, ki čim bolj ponazarja fiziološke pogoje (6, 55, 56).

### 1.5.1 Celične kulture

Celična kultura je homogena populacija celic, ki živijo in se razmnožujejo v gojišču, v pogojih *in vitro*. Njena uporaba omogoča lažjo dostopnost za opazovanje in eksperimentiranje. Prednost pred organizmom je lažje zagotavljanje enakih pogojev za vse celice (fizikalno-kemijsko okolje lahko bolje kontroliramo), fiziološki pogoji so relativno konstantni, homogenost vzorca in ekonomičnost (potrebujemo manjše količine reagentov). Pri študiranju celične kulture se moramo tudi zavedati razlik glede fizioloških funkcij *in vivo*. Problemi gojenja celic v kulturi so v izgubi specifičnih lastnosti celic, proliferaciji, spremeni se tridimenzionalna struktura tkiva, zaradi česar se prekinejo interakcije med celicami in medceličnino, manjkata tudi živčni in endokrini sistem, zaradi spremembe okolja pa lahko pride do izgub specifičnih celičnih funkcij (54).

Pridobivanje celičnih kultur lahko poteka na dva načina:

- iz tkivne kulture (z migracijo celic iz koščka tkiva dobimo primarno celično kulturo) in
- z encimsko ali mehansko razgradnjo koščkov tkiva (dobimo suspenzijo celic).

Pridobljene celice v kulturi preživijo in se razmnožujejo, če so pritrjene na trdno podlago kot monosloj. Nekatere celice (npr. krvne celice, nekatere transformirane in tumorske celice) pa preživijo in se razmnožujejo brez pritrditve v suspenziji in lahko se celo ponovno združijo v tridimenzionalno strukturo (54).

### 1.5.2 Spremljanje vplivov gliadina na enterocite v celičnih kulturah

Etiopatogeneza celiakije še ni povsem pojasnjena, zlasti malo je znanega o prvih fazah bolezni, kjer igra glavno vlogo imunski odziv na gliadin in ostale toksične peptide glutena. *In vitro* dvo- in tridimenzionalne celične kulture so enostaven in uporaben model za proučevanje funkcionalnih in morfoloških celičnih sprememb, ki jih povzročijo različni toksični peptidi gliadina. Vedno večja je uporaba tridimenzionalnih celičnih kultur, ki za razliko od običajnih monoslojev ohranjajo specifične morfološke in biokemijske lastnosti, ki ustrezajo *in vivo* tkivu (57).

*In vitro* študije toksičnosti peptidov gliadina so pomembne pri proučevanju in razumevanju patogenetskih mehanizmov celiakije. Prav tako pa so *in vitro* študije pomembne za testiranje domnevno netoksičnih peptidov glutena, kar bi morebiti pripomoglo tudi pri razvoju novih terapevtskih možnosti.

Številne *in vitro* študije na različnih celičnih kulturah (Caco-2, K-562, IEC-6…) so že dokazale direktno citotoksičnost peptidov gliadina na črevesne celice preko (39, 57):

- morfoloških sprememb celic (spremembe v velikosti in obliki celice),
- sprememb citoskeleta (gliadin lahko povzroči povečano izločanje zonulina in s tem okvaro tesnih stikov ter povečano permeabilnost tkiva),
- zmanjšane celične rasti in viabilnosti v Caco-2 in Lovo celični kulturi,
- indukcije apoptoze v Caco-2 celični kulturi (ki je povezana s vilusno atrofijo),
- aglutinacijske aktivnosti v K-562 celični kulturi,
- zmanjšane sinteze DNA in RNA ter s tem tudi proteinov,
- oslabljenega oksidativnega ravnotežja (zmanjšana vsebnost glutationa, zmanjšanje proteinskih –SH skupin, povečana lipidna peroksidacija…).

Kljub številnim intestinalnim celičnim linijam pa je še vedno pomanjkanje *in vitro* modelov, kjer bi bili prisotni popolnoma diferencirani normalni (netransformirani) vilusni enterociti. Ker normalni in popolnoma diferencirani enterociti nimajo proliferacijskih lastnosti, jih lahko *in vitro* vzdržujemo le v primarnih kulturah. Primarne kulture epitelijskih celic tankega črevesa so primernejše tudi za proučevanje toksičnosti peptidov glutena, saj so zaradi spremenjenih lastnosti nekatere celične linije (npr. Caco-2, Lovo …) veliko bolj občutljive na vplive glutena (7, 57, 64).

# 2 NAMEN DELA

Čeprav etiopatogeneza celiakije še ni povsem pojasnjena, pa je poznana pomembna vloga tkivne transglutaminaze v patogenezi in diagnostiki bolezni. Encim katalizira nastanek imunogenih peptidov, ki v tankem črevesu sprožijo imunski odgovor. Ker je znano že celotno aminokislinsko zaporedje številnih gliadinov, v zadnjih letih raziskujejo zlasti kateri peptidi oziroma katere aminokislinske sekvence glutenskih proteinov so toksične ali imunogene pri bolnikih s celiakijo.

Proučevali bomo vplive dveh različnih peptidov gliadina (p31-43 in p2-11) na kultivirane mišje enterocite preko spremljanja celične živosti in aktivnosti tkivne transglutaminaze.
Eksperimentalno delo bo potekalo v naslednjih korakih:

1. Izolacija mišjih enterocitov.
2. Kultiviranje mišjih enterocitov skupaj s toksičnimi peptidi po modificirani metodi Lukač Bajalo in sod.
3. Merjenje aktivnosti tkivne transglutaminaze v celičnem lizatu:
    - priprava celičnega lizata,
    - merjenje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi,
    - merjenje aktivnosti tkivne transglutaminaze.
4. Spremljanje celične živosti z MultiTox-Fluor Multiplex testom citotoksičnosti.

V primeru, da bi kateri od peptidov gliadina deloval toksično na mišje enterocite, bi s testom citotoksičnosti določili značilen padec celične živosti glede na kulture brez dodanih peptidov in povišano encimsko aktivnost tkivne transglutaminaze.

# 3 MATERIALI IN METODE

## 3.1 Izolacija mišjih enterocitov

Živalski model:

- miši (BALB/C)

Ta del eksperimentov je bil opravljen na UL – Veterinarski fakulteti v Ljubljani, skladno s kodeksom o delu z eksperimentalnimi živalmi. Žrtvovali smo 6 inbridiranih miši (BALB/C) moškega spola, starih 4 mesece, povprečne teže 29,0 g. Miši so bile hranjene "ad libitum" in v naravnem svetloba/tema ciklu. Žrtvovali smo jih v stanju fiziološkega mirovanja ob $10^h$ dopoldan. Odvzeli smo celotno tanko črevo.

Reagenti in kemikalije:

- kolagenaza tip XI (Sigma C7657, Nemčija)
- kompletiran medij RPMI 1640
- fiziološka raztopina (0,9 % NaCl)

V 250 mL kompletiranega medija RPMI 1640 je:

- 220 mL nekompletiranega medija RPMI 1640 s HEPES-om (Sigma R5886, Nemčija)
- 25 mL FBS (Sigma F4135, ZDA)
- 2,5 mL raztopine Ab/Am (100X), ki vsebuje 10.000 U/mL penicilina G, 10 mg/mL streptomicina in 25 µL/mL amfotericina B (Sigma A5955, Nemčija)
- 2,5 mL 200 mM raztopine L-glutamina (Sigma G7513, Nemčija)
- 50 nM β-merkaptoetanola (Sigma M7522, Nemčija)
- 250 mg glukoze (Zorka – Šabac)

Postopek izolacije vilusnih enterocitov:

1. miši odvzamemo celotno tanko črevo, le na vsaki strani s škarjami odstranimo približno 2 centimetra, ter iz preostalega tankega črevesa začnemo postopek izolacije,

2. s sterilno brizgo vsebino tankega črevesa izperemo z 10 mL fiziološke raztopine segrete na 37 °C,
3. črevo izperemo z 10 mL nekompletiranega RPMI medija,
4. s škarjami iztisnemo iz črevesa rumenkasto sluz, bogato z vilusnimi enterociti in jih ločeno kultiviramo,
5. črevo ponovno izperemo s 5 – 10 mL nekompletiranega RPMI medija,
6. v čašo dodamo malo nekompletiranega RPMI medija in črevo s kirurškimi škarjami razrežemo na čim manjše delčke,
7. v čašo dodamo sveže pripravljeno kolagenazo (15 mg/10 mL nekompletiranega RPMI medija); tudi vilusnim enterocitom dodamo raztopino kolagenaze (7,5 mg/5 mL nekompletiranega RPMI medija),
8. ob rahlem mešanju inkubiramo na 37 °C do nastanka motnega supernatanta,
9. moten supernatant, ki vsebuje iz tkiva izolirane celice, prenesemo v centrifugirko in centrifugiramo 2 minuti pri 1200 vrt/min,
10. bister supernatant zavržemo, sediment resuspendiramo v 10 mL nekompletiranega RPMI medija in centrifugiramo 2 minuti pri 1200 vrt/min,
11. bister supernatant ponovno zavržemo, sediment resuspendiramo v 10 mL nekompletiranega RPMI medija in centrifugiramo 2 minuti pri 1200 vrt/min,
12. končni sediment resuspendiramo v 5 mL kompletiranega RPMI medija, vsebino centrifugirke prenesemo v petrijevko in dodamo še malo kompletiranega RPMI medija,
13. petrijevke prenesemo v inkubator (37 °C, 100 % vlažnost, sestava plinov: 95 % zraka in 5 % $CO_2$).

## 3.2 Kultiviranje mišjih enterocitov po modificirani metodi Lukač Bajalo in sod.

Izolirane mišje enterocite smo kultivirali po modificirani metodi Lukač Bajalo in sod., ki je bila razvita za kultiviranje tkiva tankega črevesa (53) in v predhodnih poskusih prilagojena za kultiviranje iz tkiva izoliranih enterocitov.

Medij, ki smo ga uporabili za kultiviranje mišjih enterocitov, je kompletiran RPMI 1640. Svež medij je rdeče barve, ko pa se izrabi (pH medija pade), se barva medija spremeni v čebulno oziroma rumenkasto. Taka sprememba je dober pokazatelj, kdaj je celicam

potrebno zamenjati medij, narediti pasažo ali pa le dodati nekaj svežega medija. Za uspešno rast izoliranih enterocitov je pomembna gostota celic v kulturi. Ta ne sme biti prevelika (več kot $10^6$ celic/mL) in prav tako ne premajhna. Če je število celic preveliko, lahko dodamo nekaj svežega medija ali pa kulturo razdelimo v dve petrijevki in nato v vsako dodamo svež medij. Če pa je gostota celic premajhna, pa celice odcentrifugiramo, odlijemo medij in usedlino resuspendiramo v ustrezno manjšem volumnu medija, ter nasadimo kulturo v manjšo petrijevko.

Ločeno od preostalega tkiva smo kultivirali sluz bogato z vilusnimi enterociti in to kulturo smo tudi uporabili za naše poskuse. Dan po izolaciji mišjih enterocitov smo celotno kulturo (5 mL) razdelili v pet različnih petrijevk (po 1 mL kulture) in začeli celice inkubirati z gliadinskimi peptidi. Ta čas smo označili s t=0h. Uporabili smo dva različna gliadinska peptida (P1 in P2) v dveh različnih koncentracijah: $c_1$=100 µg/mL in $c_2$=200 µg/mL. Kulture smo kasneje označevali z naslednjimi oznakami: P1 100, P1 200, P2 100 in P2 200. Del kulture (1 mL) pa smo kultivirali brez gliadinskih peptidov. Preglednica II nam prikazuje shemo nanašanja in kultiviranja na mikrotitrskih ploščicah.

Uporabili smo dva sintetična gliadinska peptida:

- **peptid 1**: p31 – 43 (H – LGQQQPFPPQQPY – OH · HCl)
- **peptid 2**: p2 – 11 (H – QQPQDAVQPF – OH · HCl)

**Preglednica II:** Shema kultiviranja na mikrotitrskih ploščicah.

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| kultura 1 brez peptida | kultura 2 brez peptida | kultura 3 brez peptida | kultura 4 brez peptida | kultura 5 brez peptida | kultura 6 brez peptida |
| kultura 1 P1 100 | kultura 2 P1 100 | kultura 3 P1 100 | kultura 4 P1 100 | kultura 5 P1 100 | kultura 6 P1 100 |
| kultura 1 P1 200 | kultura 2 P1 200 | kultura 3 P1 200 | kultura 4 P1 200 | kultura 5 P1 200 | kultura 6 P1 200 |
| kultura 1 P2 100 | kultura 2 P2 100 | kultura 3 P2 100 | kultura 4 P2 100 | kultura 5 P2 100 | kultura 6 P2 100 |
| kultura 1 P2 200 | kultura 2 P2 200 | kultura 3 P2 200 | kultura 4 P2 200 | kultura 5 P2 200 | kultura 6 P2 200 |

***Postopek menjave medija oziroma pasaže:***

Vsebino petrijevke (nečisto kulturo z delčki tkiva) prenesemo v centrifugirko in centrifugiramo 10 minut pri 1200 vrt/min. Supernatant previdno odlijemo, sediment resuspendiramo v kapljici starega medija in nato dodamo 10 – 15 mL svežega medija, odvisno od števila celic. Vsebino centrifugirke dobro premešamo s pipeto. Pri tem moramo biti pazljivi, da se medij ne peni, saj lahko nastali mehurčki poškodujejo membrane enterocitov. Medij s celicami spet prenesemo v petrijevko, ki jo nato postavimo v inkubator (37 °C, 100 % vlažnost, sestava plinov: 95 % zraka in 5 % $CO_2$).

***Postopek zamrzovanja celic:***

Reagenti in kemikalije:

- RPMI 1640 s HEPES-om (Sigma R5886, Nemčija)
- FBS (Sigma F4135, ZDA)
- DMSO (Sigma D5879, Francija)

Priprava delovnih reagentov:

Raztopina A: 80% RPMI (V=2,4 mL), 20% FBS (V=600 µL).

Raztopina B: 70% RPMI (V=2,1 mL), 10% FBS (V=300 µL), 20% DMSO (V=600 µL).

Celoten postopek zamrzovanja celic izvajamo na ledu. Celično kulturo prenesemo v centrifugirko in centrifugiramo 10 minut pri 1200 vrt/min. Supernatant odlijemo, sedimentu celic pa dodamo 0,5 mL raztopine A. Vsebino premešamo, prenesemo v krioampulo in dodamo še 0,5 mL raztopine B, v katero je bil dodan DMSO, ki prepreči negativne posledice zamrzovanja celic.

***Postopek odmrzovanja celic:***

Krioampule s celicami prenesemo iz tekočega dušika na vodno kopel, ki jo predhodno segrejemo na 37°C. Odmrznjenim celicam dodamo par kapljic toplega RPMI medija za inkubiranje, tudi segretega na 37°C. Previdno premešamo z mikropipeto, ki je neprestano potopljena v raztopino, da ne pride do penjenja (uničevanja celic). Nato s pipeto vse prenesemo v epruveto za centrifugiranje in dodamo 10 mL na 37°C segretega RPMI medija. Centrifugiramo 10 minut pri 1200 vrt/min. Supernatant odlijemo, sediment celic pa nasadimo v petrijevko s svežim medijem primernega volumna.

