

1. UVOD

1.1 Zgradba tankega črevesa – makroskopski in mikroskopski vidik

Tanko črevo je najdaljši del prebavnega sistema (pri človeku 6-7m, pri miših okoli 35cm in pri podganah okoli 1,4m), v katerem poteka dokončno prebavljanje hrane, absorpcija hranilnih snovi, sekrecija, tvorba hormonov in nevrotransmiterjev ter obramba pred bakterijami, endotoksini itd. Sestoji iz treh segmentov, ki tvorijo prehod iz želodca do debelega črevesa (1, 2, 3, 21).

- **Duodenum** (dvanajstnik): kratek odsek podkvaste oblike v katerega pritekajo sokovi iz trebušne slinavke ter žolč iz jeter.
- **Jejunum** (zgornje tanko črevo): predstavlja 40% oz. 3,5m (pri človeku) celotnega tankega črevesa.
- **Ileum** (spodnje tanko črevo): končni odsek tankega črevesa. Z jejunumom sta na zadajšnji strani povezana z mezenterijem, ki jima daje veliko gibljivost v trebušni votlini. Ileum razdelimo na: distalni, medialni in terminalni del.