## 3.3 Merjenje aktivnosti tkivne transglutaminaze v celičnem lizatu

Ob začetku kultiviranja (t=0h) ter po času enega oziroma dveh dneh (t=24h, t=48h) smo merili aktivnosti tkivne transglutaminaze (EC 2.3.2.13) v celičnem lizatu.

Delo je potekalo v treh korakih:

- priprava celičnega lizata,
- merjenje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi in
- merjenje aktivnosti tkivne transglutaminaze.

### 3.3.1 Priprava celičnega lizata

Reagenti in kemikalije:

- NaCl (Fluka 71380, Švica)
- destilirana voda

Priprava delovnih reagentov:

Fiziološka raztopina (0,9 % NaCl): 9 g NaCl raztopimo v 1 L destilirane vode.

Postopek priprave celičnega lizata:

1. vzorec prenesemo v epruveto za centrifugiranje in centrifugiramo 10 minut pri 1200 vrt/min,
2. supernatant odlijemo, sediment pa resuspendiramo v 10 mL fiziološke raztopine in ponovno centrifugiramo 10 minut pri 1200 vrt/min; ta korak še enkrat ponovimo, da dobimo bister, brezbarven supernatant,
3. supernatant previdno odlijemo, preostanek fiziološke raztopine nad sedimentom pa odpipetiramo,
4. sedimentu (celicam) dodamo 250 µL destilirane vode in resuspendiramo, nato pa vsebino centrifugirke prenesemo v plastično epruveto z zamaškom (V=1,5 mL) in jo ustrezno označimo,
5. epruveto damo za 30 minut na – 20°C in nato za 5 minut na 37°C; ta korak še enkrat ponovimo.

Celični lizat mora biti homogen, zato epruveto tik pred pipetiranjem še enkrat temeljito premešamo z vibracijskim mešalom.

### 3.3.2 Merjenje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi

Bradfordova metoda (58) temelji na spremembi barve barvila Coomassie Brilliant Blue G – 250 v kislem v odvisnosti od koncentracije proteinov. Barvilo nastopa v dveh barvnih odtenkih: v kislem je najbolj obstojen v protonirani rdeči obliki, ob vezavi na proteine pa preide v neprotonirano obliko in se barva reagenta spremeni v modro oziroma zeleno, odvisno od koncentracije proteinov. Ko se barvilo veže na proteine, to povzroči premik absorpcijskega maksimuma iz 465 nm na 595 nm. Intenzivnost obarvanosti raztopine po nastanku kompleksa oziroma absorpcija pri 595 nm je proporcionalna koncentraciji proteinov v vzorcu (59).
Vezava barvila na proteine poteče zelo hitro (približno dve minuti), kompleks pa je obstojen približno eno uro.

Reagenti in kemikalije:

- Total Protein Kit, Micro (Sigma TP0100, Nemčija):
  - raztopina barvnega reagenta: Brilliant Blue G, 0.35 mg/mL (Sigma B5809, Nemčija)
  - raztopina proteinskega standarda: humani albumin, 0.3 mg/mL (Sigma P9744, Nemčija)
- fiziološka raztopina (0,9 % NaCl)
- destilirana voda

Priprava delovnih reagentov:

- *raztopine standarda* (humani albumin)*:*

V setu imamo že pripravljeno raztopino standarda s koncentracijo 0,3 mg/mL. Tako pripravljeno osnovno raztopino standarda ustrezno redčimo, da dobimo še raztopine s koncentracijami 0,15 mg/mL, 0,075 mg/mL, 0,05 mg/mL in 0,025 mg/mL. Raztopine redčimo s fiziološko raztopino.

- *barvni reagent:*

1 del (10 mL) koncentriranega barvnega reagenta (iz seta) rdeče barve redčimo s 4 deli (40 mL) destilirane vode. Tako pripravljen reagent je rjave barve in se lahko uporablja do 14 dni, če se shranjuje pri sobni temperaturi. Raztopina je lahko rahlo motna, vendar to ne vpliva na meritve.

Postopek dela in nanašanja na mikrotitrsko ploščo nam prikazuje preglednica III, končni izračun koncentracije proteinov pa nam podaja enačba 1.

**Preglednica III:** Postopek dela za merjenje koncentracije proteinov.

| | reagenčna slepa | | | standard | | | vzorec | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| št. luknje na plošči | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 0,9% NaCl (v µL) | 25 | 25 | 25 | - | - | - | - | - | - |
| standard (v µL) | - | - | - | 25 | 25 | 25 | - | - | - |
| vzorec (v µL) | - | - | - | - | - | - | 25 | 25 | 25 |
| barvni reagent (v µL) | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 |
| Inkubiramo približno 2 minuti pri sobni T. Nato izmerimo absorbanco pri 595 nm. | | | | | | | | | |

**Enačba *1*:** Izračun koncentracije proteinov v vzorcu.

$$\frac{(A_{vz} - A_{sl})}{(A_{st} - A_{sl})} c_{st} = \ldots\ldots \text{ mg/mL proteinov}$$

$A_{vz}$ = absorbanca vzorca

$A_{st}$ = absorbanca standarda

$A_{sl}$ = absorbanca reagenčne slepe

$C_{st}$ = koncentracija standarda

### 3.3.3 Merjenje aktivnosti tkivne transglutaminaze

Tkivna transglutaminaza je od kalcija odvisen znotrajcelični encim, ki katalizira kovalentno križno povezavo med glutaminskim ostankom enega in lizinskim ostankom drugega proteina.

Test temelji na katalitični aktivnosti transglutaminaze pri tvorbi kovalentne vezi med prosto aminsko skupino kadaverina (ta je kovalentno vezan na površino mikrotitrske ploščice, ki je priložena setu) in γ-karboksamidno skupino biotin-TVQQEL-OH substrata, ki pa se nahaja v reakcijskem pufru. Pri reakciji pride do vezave biotina na površino mikrotitrske ploščice. Nevezani biotin odstranimo tako, da vdolbinice na ploščici 3x speremo z ultračisto vodo. Količina vezanega biotina je proporcionalna količini aktivne transglutaminaze v vzorcu. V naslednjem koraku določimo količino vezanega biotina z uporabo konjugata streptavidin – peroksidaza in TMB substrata. Streptavidin ima veliko afiniteto do biotina in zato z biotinom tvori zelo močno nekovalentno vez. Odvečni (nevezani) streptavidin odstranimo tako, da vdolbinice na ploščici največ trikrat speremo s fosfatnim pufrom (PBS-T). Količino vezanega streptavidina določimo tako, da dodamo TMB, ki je substrat za peroksidazo. Pri reakciji nastaja modro obarvan produkt (oksidiran TMB), po 1-3 minutah pa razvoj barve prekinemo tako, da dodamo raztopino za prekinitev reakcije. Raztopina postane rumene barve in ji pomerimo absorbanco pri 450 nm. Izmerjena absorbanca je proporcionalna količini vezanega biotina in s tem tudi količini aktivne transglutaminaze v vzorcu (60).
Aktivnosti transglutaminaze so izražene kot specifične aktivnosti IU/g proteinov, kjer je IU katalitična aktivnost encima, ki v 1 minuti razgradi 1 μmol substrata pri standardnih pogojih (37°C, pH 6,0).

Reagenti in kemikalije:

- Transglutaminase Assay Kit (Sigma CS1070, ZDA):
  - reakcijski pufer (Sigma A5731, ZDA)
  - mikrotitrske ploščice prekrite s kadaverinom – 96 vdolbinic (Sigma C5618, ZDA)
  - DTT, 1M (Sigma D7059, ZDA)
  - transglutaminaza, 1 U/vialo (Sigma T5398, ZDA)
  - 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) tekoči substrat (Sigma T8665, ZDA)
  - raztopina za prekinitev reakcije (Sigma S6697, ZDA)
  - streptavidin – peroksidaza iz *Streptomyces avidinii* (Sigma S5512, ZDA)
- ultračista voda
- PBS-T = fosfatni pufer z 0,005 % TWEEN 20 (Sigma P3563, ZDA)
- EDTA 0,5M (Sigma E7889, ZDA)

Priprava delovnih reagentov:

- *osnovna raztopina transglutaminaze:*

Pripravimo raztopino, ki je 10 mM DTT in 1 mM EDTA (5 µL 1M DTT + 1 µL 0,5 M EDTA + 494 µL ultračiste vode). V 0,5 mL pripravljene raztopine raztopimo vsebino ene viale transglutaminaze. Encim je v raztopini stabilen 2 tedna, če ga shranjujeno pri 2-8°C. Osnovno raztopino transglutaminaze se ne sme alikvotirati in zamrzniti.

- *osnovna raztopina streptavidin – peroksidaza:*

Vsebino ene viale Streptavidin – peroksidaza raztopimo v 100 µL ultračiste vode. Raztopino lahko alikvotiramo in zamrznemo pri -20°C. Zamrznjena raztopina je stabilna 1 leto. Izogibamo se večkratnemu odmrzovanju in zamrzovanju.

- *raztopina za pozitivno kontrolo:*

Raztopino si pripravimo šele tik pred izvedbo testa. 1 µL osnovne raztopine transglutaminaze raztopimo v 1 mL ultračiste vode. Končna koncentracija encima je 2 mU/mL.

- *reakcijska mešanica:*

Raztopino si pripravimo šele tik pred izvedbo testa. Za en vzorec zmešemo 10 µL reakcijskega pufra, 1 µL 1M DTT in dodamo 40 µL ultračiste vode. Za več vzorcev si moramo preračunati kolikšen volumen reakcijske mešanice potrebujemo.

Postopek dela:

1. ploščico s kadaverinom vzamemo iz vrečke in pustimo, da se segreje na sobno T (vzamemo toliko stripov kot jih bomo potrebovali, neporabljene stripe pa hranimo pri -20°C v dobro zaprti vrečki skupaj z razvlaževalcem),
2. v vdolbinico za slepi vzorec dodamo 50 µL vode,
3. v vdolbinico za pozitivno kontrolo dodamo 50 µL raztopine pozitivne kontrole,
4. v testno vdolbinico pa dodamo 1-50 µL vzorca (ta naj vsebuje 1-10 µg proteinov) in z vodo dopolnimo vdolbinico do 50 µL,
5. v vsako vdolbinico dodamo 50 µL reakcijske mešanice. Premešamo tako, da s prsti rahlo potolčemo po ploščici. Inkubacija poteka 1-2 uri na ledu ali pa 15-30 minut na sobni temperaturi,
6. med inkubacijo si pripravimo konjugat streptavidin – peroksidaza. Za en vzorec zmešamo 0,1 µL osnovne raztopine streptavidin – peroksidaza in 100 µL PBS-T.

Za več vzorcev si moramo preračunati kolikšen volumen konjugata streptavidin – peroksidaza potrebujemo,

7. vse vdolbinice 3x speremo z ultračisto vodo,
8. v vsako vdolbinico dodamo 100 µL konjugata streptavidin – peroksidaza (korak 6) in inkubiramo 20 minut pri sobni T,
9. vsako vdolbinico speremo (ne inkubiramo!) z 200 µL PBS-T največ 3x,
10. v vsako vdolbinico dodamo 200 µL TMB tekočega substrata in inkubiramo 1-3 minute pri sobni T,
11. razvoj barve prekinemo tako, da v vsako vdolbinico dodamo 100 µL raztopine za prekinitev reakcije (Stop Solution),
12. izmerimo absorbanco pri 450 nm.

Postopek dela in nanašanja na mikrotitrsko ploščo nam prikazuje preglednica IV, končni izračun aktivnosti transglutaminaze pa nam podaja enačba 2.

**Preglednica IV:** Reakcijska shema za merjenje aktivnosti transglutaminaze.

| | encim | ultračista voda | reakcijska mešanica |
|---|---|---|---|
| reagenčna slepa | / | 50 µL | 50 µL |
| vzorec | x µL | 50 – x µL | 50 µL |
| pozitivna kontrola | 50 µL raztopine pozitivne kontrole | / | 50 µL |

**Enačba *2*:** Izračun specifične aktivnosti transglutaminaze v vzorcu.

$$\frac{(A_{vz} - A_{sl})}{(A_{pk} - A_{sl})} \times \frac{c_{pk}}{c_p} = \ldots\ldots \text{ IU/g proteinov}$$

$A_{vz}$ = absorbanca vzorca

$A_{sl}$ = absorbanca reagenčne slepe

$A_{pk}$ = absorbanca pozitivne kontrole

$c_{pk}$ = aktivnost transglutaminaze v raztopini pozitivne kontrole (= 2 mU/mL)

$c_p$ = koncentracija proteinov v vzorcu (g/L)

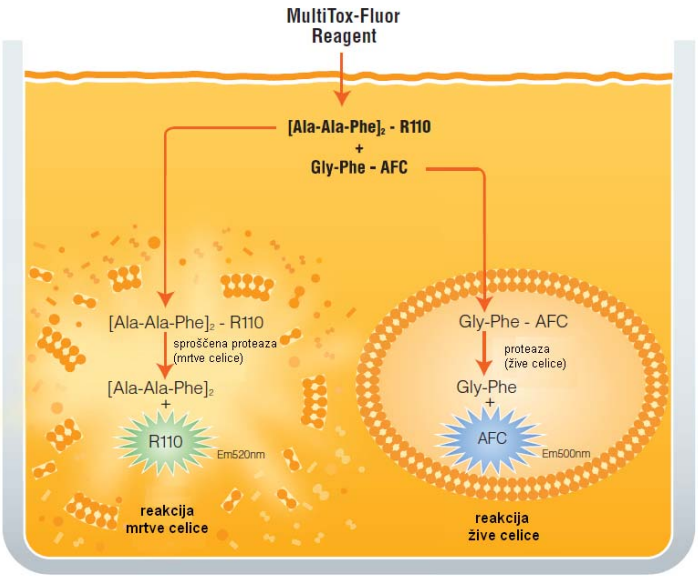
## 3.4 Spremljanje celične živosti z MultiTox-Fluor Multiplex testom citotoksičnosti

Ob začetku kultiviranja (t=0h) in po 48 urah (t=48h) smo spremljali celično živost z MultiTox-Fluor Multiplex testom citotoksičnosti v kulturi z in brez gliadinskih peptidov. Test nam sočasno meri relativno število živih (viabilnih) in mrtvih (neviabilnih) celic v kulturi tako, da sočasno meri aktivnost dveh proteaz (slika 7) (61).

Proteazo žive intaktne celice merimo z uporabo GF-AFC substrata (glycyl-phenylalanyl-amino-fluorocoumarin), ki lahko vstopi v živo celico, kjer ga nato cepi encim proteaza. Pri tem nastaja fluorescentni signal, ki je proporcionalen številu živih celic. Ko pa se integriteta membrane poruši, postane proteaza žive celice inaktivna in se sprosti v okoliški medij.

Proteaza mrtve celice se sprosti iz celice, ko se poruši integriteta membrane in jo merimo z uporabo bis-AAF-R110 substrata (bis-alanyl-alanyl-phenylalanyl-rhodamine 110). Ker ta substrat ne more prehajati celične membrane, ne daje nobenega signala pri živi celici. Proteazi žive in mrtve celice dajeta dva različna produkta (AFC in R110), ki imata drugačna ekscitacijska in emisijska spektra, zato ju lahko določamo istočasno.

Ker smo spremljali le celično živost v kulturah, smo spremljali le signale (fluorescenco) živih celic.




**Slika 7:** Princip spremljanja celične živosti in citotoksičnosti z MultiTox-Fluor testom (61).

Reagenti in kemikalije:

- MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay (Promega G9200, ZDA):
  - reakcijski pufer
  - GF-AFC substrat
  - bis-AAF-R110 substrat
- RPMI medij za kultiviranje

Priprava delovnih reagentov:

1. vse komponente testa odtalimo na 37°C na vodni kopeli,
2. dodamo 10 µL substrata GF-AFC in 10 µL substrata bis-AAF-R110 k 10 mL reakcijskega pufra; pri tem dobimo reakcijsko mešanico (MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay Reagent). Reagent premešamo z vibracijskim mešalom, dokler se oba substrata popolnoma ne raztopita. Reagent je uporaben 24 ur, če ga shranjujemo pri sobni T. Neporabljene komponente testa pa lahko shranjujemo pri 4°C do 7 dni.

Postopek dela:

1. v vdolbinice na mikrotitrski ploščici nanesemo kontrole, reagenčno slepo in vzorce; končni volumen v vsaki vdolbinici mora biti 100 µL,
2. v vsako vdolbinico nato dodamo po 100 µL reagenta (MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay Reagent), previdno premešamo na stresalniku in inkubiramo 30 minut na 37°C,
3. pomerimo fluorescenco:
   - viabilnost (živost): ekscitacija ~400 nm, emisija ~505 nm
   - citotoksičnost: ekscitacija ~485 nm, emisija ~520 nm

Shemo nanašanja na mikrotitrsko ploščico nam podaja preglednica V.

**Preglednica V:** Reakcijska shema za merjenje živosti.

| | reagenčna slepa | vzorec |
|---|---|---|
| RPMI medij za kultiviranje | 100 µL | / |
| vzorec | / | 100 µL |
| reagent | 100 µL | 100 µL |

## 3.5 Laboratorijski material

***Aparature, ki smo jih uporabljali pri eksperimantalnem delu:***

- inkubator (Heraeus, Nemčija)
- laminarij (Variolab Waldner, Nemčija)
- centrifuga (Tehtnica, slovenija)
- stresalnik Environmental Shaker – Incubator ES-20 (Biosan, Latvija)
- vibracijsko mešalo Bio Vortex V1 (Biosan, Latvija)
- vibracijsko mešalo (Scientific Industries, ZDA)
- vibracijsko mešalo (Tehtnica, Slovenija)
- inverzni svetlobni mikroskop (Olympus CX40-SL, Japonska)
- mikroskopski sistem cell R (Olympus IX81, Japonska)
- tehtnica (Tehtnica, Slovenija)
- analitska tehtnica (Gibertini, Italija)
- mikrotitrski čitalec Sunrise (Tecan, Avstrija)
- mikrotitrski čitalec Safire$^2$ (Tecan, Avstrija)
- Dewarjeva posoda s tekočim dušikom

***Delovni pribor, ki smo ga uporabljali pri eksperimentalnem delu:***

- polnilna pipeta (Biohit, Finska)
- pipete: 0,5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL (Biohit, Finska)
- pipeta za 8 nastavkov: 5-100 µL (Eppendorf Research pro, Nemčija)
- pipeta za 8 nastavkov: 20-300 µL (Eppendorf Research pro, Nemčija)
- plastični nastavki za pipete (Sarstedt, Nemčija)
- plastične epruvete z zamaškom: 1,5 mL in 2,0 mL (Sarstedt, Nemčija)
- krioampule: 2,5 mL (TPP, Švica)
- centrifugirke: 15 mL in 50 mL (TPP, Švica)
- mikrotitrske ploščice (TPP, Švica)
- Neubauerjeva komorica (BRAND, Nemčija)
- stojala za epruvete in centrifugirke
- plinski gorilnik
- steklovina

- injekcijske brizge
- kirurške škarje
- pinceta
- parafilm
- škarje
- štoparica
- gumijaste rokavice za enkratno uporabo

# 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

## 4.1 Kultiviranje mišjih enterocitov z gliadinskimi peptidi

Pri študiji smo za pridobivanje biološkega materiala uporabili živalski model – miši, ki so se že v predhodnih poskusih izkazale kot primeren model za izolacijo enterocitov iz tankega črevesa (64, 65). Prednost izoliranih celic pred tkivno kulturo je predvsem daljša živost in lažja dostopnost za opazovanje in eksperimentiranje.

Pri poskusu smo uporabili 6 inbridiranih miši (BALB/C) moškega spola, starih 4 mesece, hranjenih "ad libitum" in v naravnem svetloba/tema ciklu: miš 1 (27,7 g), miš 2 (29,1 g), miš 3 (29,0 g), miš 4 (29,1 g), miš 5 (30,4 g) in miš 6 (28,7 g). Kulture enterocitov tankega črevesa miši 1, 2, 3, 4, 5 in 6 smo kasneje označevali kot kultura 1, 2, 3, 4, 5 in 6.

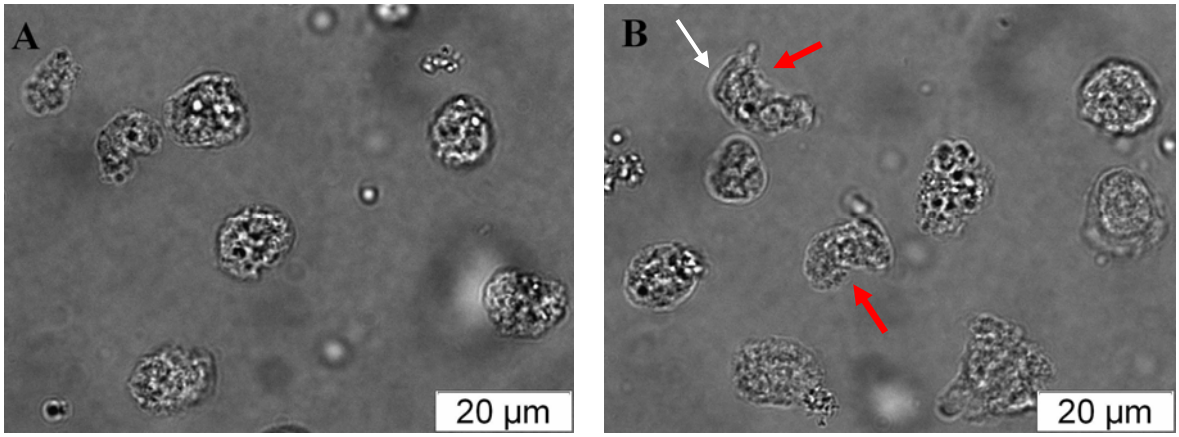
Z opisanim postopkom izolacije smo ločeno izolirali rumenkasto sluznično plast, kjer naj bi se nahajali pretežno diferencirani vilusni enterociti. Te kulture smo uporabili za naše poskuse kultiviranja z gliadinskimi peptidi. Kulture smo naredili tudi iz preostalega tankega črevesa, čeprav jih pri našem poskusu nismo uporabili. Alikvote teh kultur smo shranili v tekočem dušiku za nadaljnja raziskovanja, saj so enterociti iz zamrznjenih kultur še visoko viabilni skozi daljši čas (65). Nekaj alikvotov teh kultur pa smo uporabili tudi za pripravo celičnih lizatov, ki smo jih prav tako shranili pri -20°C za nadaljnja raziskovanja.

Pri poskusu smo kultivirali sluznično plast, ki smo jo iztisnili iz tankega črevesa. Predvidevali smo, da bo sluz bogata z diferenciranimi vilusnimi enterociti, vendar smo že pri mikroskopskem pregledu kultur ugotovili, da je prisotnih tudi veliko drugih intestinalnih epitelijskih celic. Kasneje smo delež vilusnih enterocitov določili tudi s štetjem pod inverznim mikroskopom. Šteli smo pri 400-kratni povečavi, kjer smo že lahko ločili vilusne enterocite od ostalih epitelijskih celic. Prešteli smo vilusne enterocite na sto epitelijskih celic in rezultat podali v odstotkih (preglednica VI). Določili smo povprečno 18 % vilusnih enterocitov v kulturi. Vzrok v nizkem odstotku vilusnih enterocitov je verjetno v načinu izolacije. Sluz smo verjetno pri mehanskem odstranjevanju iz tankega črevesa iztisnili preveč intenzivno in tako zajeli tudi ostale kriptne celice, ter na tak način dobili precej heterogeno kulturo intestinalnih epitelijskih celic.

**Preglednica VI:** Delež vilusnih enterocitov v kulturah na sto epitelijskih celic.

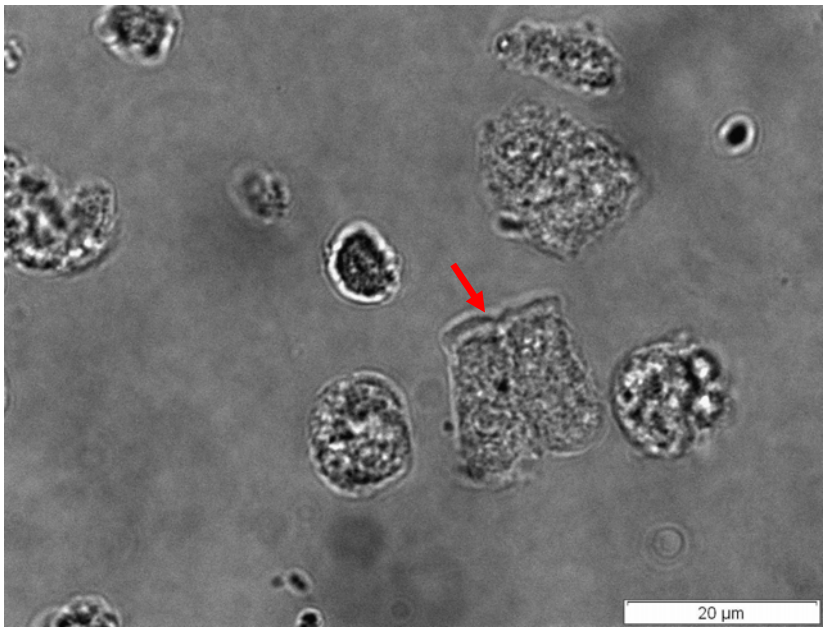
| kultura | odstotek vilusnih enterocitov (na 100 epitelijskih celic) |
|---|---|
| 1 | 19 |
| 2 | 16 |
| 3 | 17 |
| 4 | 20 |
| 5 | 23 |
| 6 | 13 |
| $\overline{X} \pm SD$ | **18 ± 3** |

V kulturah smo opazili, da so prisotne tudi ostale intestinalne epitelijske celice (čašaste, Panethove, enteroendokrine in matične celice), ki pa jih nismo ločili med seboj (slika 8). Diferencirane vilusne enterocite pa smo zlahka ločili od ostalih celic zaradi njihove značilne oblike (stebričaste celice z značilnim resastim robom na apikalnem delu), zato tudi pri določanju deleža vilusnih enterocitov v kulturi nismo imeli večjih težav (slika 8B).




**Slika 8:** Kulture intestinalnih epitelijskih celic. Na sliki A vidimo intestinalne epitelijske celice različnih velikosti in oblik. Na sliki B sta z rdečo puščico označena diferencirana vilusna enterocita, ki jih zlahka razlikujemo od ostalih epitelijskih celic. Enterocita imata značilno stebričasto obliko, apikalni del pa prekrivajo številne mikroresice, ki dajejo pod mikroskopom krtačast videz (bela puščica).
(Mikroskopski sistem cell R, Olympus IX81; 1000 x povečava)

Med kultiviranjem smo tudi opazili, da imajo diferencirani vilusni enterociti v kulturi težnjo po združevanju. Tako smo med mikroskopiranjem kultur kar velikokrat opazili združene enterocite – "dvojčke" (slika 9).

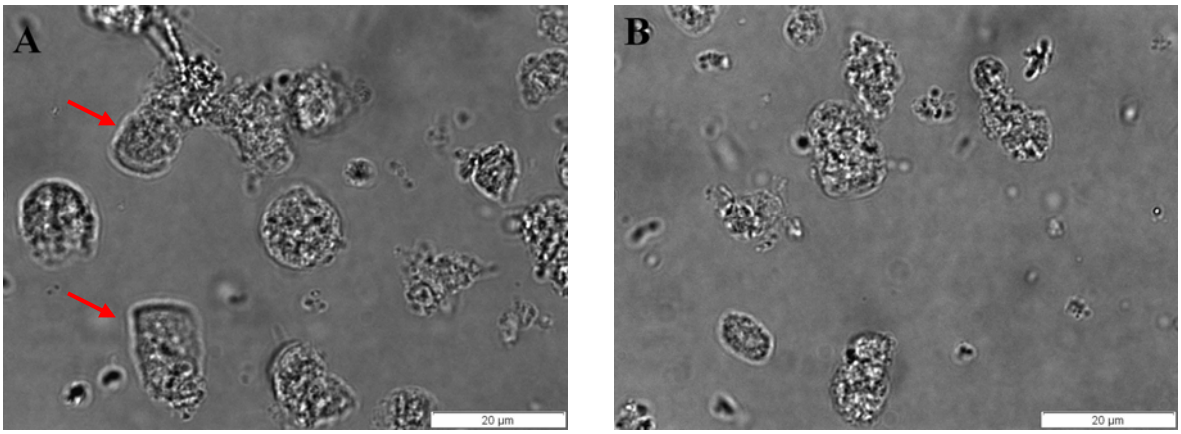



**Slika 9:** Kulture intestinalnih epitelijskih celic. Na sliki sta z rdečo puščico označena dva združena diferencirana vilusna enterocita.
(Mikroskopski sistem cell R, Olympus IX81; 1000 x povečava)

Kulture smo pod mikroskopom opazovali tudi po končani inkubaciji z gliadinskimi peptidi (po 48 urah) in jih primerjali s kulturami brez dodanih peptidov. Ugotovili smo, da se kulture s peptidi in brez njih bistveno ne razlikujejo med seboj. V vseh kulturah smo opazili, da so nekateri diferencirani vilusni enterociti in tudi ostale epitelijske celice v kulturi že začele propadati. Mišje epitelijske celice imajo tudi *in vivo* kratko življenjsko dobo (enterociti in čašaste celice zaključijo življenjski cikel v približno 2-3 dneh) (8). Med izolacijo smo verjetno poleg končnih diferenciranih celic zajeli tudi nediferencirane prekurzorske celice (v začetni fazi življenjskega cikla).

Pri enterocitih je prišlo do deformacije značilne stebričaste oblike celice. V kulturah je bilo možno opaziti tudi številne fragmente propadlih celic, celice pa so bile v notranjosti tudi že močno granulirane (slika 10). Kljub propadanju celic smo v kulturi še vedno prepoznali diferencirane vilusne enterocite. Čeprav pride do deformacije značilne stebričaste oblike (delno poškodovana integriteta membrane), je v kulturi še vedno opazen resasti rob na apikalnem delu enterocita (slika 10A).

Gliadinski peptidi niso imeli večjega vpliva na morfologijo celic, saj smo propadanje celic opazili tudi v kulturah brez dodanih gliadinskih peptidov.




**Slika 10:** Kulture intestinalnih epitelijskih celic po končanem kultiviranju. Na sliki A še vedno lahko prepoznamo vilusne enterocite (rdeča puščica), zlasti zaradi ohranjenega resastega roba na apikalnem delu. Na slikah A in B lahko opazimo, da so v kulturah prisotni tudi številni fragmenti propadlih celic.
(Mikroskopski sistem cell R, Olympus IX81; 1000 x povečava)

## 4.2 Spremljanje specifične aktivnosti tkivne transglutaminaze med kultiviranjem z gliadinskimi peptidi

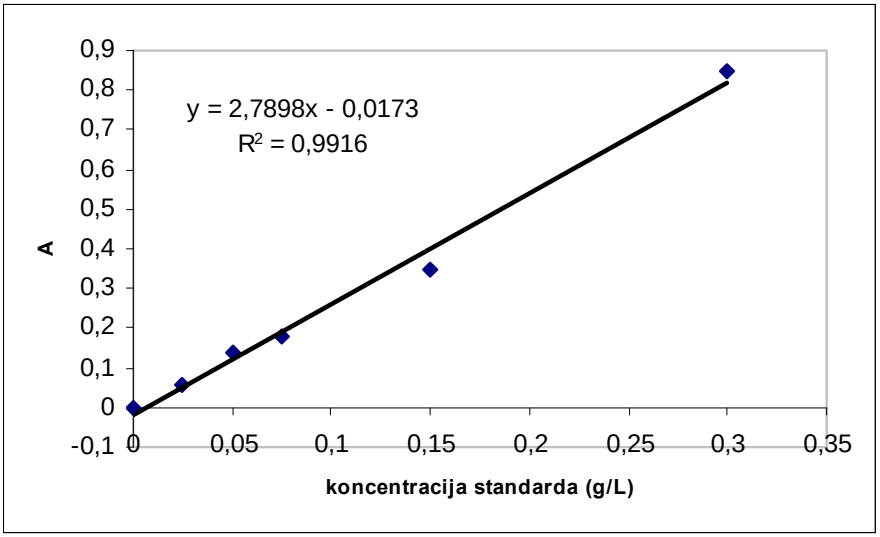
Po izolaciji mišjih enterocitov smo celice začeli kultivirati z dvema peptidoma gliadina (peptid 1: p31 – 43 in peptid 2: p2 – 11) v dveh različnih koncentracijah ($c_1$=100 µg/mL in $c_2$=200 µg/mL) in ob tem spremljali kako peptida posamezno vplivata na aktivnost tkivne transglutaminaze v vzorcu.

Specifične aktivnosti tkivne transglutaminaze smo izražali v IU/g proteinov (µmol/min/g proteinov), zato je bilo potrebno določiti tudi koncentracijo proteinov v vzorcu. Za določanje smo uporabili Bradfordovo metodo, koncentracije proteinov v vzorcu pa smo izračunali iz umeritvene premice (preglednica VII, graf 1).

**Preglednica VII:** Absorbance proteinskih standardov (humani albumin).

| koncentracija standarda – humani albumin (g/L) | A |
|---|---|
| 0,025 | 0,055 |
| 0,05 | 0,14 |
| 0,075 | 0,18 |
| 0,15 | 0,35 |
| 0,3 | 0,845 |

**Graf 1:** Umeritvena premica iz proteinskih standardov (humani albumin).



### 4.2.1 Peptid 1 – koncentracija 100 µg/mL

Koncentracije proteinov in specifične aktivnosti tkivne transglutaminaze v posameznih kulturah smo merili ob začetku kultiviranja z gliadinskimi peptidi (t=0h), ter po času 24 in 48 ur (t=24h, t=48h). Izmerjene vrednosti za vseh šest kultur med kultiviranjem s peptidom P1 100 nam prikazujeta preglednici VIII in IX.

Spreminjanje aktivnosti tkivne transglutaminaze v posameznih kulturah med kultiviranjem s peptidom P1 100 prikazujejo grafi 2-7.

**Preglednica VIII:** Koncentracije proteinov v kulturah med kultiviranjem s P1 100.

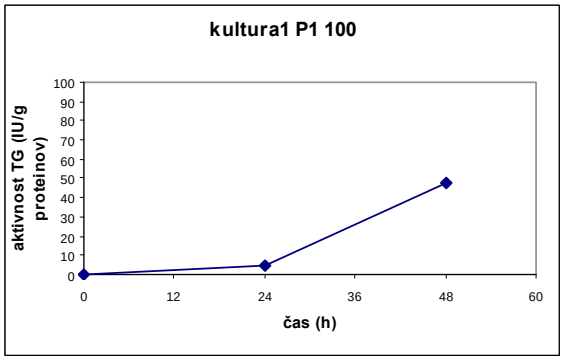
| **kultura** | **koncentracija proteinov (g/L)** | | |
|---|---|---|---|
| | **t=0h** | **t=24h** | **t=48h** |
| 1* | 0,02054 | 0,03488 | 0,02771 |
| 2 | 0,01696 | 0,02233 | 0,01696 |
| 3 | 0,02233 | 0,02592 | 0,01696 |
| 4 | 0,02412 | 0,02233 | 0,01875 |
| 5 | 0,02412 | 0,02592 | 0,01875 |
| 6 | 0,02054 | 0,03846 | 0,01696 |
| $\overline{X} \pm$ SD | 0,02144 ± 0,002715 | 0,02831 ± 0,00677 | 0,01935 ± 0,004189 |

**Preglednica IX:** Specifične aktivnosti tkivne transglutaminaze v kulturah med kultiviranjem s P1 100.

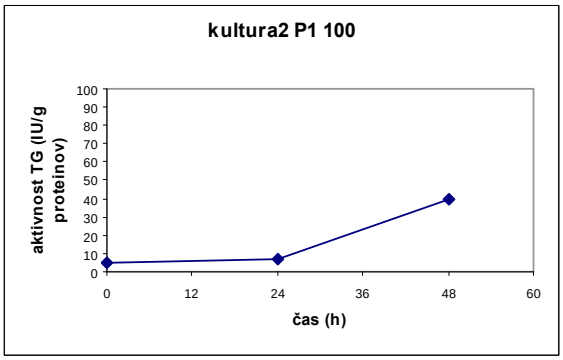
| **kultura** | **aktivnost TG (IU/g proteinov)** | | |
|---|---|---|---|
| | **t=0h** | **t=24h** | **t=48h** |
| 1* | 0,00 | 4,59 | 48,12 |
| 2 | 4,72 | 7,16 | 39,32 |
| 3 | 5,97 | 7,20 | 22,02 |
| 4 | 0,00 | 10,75 | 38,41 |
| 5 | 15,48 | 19,55 | 78,24 |
| 6 | 5,19 | 12,48 | 80,21 |
| $\overline{X} \pm$ SD | 5,23 ± 5,67 | 10,29 ± 5,34 | 51,05 ± 23,40 |
| $\overline{X} \pm$ SD ( kulture 2-6) | **6,27** ± 5,65 | **11,43** ± 5,09 | **51,64** ± 26,11 |

* okužena kultura

**Graf 2:** Spreminjanje aktivnosti transglutaminaze v kulturi 1 med kultiviranjem s P1 100.

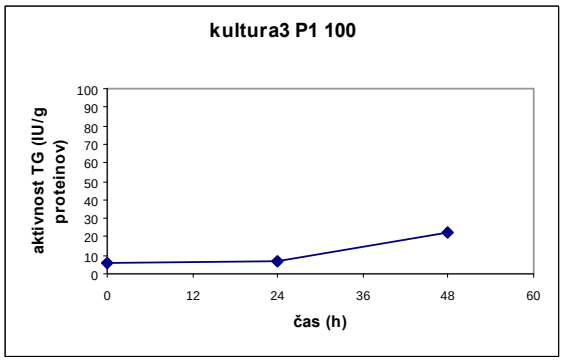



**Graf 3:** Spreminjanje aktivnosti transglutaminaze v kulturi 2 med kultiviranjem s P1 100.

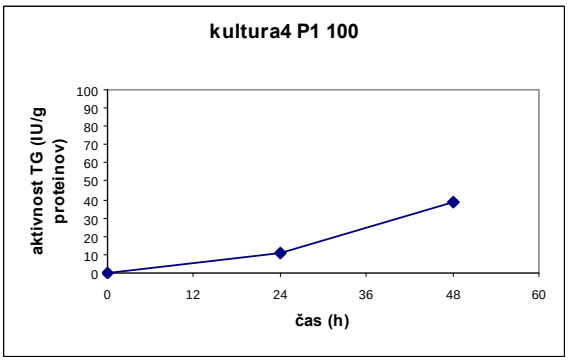



* okužena kultura

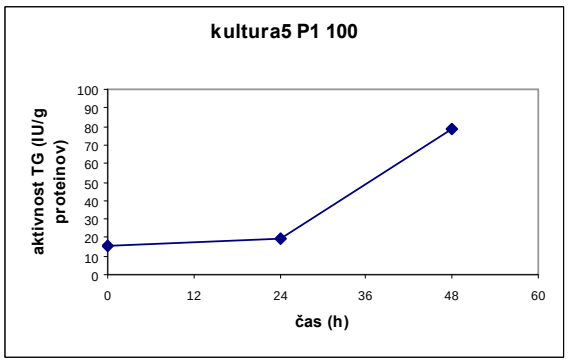
**Graf 4:** Spreminjanje aktivnosti transglutaminaze v kulturi 3 med kultiviranjem s P1 100.



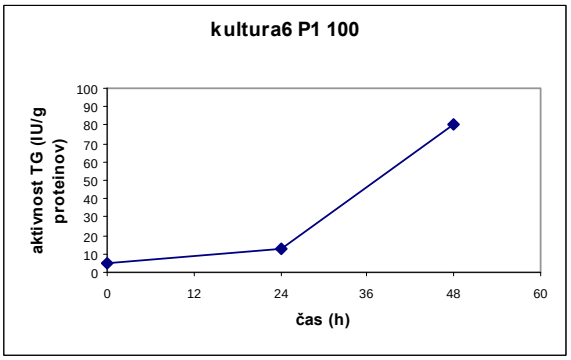

**Graf 5:** Spreminjanje aktivnosti transglutaminaze v kulturi 4 med kultiviranjem s P1 100.




**Graf 6:** Spreminjanje aktivnosti transglutaminaze v kulturi 5 med kultiviranjem s P1 100.

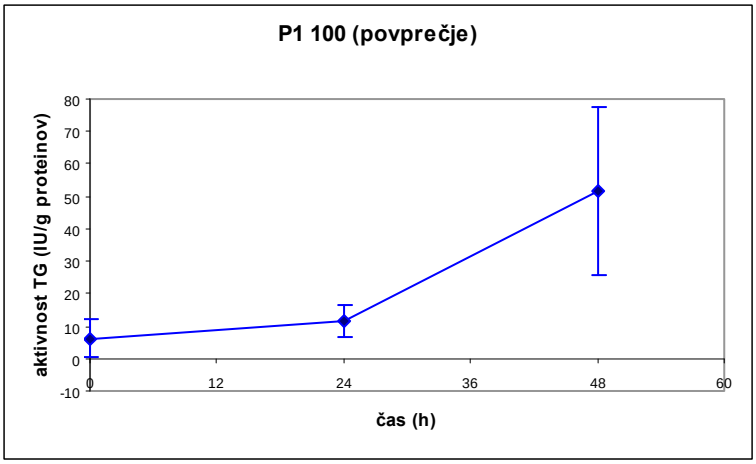



**Graf 7:** Spreminjanje aktivnosti transglutaminaze v kulturi 6 med kultiviranjem s P1 100.



Če rezultate spreminjanja aktivnosti tkivne transglutaminaze v posameznih kulturah (2-6) združimo, dobimo povprečno spreminjanje aktivnosti transglutaminaze med kultiviranjem s peptidom P1 100 (graf 8). Ker je bila kultura 1 okužena, je nismo upoštevali pri računanju povprečne vrednosti.

**Graf 8:** Povprečno spreminjanje aktivnosti transglutaminaze med kultiviranjem s P1 100.




Iz grafov 2-7 je razvidno, da se izmerjene aktivnosti transglutaminaze med posameznimi kulturami razlikujejo, verjetno zaradi individualne biološke variabilnosti med posameznimi kulturami celic. Največje odstopanje je pri kulturi 5, ki ob vseh časih daje rahlo višje vrednosti od ostalih kultur. Vendar pa je iz grafov razvidno, da je trend spreminjanja aktivnosti transglutaminaze pri vseh petih kulturah enak. Encimska aktivnost je ob času t=0h minimalna ali je celo enaka nič, po 24 urah aktivnost le rahlo naraste in po 48 urah doseže maksimalno vrednost.

Tak trend nam prav tako prikazuje graf povprečnih vrednosti spreminjanja aktivnosti transglutaminaze med kultiviranjem s P1 100 (graf 8). Tu ob času t=0h dobimo minimalno encimsko aktivnost (6,27 IU/g proteinov), nato je po času 24 ur vrednost približno dvakrat večja (11,43 IU/g proteinov) in po času 48 ur skoraj devetkrat večja (51,64 IU/g proteinov).

Podatke smo nato obdelali tudi s statističnim programom SPSS (parni t-test). Ugotavljali smo, če encimska aktivnost v 24 oziroma 48 urah statistično značilno naraste ($p<0,05$). Po obdelavi podatkov smo po 24 urah dobili vrednost $p=0,041$ ter po 48 urah $p=0,012$. Zato lahko rečemo, da je encimska aktivnost že po 24 urah statistično značilno narasla.

### 4.2.2 Peptid 1 – koncentracija 200 µg/mL

Izmerjene vrednosti koncentracije proteinov in specifične aktivnosti tkivne transglutaminaze za vseh šest kultur med kultiviranjem s peptidom P1 200 nam prikazujeta preglednici X in XI.

Spreminjanje aktivnosti tkivne transglutaminaze v posameznih kulturah med kultiviranjem s peptidom P1 200 prikazujejo grafi 9-14.

**Preglednica X:** Koncentracije proteinov v kulturah med kultiviranjem s P1 200.

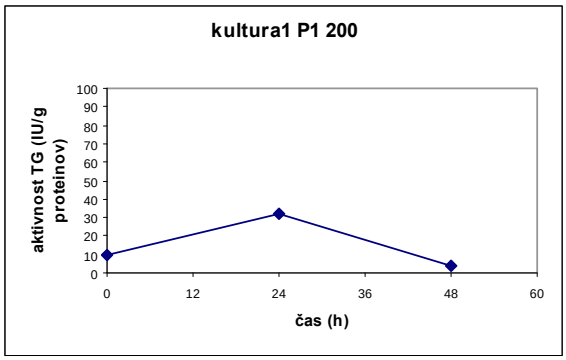
| **kultura** | **koncentracija proteinov (g/L)** | | |
|---|---|---|---|
| | **t=0h** | **t=24h** | **t=48h** |
| 1* | 0,01696 | 0,02412 | 0,02233 |
| 2 | 0,01516 | 0,01516 | 0,01516 |
| 3 | 0,02233 | 0,01696 | 0,01696 |
| 4 | 0,01875 | 0,02233 | 0,01696 |
| 5 | 0,01875 | 0,02412 | 0,02950 |
| 6 | 0,02054 | 0,02054 | 0,01875 |
| $\overline{X}$ ± SD | 0,01875 ± 0,002534 | 0,02054 ± 0,003758 | 0,01994 ± 0,005275 |

**Preglednica XI:** Specifične aktivnosti tkivne transglutaminaze v kulturah med kultiviranjem s P1 200.

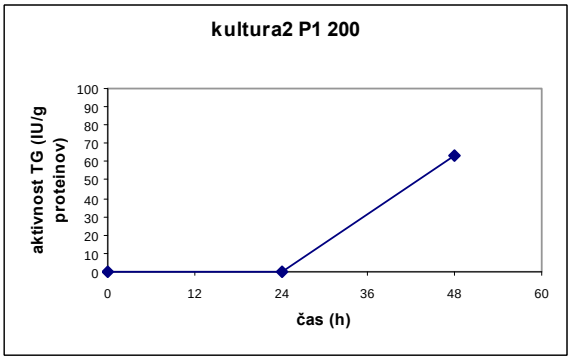
| **kultura** | **aktivnost TG (IU/g proteinov)** | | |
|---|---|---|---|
| | **t=0h** | **t=24h** | **t=48h** |
| 1* | 9,44 | 32,06 | 3,58 |
| 2 | 0,00 | 0,00 | 63,31 |
| 3 | 0,00 | 4,72 | 11,01 |
| 4 | 0,00 | 0,00 | 75,50 |
| 5 | 2,84 | 0,00 | 36,16 |
| 6 | 0,00 | 0,00 | 28,45 |
| $\overline{X}$ ± SD | 2,05 ± 3,80 | 6,13 ± 12,84 | 36,34 ± 28,42 |
| $\overline{X}$ ± SD (kulture 2-6) | **0,75** ± 1,27 | **0,94** ± 2,11 | **42,89** ± 26,22 |

* okužena kultura

**Graf 9:** Spreminjanje aktivnosti transglutaminaze v kulturi 1 med kultiviranjem s P1 200.

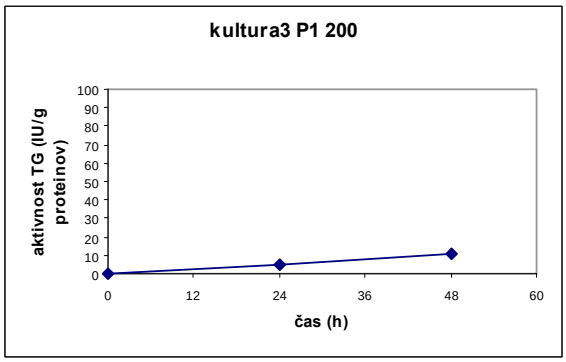



**Graf 10:** Spreminjanje aktivnosti transglutaminaze v kulturi 2 med kultiviranjem s P1 200.

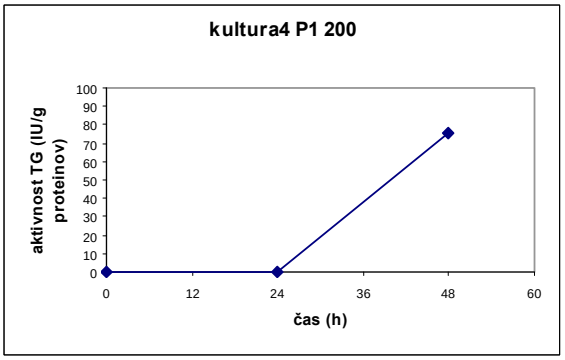



* okužena kultura

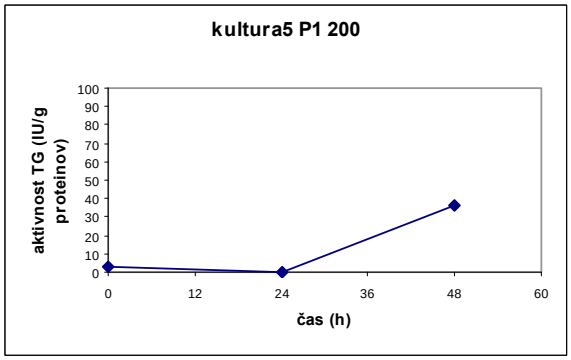
**Graf 11:** Spreminjanje aktivnosti transglutaminaze v kulturi 3 med kultiviranjem s P1 200.



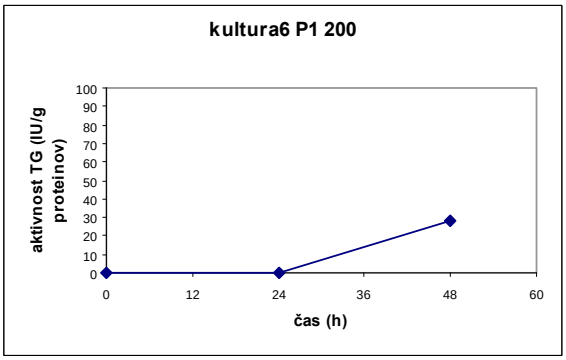

**Graf 12:** Spreminjanje aktivnosti transglutaminaze v kulturi 4 med kultiviranjem s P1 200.




**Graf 13:** Spreminjanje aktivnosti transglutaminaze v kulturi 5 med kultiviranjem s P1 200.

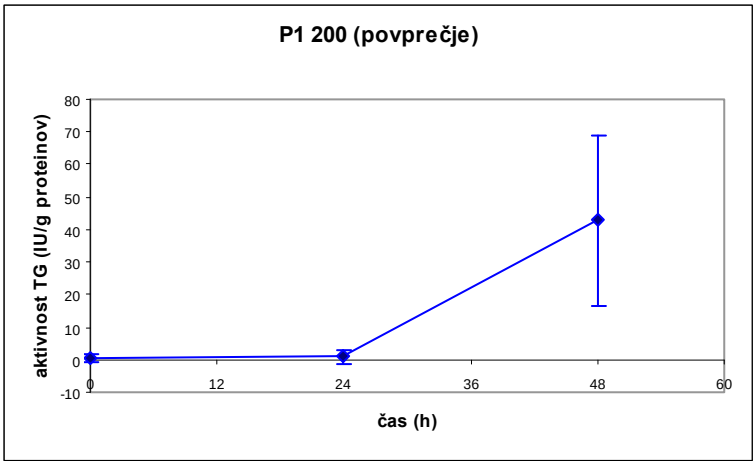



**Graf 14:** Spreminjanje aktivnosti transglutaminaze v kulturi 6 med kultiviranjem s P1 200.



Če rezultate spreminjanja aktivnosti tkivne transglutaminaze v posameznih kulturah (2-6) združimo, dobimo povprečno spreminjanje aktivnosti transglutaminaze med kultiviranjem s peptidom P1 200 (graf 15). Ker je bila kultura 1 okužena, je nismo upoštevali pri računanju povprečne vrednosti.

**Graf 15:** Povprečno spreminjanje aktivnosti transglutaminaze med kultiviranjem s P1 200.




Grafi 9-14 nam prikazujejo spreminjanje aktivnosti transglutaminaze med kultiviranjem s P1 v večji koncentraciji (200 µg/mL). Tudi tu je že iz grafov razvidno, da se aktivnosti transglutaminaze med posameznimi kulturami razlikujejo, verjetno zaradi individualne biološke variabilnosti med posameznimi kulturami celic. Od vseh šestih kultur nam odstopa le kultura 1, ki pa je bila okužena in smo jo izključili pri računanju povprečja. Iz ostalih grafov je razvidno, da je trend spreminjanja aktivnosti transglutaminaze pri ostalih petih kulturah enak. Prav tako kot pri kultiviranju s P1 v nižji koncentraciji (100 µg/mL) je tudi tu encimska aktivnost ob času t=0h minimalna ali je celo enaka nič, po 24 urah pri koncentraciji 200 µg/mL aktivnost le rahlo naraste in po 48 urah doseže maksimalno vrednost.

Tak trend nam podaja tudi graf povprečnih vrednosti spreminjanja aktivnosti transglutaminaze med kultiviranjem s P1 200 (graf 15). Tu dobimo ob času t=0h minimalno encimsko aktivnost (0,75 IU/g proteinov), po 24 urah se skoraj ne spremeni (0,94 IU/g proteinov) in nato po 48 urah močno naraste (42,89 IU/g proteinov).

Podatke smo nato obdelali tudi s statističnim programom SPSS (parni t-test). Ugotavljali smo, če encimska aktivnost v 24 oziroma 48 urah statistično značilno naraste ($p<0,05$). Po obdelavi podatkov smo po 24 urah dobili vrednost $p=0,773$ ter po 48 urah $p=0,023$. Zato

lahko rečemo, da je encimska aktivnost pri koncentraciji 200 µg/mL šele po 48 urah statistično značilno narasla.

### 4.2.3 Peptid 2 – koncentracija 100 µg/mL

Izmerjene vrednosti koncentracije proteinov in specifične aktivnosti tkivne transglutaminaze za vseh šest kultur med kultiviranjem s peptidom P2 100 nam prikazujeta preglednici XII in XIII.

Spreminjanje aktivnosti tkivne transglutaminaze v posameznih kulturah med kultiviranjem s peptidom P2 100 prikazujejo grafi 16-21.

**Preglednica XII:** Koncentracije proteinov v kulturah med kultiviranjem s P2 100.

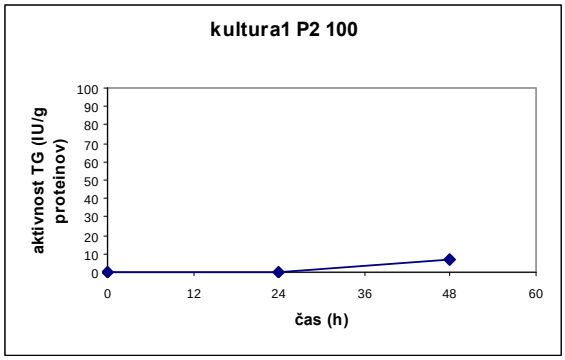
| **kultura** | **koncentracija proteinov (g/L)** | | |
|---|---|---|---|
| | **t=0h** | **t=24h** | **t=48h** |
| 1* | 0,02054 | 0,03309 | 0,02054 |
| 2 | 0,02054 | 0,01875 | 0,01516 |
| 3 | 0,03667 | 0,02412 | 0,01696 |
| 4 | 0,02412 | 0,02950 | 0,01875 |
| 5 | 0,02233 | 0,04563 | 0,02233 |
| 6 | 0,02412 | 0,02412 | 0,01696 |
| $\overline{X} \pm SD$ | 0,02472 ± 0,006069 | 0,02920 ± 0,009444 | 0,01845 ± 0,002637 |

**Preglednica XIII:** Specifične aktivnosti tkivne transglutaminaze v kulturah med kultiviranjem s P2 100.

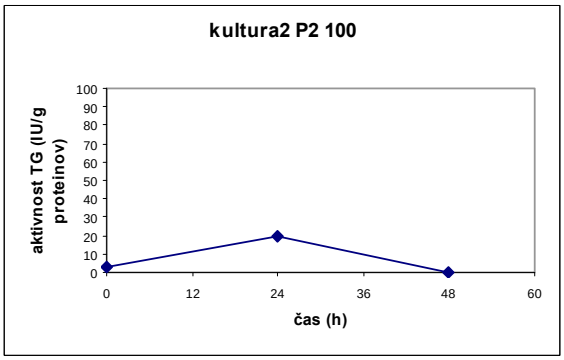
| **kultura** | **aktivnost TG (IU/g proteinov)** | | |
|---|---|---|---|
| | **t=0h** | **t=24h** | **t=48h** |
| 1* | 0,00 | 0,00 | 6,49 |
| 2 | 2,60 | 19,91 | 0,00 |
| 3 | 18,91 | 13,27 | 0,00 |
| 4 | 23,21 | 25,31 | 1,42 |
| 5 | 9,55 | 11,69 | 29,85 |
| 6 | 27,64 | 98,38 | 40,89 |
| $\overline{X} \pm SD$ | 13,65 ± 11,31 | 28,09 ± 35,48 | 13,11 ± 17,75 |
| $\overline{X} \pm SD$ (kulture 2-6) | **16,38** ± 10,20 | **33,71** ± 36,56 | **14,43** ± 19,52 |

* okužena kultura

**Graf 16:** Spreminjanje aktivnosti transglutaminaze v kulturi 1 med kultiviranjem s P2 100.

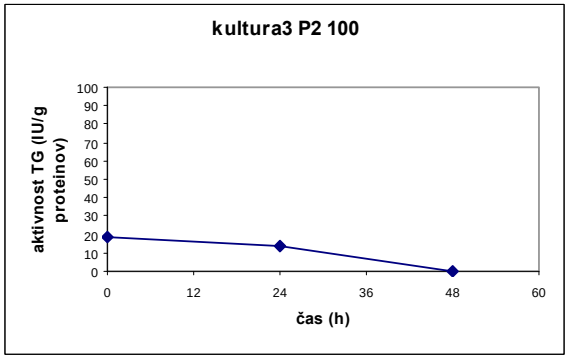



**Graf 17:** Spreminjanje aktivnosti transglutaminaze v kulturi 2 med kultiviranjem s P2 100.

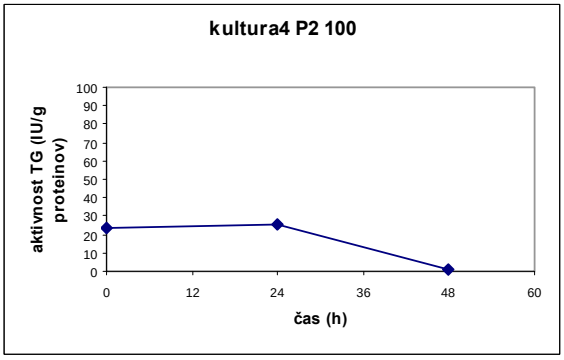



* okužena kultura

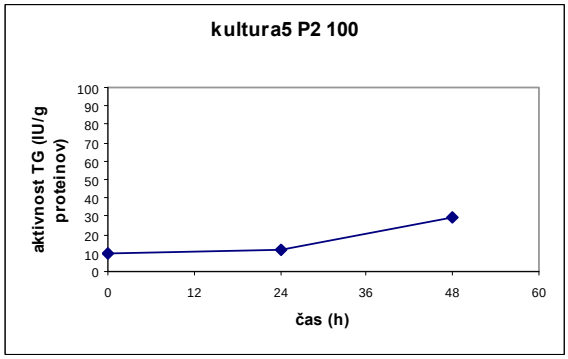
**Graf 18:** Spreminjanje aktivnosti transglutaminaze v kulturi 3 med kultiviranjem s P2 100.



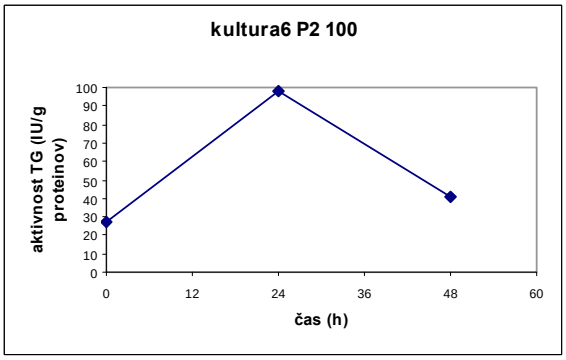

**Graf 19:** Spreminjanje aktivnosti transglutaminaze v kulturi 4 med kultiviranjem s P2 100.




**Graf 20:** Spreminjanje aktivnosti transglutaminaze v kulturi 5 med kultiviranjem s P2 100.

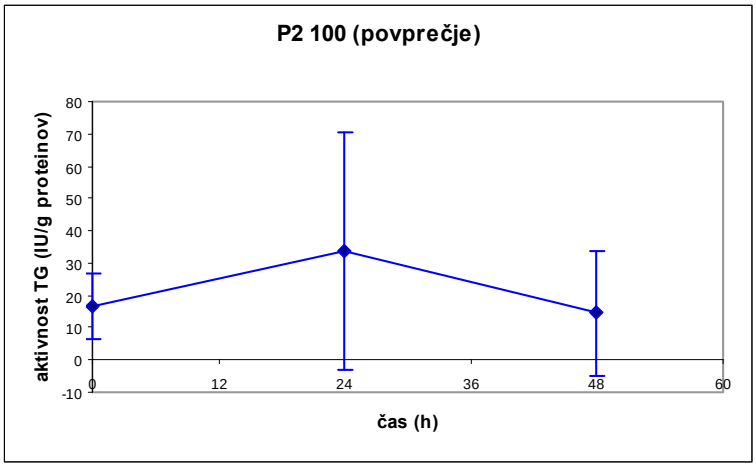



**Graf 21:** Spreminjanje aktivnosti transglutaminaze v kulturi 6 med kultiviranjem s P2 100.



Če rezultate spreminjanja aktivnosti tkivne transglutaminaze v posameznih kulturah (2-6) združimo, dobimo povprečno spreminjanje aktivnosti transglutaminaze med kultiviranjem s peptidom P2 100 (graf 22). Ker je bila kultura 1 okužena, je nismo upoštevali pri računanju povprečne vrednosti.

**Graf 22:** Povprečno spreminjanje aktivnosti transglutaminaze med kultiviranjem s P2 100.




Iz grafov 16-21 je razvidno, da se aktivnosti transglutaminaze med posameznimi kulturami razlikujejo, verjetno zaradi individualne biološke variabilnosti med posameznimi kulturami celic. Od vseh šestih kultur pa nam zelo odstopa le kultura 6, ki daje ob vseh časih precej višje vrednosti. Ugotovili smo tudi zelo velike razlike v paralelkah pri merjenju absorbance pri tej kulturi. Izgleda, da peptid P2 pri nižji koncentraciji nima enakega vpliva na enterocite kot P1, oziroma je individualna dovzetnost precej različna.

Iz grafa povprečnih vrednosti spreminjanja aktivnosti transglutaminaze med kultiviranjem s P2 100 (graf 22) je vidno, da ne prihaja do bistvenih sprememb v aktivnosti transglutaminaze. Encimska aktivnost je ob času t=0h minimalna (16,38 IU/g proteinov), nato po 24 urah rahlo naraste (33,71 IU/g proteinov) in po 48 urah spet pade (14,43 IU/g proteinov).

Podatke smo nato obdelali tudi s statističnim programom SPSS (parni t-test). Ugotavljali smo, če encimska aktivnost v 24 oziroma 48 urah statistično značilno naraste ($p<0,05$). Po obdelavi podatkov smo po 24 urah dobili vrednost $p=0,279$ ter po 48 urah $p=0,828$. Zato lahko rečemo, da encimska aktivnost po 24 urah ni statistično značilno narasla, niti ni značilno narasla po 48 urah.

### 4.2.4 Peptid 2 – koncentracija 200 µg/mL

Izmerjene vrednosti koncentracije proteinov in specifične aktivnosti tkivne transglutaminaze za vseh šest kultur med kultiviranjem s peptidom P2 200 nam prikazujeta preglednici XIV in XV.

Spreminjanje aktivnosti tkivne transglutaminaze v posameznih kulturah med kultiviranjem s peptidom P2 200 prikazujejo grafi 23-28.

**Preglednica XIV:** Koncentracije proteinov v kulturah med kultiviranjem s P2 200.

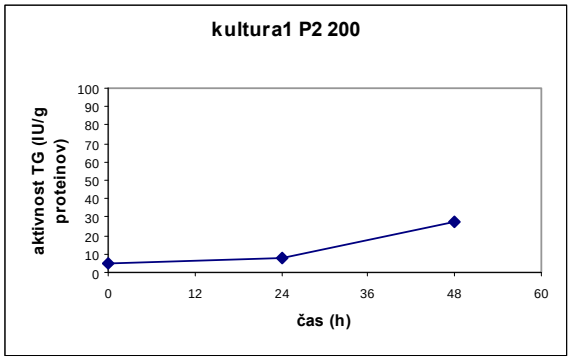
| **kultura** | **koncentracija proteinov (g/L)** | | |
|---|---|---|---|
| | **t=0h** | **t=24h** | **t=48h** |
| 1* | 0,01516 | 0,04384 | 0,02412 |
| 2 | 0,01337 | 0,01875 | 0,01696 |
| 3 | 0,02054 | 0,02412 | 0,01875 |
| 4 | 0,02771 | 0,01875 | 0,01875 |
| 5 | 0,02233 | 0,02054 | 0,01696 |
| 6 | 0,03129 | 0,01875 | 0,01516 |
| $\overline{X}$ ± SD | 0,02173 ± 0,006957 | 0,02413 ± 0,009881 | 0,01845 ± 0,003085 |

**Preglednica XV:** Specifične aktivnosti tkivne transglutaminaze v kulturah med kultiviranjem s P2 200.

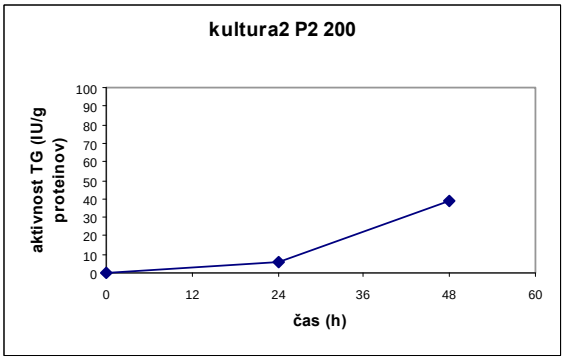
| **kultura** | **aktivnost TG (IU/g proteinov)** | | |
|---|---|---|---|
| | **t=0h** | **t=24h** | **t=48h** |
| 1* | 5,28 | 7,91 | 27,64 |
| 2 | 0,00 | 5,69 | 39,32 |
| 3 | 0,00 | 2,21 | 25,60 |
| 4 | 0,00 | 11,38 | 28,45 |
| 5 | 13,14 | 46,74 | 31,46 |
| 6 | 2,56 | 9,96 | 7,03 |
| $\overline{X}$ ± SD | 3,50 ± 5,17 | 13,98 ± 16,37 | 26,58 ± 10,71 |
| $\overline{X}$ ± SD (kulture 2-6) | **3,14** ± 5,70 | **15,20** ± 18,00 | **26,37** ± 11,96 |

* okužena kultura

**Graf 23:** Spreminjanje aktivnosti transglutaminaze v kulturi 1 med kultiviranjem s P2 200.

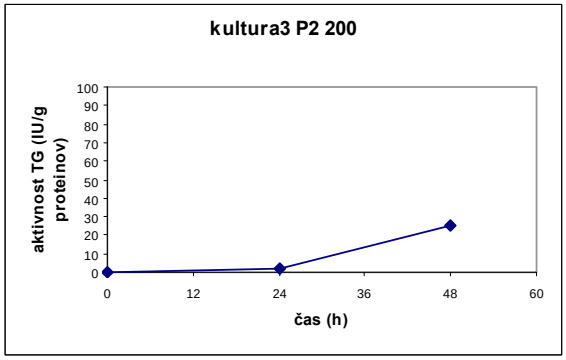



**Graf 24:** Spreminjanje aktivnosti transglutaminaze v kulturi 2 med kultiviranjem s P2 200.

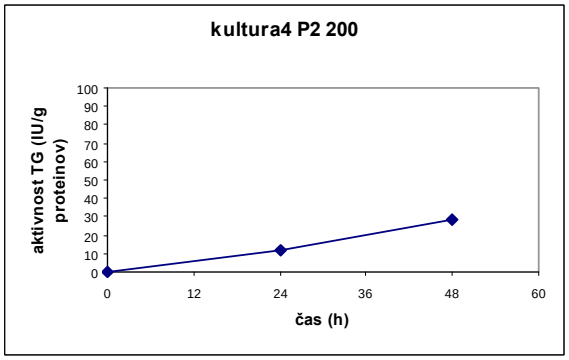



* okužena kultura

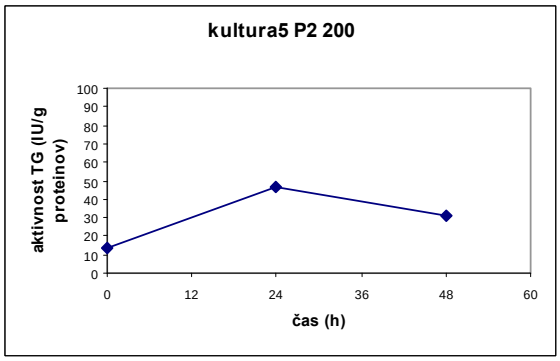
**Graf 25:** Spreminjanje aktivnosti transglutaminaze v kulturi 3 med kultiviranjem s P2 200.



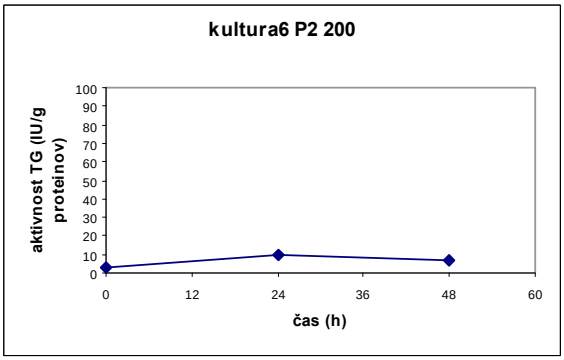

**Graf 26:** Spreminjanje aktivnosti transglutaminaze v kulturi 4 med kultiviranjem s P2 200.




**Graf 27:** Spreminjanje aktivnosti transglutaminaze v kulturi 5 med kultiviranjem s P2 200.

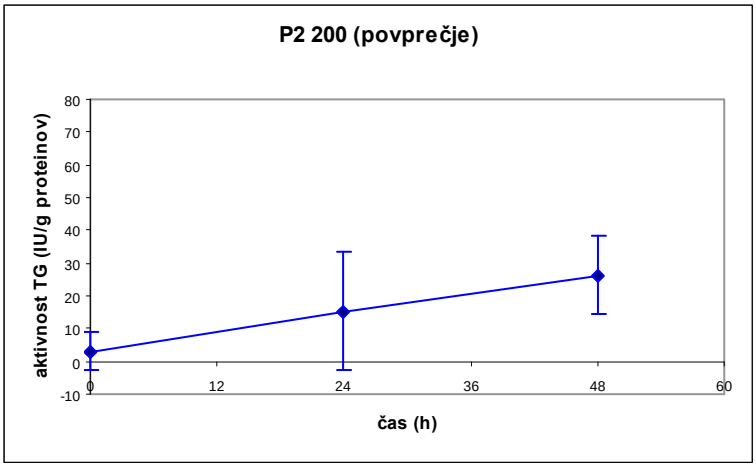



**Graf 28:** Spreminjanje aktivnosti transglutaminaze v kulturi 6 med kultiviranjem s P2 200.



Če rezultate spreminjanja aktivnosti tkivne transglutaminaze v posameznih kulturah (2-6) združimo, dobimo povprečno spreminjanje aktivnosti transglutaminaze med kultiviranjem s peptidom P2 200 (graf 29). Ker je bila kultura 1 okužena, je nismo upoštevali pri računanju povprečne vrednosti.

**Graf 29:** Povprečno spreminjanje aktivnosti transglutaminaze med kultiviranjem s P2 200.




Grafi 23-28 nam prikazujejo spreminjanje aktivnosti transglutaminaze med kultiviranjem s P2 v večji koncentraciji (200 µg/mL). Tudi tu je že iz grafov vidno, da se aktivnosti med posameznimi kulturami rahlo razlikujejo, verjetno zaradi individualne biološke variabilnosti med posameznimi kulturami celic. Največje odstopanje je pri kulturi 5, ki daje nekoliko višje vrednosti od ostalih petih kultur. Nekaj odstopanja je tudi pri kulturi 6, kjer se encimska aktivnost tudi po 48 urah bistveno ne zviša. Kljub temu pa je trend spreminjanja aktivnosti transglutaminaze pri ostalih kulturah enak. Encimska aktivnost je ob času t=0h minimalna ali celo enaka nič, po 24 urah aktivnost le rahlo naraste in po 48 urah doseže maksimalno vrednost.

Tak trend nam prav tako prikazuje graf povprečnih vrednosti spreminjanja aktivnosti transglutaminaze med kultiviranjem s P2 200 (graf 29). Tu ob času t=0h dobimo minimalno encimsko aktivnost (3,14 IU/g proteinov), nato je po času 24 ur vrednost približno petkrat večja (15,20 IU/g proteinov) in po času 48 ur približno osemkrat večja (26,37 IU/g proteinov).

Podatke smo nato obdelali tudi s statističnim programom SPSS (parni t-test). Ugotavljali smo, če encimska aktivnost v 24 oziroma 48 urah statistično značilno naraste ($p<0,05$). Po obdelavi podatkov smo po 24 urah dobili vrednost $p=0,097$ ter po 48 urah $p=0,016$. Zato lahko rečemo, da je encimska aktivnost šele po 48 urah statistično značilno narasla.

Ob času t=0h smo določali aktivnost transglutaminaze tudi v kulturi brez peptidov. Izmerjene vrednosti koncentracije proteinov in specifične aktivnosti tkivne transglutaminaze za vseh šest kultur prikazuje preglednica XVI. Tudi tu so opazne velike razlike v encimski aktivnosti med posameznimi kulturami. Iz izmerjenih vrednosti vidimo, da lahko tudi v kulturah brez peptidov že ob samem začetku kultiviranja določimo neko minimalno encimsko aktivnost.

**Preglednica XVI:** Koncentracije proteinov in specifične aktivnosti tkivne transglutaminaze v kulturah med kultiviranjem brez peptidov ob času t=0h.

| **kultura** | **koncentracija proteinov (g/L)** | **aktivnost TG (IU/g proteinov)** |
|---|---|---|
| | **t=0h** | **t=0h** |
| 1 | 0,01337 | 11,97 |
| 2 | 0,01337 | 0,00 |
| 3 | 0,02233 | 0,00 |
| 4 | 0,01875 | 5,69 |
| 5 | 0,01696 | 12,58 |
| 6 | 0,01696 | 0,00 |
| $\overline{X} \pm SD$ | 0,01696 ± 0,003401 | **5,04 ± 6,03** |

Če povzamemo rezultate, je pri ***peptidu P1*** pri obeh koncentracijah (P1 100 in P1 200) viden enak trend naraščanja encimske aktivnosti v času 48 ur (pri P1 100 statistično značilno naraste že po 24 urah, pri P1 200 pa šele po 48 urah). Na osnovi teh rezultatov bi lahko sklepali, da ima peptid P1 značilen vpliv na mišje enterocite preko povišane aktivnosti transglutaminaze v 48 urah.

Pri ***peptidu P2*** 100 smo opazili precej drugačne mehanizme odziva kot pri peptidu P1. Tu se aktivnost transglutaminaze tekom 48 ur skoraj ne spreminja, ampak pride le do rahlega nihanja encimske aktivnosti. Sklepamo, da peptid P2 100 ni imel značilnega vpliva na naraščanje aktivnosti transglutaminaze. Peptid P2 bi morda lahko celo zaviral aktivnost transglutaminaze. Pri P2 v večji koncentraciji (P2 200) pa je zopet razvidno, da encimska aktivnost v 48 urah v povprečju značilno naraste. Vendar pa to naraščanje ni tako izrazito kot pri peptidu P1. Dve kulturi (5 in 6) pri P2 200 pa dajeta podobne rezultate kot povprečje pri P2 100. V primeru P2 so vidne tudi zelo velike individualne razlike med posameznimi aktivnostmi transglutaminaze. Velike razlike pa se pojavljajo, ker smo s postopkom izolacije pridobili zelo heterogeno kulturo. Encim transglutaminazo pa naj bi izražale samo zrele diferencirane epitelijske celice.

Iz dobljenih rezultatov bi lahko sklepali, da peptid P2 ne deluje toksično na mišje enterocite. Čeprav ne bi mogli z gotovostjo to potrditi, saj se je aktivnost transglutaminaze pri P2 200 v povprečju po 48 urah zvišala (sicer to naraščanje ni tako izrazito kot pri peptidu P1).

Za dobro primerjavo rezultatov pa bi seveda morali spremljati aktivnost encima tudi med kultiviranjem brez peptidov v obdobju 48 ur, da bi dobili neko ustrezno kontrolo, kar pa nismo uspeli izvesti zaradi premajhnega števila izoliranih celic (samo $10^5$/mL).

## 4.3 Spremljanje celične živosti med kultiviranjem z gliadinskimi peptidi

Ob začetku (t=0h) in ob koncu kultiviranja (t=48h) smo spremljali tudi celično živost (viabilnost) z MultiTox-Fluor Multiplex testom citotoksičnosti. Živost smo spremljali v kulturah z dodanimi gliadinskimi peptidi (P1 in P2 v dveh koncentracijah) in za primerjavo tudi v kulturi brez dodanih peptidov.

V kulturah smo spremljali signale (fluorescenco) živih celic. Fluorescentni signal je proporcionalen številu živih celic v vzorcu, zato večja fluorescenca pomeni večje število živih celic oziroma večjo živost. Pri merjenju smo določili fluorescenco ob časih t=0h in t=48h, saj nas je le zanimalo spreminjanje živosti po 48 urah pod vplivom peptidov. Rezultate smo nato podali kot padec ali porast živosti v odstotkih glede na začetno stanje (začetek kultiviranja). Rezultate spremljanja celične živosti smo prikazali v obliki preglednic.

Od vseh kultur nam je močno odstopala le kultura 1, ki je skoraj v vseh primerih dajala povišano celično živost glede na začetno stanje. Kultura 1 je bila okužena (barva medija je bila rahlo rumena in se je močno razlikovala od ostalih kultur, kjer je medij rožnate barve) in verjetno je zaradi te okužbe živost skoraj v vseh primerih pri kulturi 1 tako narasla. Prav zato je nismo upoštevali pri računanju povprečja, saj bi bakterije lahko lažno povečale število živih celic.

Izmerjene vrednosti fluorescence in rezultate spremljanja celične živosti v kulturah brez dodanih gliadinskih peptidov nam prikazuje preglednica XVII, rezultate med kultiviranjem s peptidom 1 (P1 100 in P1 200) nam prikazujeta preglednici XVIII in XIX ter rezultate med kultiviranjem s peptidom 2 (P2 100 in P2 200) preglednici XX in XXI.

### 4.3.1 Kulture brez peptidov

**Preglednica XVII:** Rezultati spremljanja celične živosti med kultiviranjem brez peptidov.

| kultura | F* | | padec/porast živosti (%) |
|---|---|---|---|
| | t=0h | t=48h | |
| 1** | 368,5 | 480,5 | + 30,4 |
| 2 | 269,0 | 207,5 | - 22,9 |
| 3 | 806,0 | 706,5 | - 12,3 |
| 4 | 664,5 | 570,5 | - 14,1 |
| 5 | 797,0 | 763,5 | - 4,2 |
| 6 | 511,0 | 386,5 | - 24,4 |
| $\overline{X} \pm SD$ | 569,3 ± 224,0 | 519,2 ± 206,7 | / |
| $\overline{X} \pm SD$ (kulture 2-6) | 609,5 ± 225,0 | 526,9 ± 230,1 | **- 15,6** ± 8,3 |

* izmerjena fluorescenca (F), zmanjšana za F slepega vzorca
** okužena kultura

Iz dobljenih rezultatov kultur 2-6 med kultiviranjem brez gliadinskih peptidov je razvidno, da pride tudi pri teh pogojih že do spontanega propadanja enterocitov med kultiviranjem v času 48 ur. V povprečju smo zabeležili padec celične živosti za 15,6 %. Opazna pa so tudi rahla nihanja v padcu živosti med posameznimi kulturami, kar je zopet posledica individualnih razlik med posameznimi kulturami celic.

### 4.3.2 Kulture s peptidi (P1 in P2)

**Preglednica XVIII:** Rezultati spremljanja celične živosti med kultiviranjem s P1 100.

| kultura | F* | | padec/porast živosti (%) |
|---|---|---|---|
| | t=0h | t=48h | |
| 1** | 304,0 | 334,5 | + 10,0 |
| 2 | 95,0 | 152,5 | + 60,5 |
| 3 | 599,5 | 535,5 | - 10,7 |
| 4 | 559,0 | 435,5 | - 22,1 |
| 5 | 622,0 | 471,5 | - 24,2 |
| 6 | 365,5 | 175,5 | - 52,0 |
| $\overline{X} \pm SD$ | 424,2 ± 207,0 | 350,8 ± 158,9 | / |
| $\overline{X} \pm SD$ (kulture 2-6) | 448,2 ± 221,9 | 354,1 ± 177,4 | **- 9,7** ± 42,1 |

* izmerjena fluorescenca (F), zmanjšana za F slepega vzorca
** okužena kultura

**Preglednica XIX:** Rezultati spremljanja celične živosti med kultiviranjem s P1 200.

| kultura | F* | | padec/porast živosti (%) |
|---|---|---|---|
| | t=0h | t=48h | |
| 1** | 216,0 | 486,5 | + 125,2 |
| 2 | 168,0 | 175,5 | + 4,5 |
| 3 | 595,0 | 451,5 | - 24,1 |
| 4 | 443,5 | 461,5 | + 4,1 |
| 5 | 543,0 | 399,5 | - 26,4 |
| 6 | 298,5 | 246,5 | - 17,4 |
| $\overline{X} \pm SD$ | 377,3 ± 176,2 | 370,2 ± 128,5 | / |
| $\overline{X} \pm SD$ (kulture 2-6) | 409,6 ± 176,1 | 346,9 ± 128,7 | **- 11,9** ± 15,1 |

* izmerjena fluorescenca (F), zmanjšana za F slepega vzorca
** okužena kultura

**Preglednica XX:** Rezultati spremljanja celične živosti med kultiviranjem s P2 100.

| kultura | F* | | padec/porast živosti (%) |
|---|---|---|---|
| | t=0h | t=48h | |
| 1** | 239,0 | 452,5 | + 89,3 |
| 2 | 157,0 | 184,5 | + 17,5 |
| 3 | 567,0 | 566,5 | - 0,1 |
| 4 | 499,0 | 436,5 | - 12,5 |
| 5 | 643,5 | 484,5 | - 24,7 |
| 6 | 400,5 | 306,5 | - 23,5 |
| $\overline{X} \pm SD$ | 417,7 ± 189,8 | 405,2 ± 137,1 | / |
| $\overline{X} \pm SD$ (kulture 2-6) | 453,4 ± 188,3 | 395,7 ± 151,1 | **- 8,7** ± 17,7 |

* izmerjena fluorescenca (F), zmanjšana za F slepega vzorca
** okužena kultura

**Preglednica XXI:** Rezultati spremljanja celične živosti med kultiviranjem s P2 200.

| kultura | F* | | padec/porast živosti (%) |
|---|---|---|---|
| | t=0h | t=48h | |
| 1** | 269,0 | 247,5 | - 8,0 |
| 2 | 204,5 | 272,5 | + 33,3 |
| 3 | 669,5 | 503,5 | - 24,8 |
| 4 | 514,5 | 566,5 | + 10,1 |
| 5 | 665,0 | 515,5 | - 22,5 |
| 6 | 333,5 | 363,5 | + 4,5 |
| $\overline{X} \pm SD$ | 442,7 ± 202,4 | 411,5 ± 135,5 | / |
| $\overline{X} \pm SD$ (kulture 2-6) | 477,4 ± 205,3 | 444,3 ± 122,0 | **+ 0,12** ± 24,3 |

* izmerjena fluorescenca (F), zmanjšana za F slepega vzorca
** okužena kultura

Rezultate spremljanja celične živosti v kulturah z dodanimi gliadinskimi peptidi smo nato primerjali s kulturami, kjer teh peptidov ni bilo. Pri kultiviranju s ***peptidom P1*** smo v primeru P1 100 zabeležili povprečen padec celične živosti za 9,7 %. Od kultur 2-6 nam odstopa le kultura 2, ki pa daje kar velik porast celične živosti. V primeru P1 200 pa smo dobili povprečen padec celične živosti za 11,9 %. Odstopata le kulturi 2 in 4, ki dajeta rahlo zvišanje celične živosti. Padec živosti je v primeru peptida P1 (pri obeh koncentracijah) celo nekoliko nižji kot v kulturah brez gliadinskih peptidov, zato sklepamo, da peptid P1 ni imel direktnega negativnega vpliva na živost celic. Pri obdelavi podatkov s statističnim programom SPSS (parni t-test) smo tudi ugotovili, da med kulturami s peptidom P1 in kulturami brez peptidov ni statistično značilne razlike ($p>0,05$). Težko pa se je sklicevati le na povprečne vrednosti, saj so opazne zelo velike individualne razlike med posameznimi kulturami.

Pri drugem ***peptidu P2*** pa smo v primeru P2 100 zabeležili povprečen padec celične živosti za 8,7 %. Odstopala je le kultura 2, kjer smo zabeležili zvišanje celične živosti. V primeru P2 200 pa v povprečju celo ni prišlo do padca živosti. Do padca živosti pride le v kulturah 3 in 5. V obeh koncentracijah peptida P2 je bilo upadanje celične živosti manjše kot pri kulturah brez peptidov, zato lahko sklepamo, da tudi peptid P2 ni imel direktnega negativnega vpliva na živost celic. Pri obdelavi podatkov s statističnim programom SPSS (parni t-test) smo tudi ugotovili, da med kulturami s peptidom P2 in kulturami brez peptidov ni statistično značilne razlike ($p>0,05$). Spet pa je težko med seboj primerjati le povprečne vrednosti zaradi velikih individualnih razlik med posameznimi kulturami.

Ponekod smo v nekaterih kulturah zabeležili tudi porast celične živosti v 48 urah. To bi si sicer lahko razlagali s pozitivnim vplivom peptida P2 na živost celic in je možno, da je bila proliferacijska lastnost vzpodbujena. Razlog v povečani živosti po 48 urah pa bi bil lahko tudi v odvzemu vzorca – lahko, da smo pri drugem merjenju (t=48h) pri vzorčenju zajeli kakšen delček sluzi, v katerem je bilo ujetih več enterocitov.

Iz rezultatov aktivnosti transglutaminaze pri peptidu P1 pri obeh koncentracijah (P1 100 in P1 200) bi lahko sklepali na morebiten toksičen učinek peptida, ker se je aktivnost po 48 urah značilno zvišala. Tkivna transglutaminaza naj bi bila pod normalnimi fiziološkimi pogoji neaktivna, šele različne fizične in kemične poškodbe lahko privedejo do hitre encimske aktivacije (66). Tako si tudi razlagamo porast encimske aktivnosti v kulturah s peptidom P1 po 48 urah oziroma po 24 urah.

Spreminjanje aktivnosti transglutaminaze je bilo pri peptidu P2 (sploh pri P2 100) drugačno kot pri P1. Encimska aktivnost se pri P2 100 v roku 48 ur ni statistično značilno povišala. Iz tega bi lahko sklepali, da peptid P2 verjetno ne vpliva toksično na mišje enterocite. Nekoliko manj jasni so bili rezultati pri P2 200, kjer se je aktivnost transglutaminaze zvišala v 48 urah. So pa nekatere raziskave v zadnjih letih (62, 63) že pokazale, da bi dekapeptid P2 morda lahko imel celo protektiven učinek pri bolnikih s celiakijo. V nekaterih študijah je peptid P2 zaviral učinke toksičnih gliadinov v kulturah, če so ga inkubirali istočasno. Študija iz leta 2008 (63) pa je pokazala, da je peptid P2 sposoben celo uravnavati vnetni imunski odgovor preko premika iz Th1 (vnetni) v Th2 (protivnetni) podtip imunskega odziva.

Dobro poznavanje patogeneze bolezni je ključnega pomena tudi pri proučevanju potencialnih terapevtskih tarč. Trenutno preiskujejo številne možnosti, ki bi morebiti lahko bile alternative brezglutenske diete, ki je v praksi mnogokrat problematična za bolnike. Predlagane možnosti so na primer biotehnološko gojenje za bolnike neškodljivih vrst žit, inhibicija aktivnosti tkivne transglutaminaze, blokiranje vezave peptidov glutena na HLA-DQ2/DQ8, dodatek bakterijske prolil endopeptidaze, ki bi razgradila glutenske peptide, še preden bi dosegli tanko črevo.

# 5 SKLEPI

Etiopatogeneza celiakije kljub številnim študijam še ni v celoti pojasnjena. Znano je, da so v razvoj bolezni vpleteni tako dejavniki okolja (zaužiti gluten žitaric) kot tudi genetski dejavniki. Malo je znanega zlasti o prvih fazah bolezni, kjer pridejo gliadini in ostali peptidi glutena v stik s črevesnimi epitelijskimi celicami. Za proučevanje funkcionalnih, morfoloških in biokemijskih sprememb, ki jih povzročijo različni peptidi glutena, so celične kulture enostaven in uporaben model .

Tudi v našem raziskovalnem delu smo ocenjevali učinke dveh različnih gliadinskih peptidov P1 (p31-43) in P2 (p2-11) na kultivirane mišje črevesne epitelijske celice preko spremljanja celične živosti in aktivnosti tkivne transglutaminaze med 48-urnim kultiviranjem. Prišli smo do naslednjih ugotovitev:

- Z uporabljenim postopkom izolacije smo izolirali zelo heterogeno populacijo intestinalnih epitelijskih celic s 13 – 23 % deležem diferenciranih vilusnih enterocitov.
- Gliadinska peptida P1 in P2 nimata opaznega vpliva na morfologijo enterocitov. Kulture s peptidi in brez njih se pri mikroskopiranju niso razlikovale med seboj. Nekatere celice so se med kultiviranjem deformirale v vseh kulturah in izkazovale lastnosti apoptotičnih celic (zgoščena citoplazma, skrčeno jedro…).
- Gliadinska peptida P1 in P2 nimata direktnega negativnega vpliva na živost črevesnih epitelijskih celic. Tudi v kulturah brez peptidov pride do spontanega upadanja celične živosti v času 48 ur. Med kulturami s peptidi in brez njih v padcu celične živosti ni statistično značilne razlike.
- Encimska aktivnost transglutaminaze se v primeru peptida P1 statistično značilno zviša v 48 urah pri obeh koncentracijah (P1 100 in P1 200). Iz rezultatov bi lahko sklepali na morebiten toksičen učinek peptida P1. Aktivnost transglutaminaze je morebiti odziv na učinek uporabljenega gliadinskega peptida, saj naj bi bila tvorba encima pospešena pri celicah, podvrženih celični smrti.
- Pri peptidu P2 v nižji koncentraciji (P2 100) se encimska aktivnost v 48 urah ne zviša statistično značilno. Iz rezultatov povprečja bi lahko sklepali, da peptid P2 ne deluje toksično, morebiti celo zavira aktivnost transglutaminaze. Pri P2 200 rezultati niso tako jasni, saj v povprečju encimska aktivnost v 48 urah značilno naraste (čeprav ne tako izrazito kot v primeru P1).

Namen raziskovalne naloge je bil dosežen, čeprav rezultati predstavljajo le delček pri razumevanju etiopatogeneze celiakije. Izsledki našega dela so pomembni za nadaljnje proučevanje mehanizma toksičnosti gliadinskih peptidov na epitelijske celice pri bolnikih s celiakijo.

# 6 LITERATURA


1. Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D: Interna medicina, 3. izdaja, Littera picta, Ljubljana, 2005: 493-496
2. Petrovič D, Zorc M: Histologija – učbenik, Inštitut za histologijo in embriologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2005: 173-178
3. Zorc Pleskovič R, Gošnak Dahmane R, Milutinović Živin A: Histologija, 1. izdaja, Univerza v Ljubljani, Visoka šola za zdravstvo, Ljubljana, 2006: 45-47
4. The Biology Of The Digestive Tract. http://www.abpi.org.uk/publications/publication_details/targetCrohns/biology.asp (30. 6. 2008)
5. Villi, Crypts and the Life Cycle of Small Intestinal Enterocytes. http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/smallgut/lifecycle.html (30. 6. 2008)
6. Simon-Assmann P, Turck N, Sidhoum-Jenny M, Gradwohl G, Kedinger M: In vitro models of intestinal epithelial cell differentiation. Cell Biol Toxicol 2007; 23: 241-256
7. Perreault N, Beaulieu J-F: Primary Cultures of Fully Differentiated and Pure Human Intestinal Epithelial Cells. EXPERIMENTAL CELL RESEARCH 1998; 245, 34-42
8. Traber PG: Differentiation of intestinal epithelial cells: Lessons from the study of intestine-specific gene expression. J Lab Clin Med 1994; 123, 467-477
9. Potten CS: Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 1998; 353, 821-830
10. Hardman CM, Garioch JJ, Leonard JN, Thomas HJW, Walker MM, Lortan JE, Lister A, Fry L: Absence of toxicity of oats in patients with dermatitis herpetiformis. The New England Journal of Medicine 1997; 337 (26): 1884-1887
11. Fasano A, Shea-Donohue T: Mechanisms of Disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. GASTROENTEROLOGY & HEPATOLOGY 2005; 2(9): 416-422
12. Tight junction. http://en.wikipedia.org/wiki/Tight_junction (18. 12. 2008)

13. Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D: Interna medicina, 3. izdaja, Littera picta, Ljubljana, 2005: 510-526
14. Mearin ML: Celiac Disease Among Children and Adolescents. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care 2007; 37: 86-105
15. Rodrigo L: Celiac disease. World J Gastroenterol 2006; 12 (41): 6585-6593
16. Hourigan CS: The molecular basis of coeliac disease. Clin Exp Med 2006; 6: 53-59
17. Dewar DH, Ciclitira PJ: Clinical Features and Diagnosis of Celiac Disease. GASTROENTEROLOGY 2005; 128: 19-24
18. Mičetić – Turk D: Celiakija nekoč in danes. Zbornik prispevkov 1. slovenskega strokovnega sestanka o celiakiji. Maribor, Slovensko društvo za celiakijo, 2002: 8-12
19. Sedmak M: Atipična celiakija. Zbornik prispevkov 1. slovenskega strokovnega sestanka o celiakiji. Maribor, Slovensko društvo za celiakijo, 2002: 13-18
20. Troncone R, Borrelli M: The clinical spectrum of celiac disease. International Coeliac Disease Meeting, Maribor, University Medical Center, 2007: 89-94
21. Holtmeier W, Caspary WF: Celiac disease. Orphanet Journal of Rare Diseases 2006; 1: 3
22. Green PHR, Jabri B: Coeliac disease. THE LANCET 2003; 362: 383-391
23. Woodward J: Coeliac disease. MEDICINE 2007; 35/4: 226-230
24. Dolinšek J, Urlep-Žužej D, Mičetić-Turk D: Sodobni principi diagnostike celiakije. Zdravstveni vestnik 2006; 75: Supl. II: 89-97
25. Dickson BC, Streutker CJ, Chetty R: Coeliac disease: an update for pathologists. J Clin Pathol 2006; 59: 1008-1016
26. Vodopivec B, Cerar A: Histopatološke spremembe pri celiakiji. Zbornik prispevkov 1. slovenskega strokovnega sestanka o celiakiji. Maribor, Slovensko društvo za celiakijo, 2002: 50-53
27. Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H: The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. European Journal of Gastroenterology & Hepatology 1999; 11: 1185-1194
28. Kagnoff MF: Overview and Pathogenesis of Celiac Disease. Gastroenterology 2005; 128: 10-18
29. Green PHR, Jabri B: Celiac Disease. Annu. Rev. Med. 2006; 57: 207-221

30. Saavalainen P: Genetics of celiac disease. International Coeliac Disease Meeting, Maribor, University Medical Center, 2007: 61-69
31. Kagnoff MF: Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. J. Clin. Invest. 2007; 117: 41-49
32. Sollid LM: Immunology of celiac disease. International Coeliac Disease Meeting, Maribor, University Medical Center, 2007: 55-59
33. Clemente MG, Virgiliis SDe, Kang JS, Macatagney R, Musu MP, Si Pierro MR, Drago S, Congia M, Fasano A: Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. Gut 2003; 52: 218-223
34. Koch V: Gluten – sestavina živil in industrijskih proizvodov. Zbornik prispevkov 1. slovenskega strokovnega sestanka o celiakiji. Maribor, Slovensko društvo za celiakijo, 2002: 70-73
35. Koning F: Toxicity of prolamins in celiac disease. International Coeliac Disease Meeting, Maribor, University Medical Center 2007: 49-54
36. Howdle PD: Gliadin, glutenin or both? The search for the Holy Grail in coeliac disease. European Journal of Gastroenterology & Hepatology 2006; 18: 703-706
37. Mamone G, Ferranti P, Rossi M, Roepstorff P, Fierro O, Malorni A, Addeo F: Identification of a peptide from α-gliadin resistant to digestive enzymes: Implication for celiac disease. Journal of Chromatography B 2007; 855: 236-241
38. Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Corazza GR: The immune recognition of gluten in coeliac disease. Clinical and Experimental Immunology 2005; 140: 408-416
39. Silano M, De Vincenzi M: In vitro screening of food peptides toxic for coeliac and other gluten – sensitive patients: a review. Toxicology 1999; 132: 99-110
40. Bethune MT, Khosla C: Parallels between Pathogens and Gluten Peptides in Celiac Sprue. PLoS Pathog 2008; 4(2): e34 doi:10.1371/journal.ppat.0040034
41. Fesus L, Piacentini M: Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. TRENDS in Biochemical Sciences 2002; 27: 534-539
42. Caputo I, D'Amato A, Troncone R, Auricchio S, Esposito C: Transglutaminase 2 in celiac disease: Minireview article. Amino Acids 2004; 26: 381-386
43. Molberg O, McAdam SN, Sollid LM: Role of Tissue Transglutaminase in Celiac Disease. Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition 2000; 30(3): 232-240
44. Koning F: A Tertiary Twist to the Transglutaminase Tale. PLoS Biol 2007; 5(12): e337 doi:10.1371/journal.pbio.0050337

45. Villanacci V, Not T, Sblattero D, Gaiotto T, Chirdo F, Galletti A, Bassotti G: Mucosal tissue transglutaminase expression in celiac disease. Journal of Cellular and Molecular Medicine 2008 doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00325.x
46. Sakly W, Thomas V, Quash G: A role for tissue transglutaminase in α-gliadin peptide cytotoxicity. Clinical and Experimental Immunology 2006; 146: 550-558
47. Griffin M, Casadio R, Bergamini CM: Transglutaminases: Nature's biological glues. Biochem J 2002; 368: 377-396
48. Kim SY, Jeitner TM, Steinert PM: Transglutaminases in disease. Neurochemistry International 2002; 40: 85-103
49. Transglutaminases – What links celiac disease, thrombosis, skin and hair? http://www.zedira.com/resources/content/pdf/newsletter_200809.pdf (28. 12. 2008)
50. Sardy M, Karpati S, Merkl B, Paulsson M, Smyth N: Epidermal Transglutaminase (TGase 3) Is the Autoantigen of Dermatitis Herpetiformis. J Exp Med 2002; 195(6): 747-757
51. Donaldson MR, Zone JJ, Schmidt LA, Taylor TB, Neuhausen SL, Hull CM, Meyer LJ: Epidermal Transglutaminase Deposits in Perilesional and Uninvolved Skin in Patients with Dermatitis Herpetiformis. Journal of Investigative Dermatology 2007; 127: 1268-1271
52. Tg6 Antibody Plays a Key Role in Celiac Disease-Related Neurological Disorders. http://www.celiac.com/articles/21637/1/Tg6-Antibody-Plays-a-Key-Role-in-Celiac-Disease-Related-Neurological-Disorders/Page1.html (28. 12. 2008)
53. Lukač-Bajalo J, Ungerer R, Hekkens AJM, Van de Bienzen E, Hekkens WThJM: Circadian Aspects of In Vitro Culture of Rat Intestinal Rings. J. interdiscipl. Cycle Res. 1987; 18/4:243-248
54. Batista U: Gojenje sesalskih celic v in vitro pogojih, Študentska založba, Ljubljana, 2005; 11-17
55. Kedinger M, Haffen K, Simon-Assmann P: Intestinal tissue and cell cultures. Differentiation 1987; 36: 71-85
56. Rousset M: The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. Biochimie 1986; 68: 1035-1040

57. Elli L, Dolfini E, Bardella MT: Gliadin cytotoxicity and in vitro cell cultures. Toxicology Letters 2003; 146: 1-8
58. Bradford MM: A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-254
59. Navodila proizvajalca: Total Protein Kit, Micro. http://www.sigmaaldrich.com/sigma/bulletin/tp0100bul.pdf (7. 9. 2008)
60. Navodila proizvajalca: Transglutaminase Assay Kit. http://www.sigmaaldrich.com/sigma/bulletin/cs1070bul.pdf (7. 9. 2008)
61. Navodila proizvajalca: MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay. http://www.promega.com/tbs/tb348/tb348.pdf (7. 9. 2008)
62. Silano M, Di Benedetto R, Trecca A, Arrabito G, Leonardi F, De Vincenzi M: A Decapeptide from Durum Wheat Prevents Celiac Peripheral Blood Lymphocytes from Activation by Gliadin Peptides. Pediatr Res 2007; 61: 67-71
63. Silano M, Di Benedetto R, Maialetti F, De Vincenzi M, Calcaterra R, Trecca A, De Vincenzi M: A 10-residue peptide from durum wheat promotes a shift from a Th1-type response toward a Th2-type response in celiac disease. Am J Clin Nutr 2008; 87: 415-423
64. Jerneja Gosak: Proučevanje vpliva toksičnih peptidov na živost ter aktivnost maltaze in saharaze v kulturi mišjih enterocitov. Diplomska naloga. Ljubljana, 2008
65. Lidija Boštjančič: Spremljanje celične viabilnosti, proliferacije in aktivnosti maltaze v kulturah mišjih enterocitov. Diplomska naloga. Ljubljana, 2008
66. Pinkas DM, Strop P, Brunger AT, Khosla C: Transglutaminase 2 Undergoes a Large Conformational Change upon Activation. PLoS Biol 2007; 5(12): 2788-2794
67. http://www.tursiops-biology.com/images/enterocyte2.gif (27. 3. 2009)
68. http://www.nature.com/nrm/journal/v4/n3/images/nrm1055-f1.jpg (27. 3. 2009)
69. http://www.drustvo-celiakija.si/index.php?id=39 (27. 3. 2009)
70. http://www.nature.com/nri/journal/v2/n9/images/nri885-i1.gif (27. 3. 2009)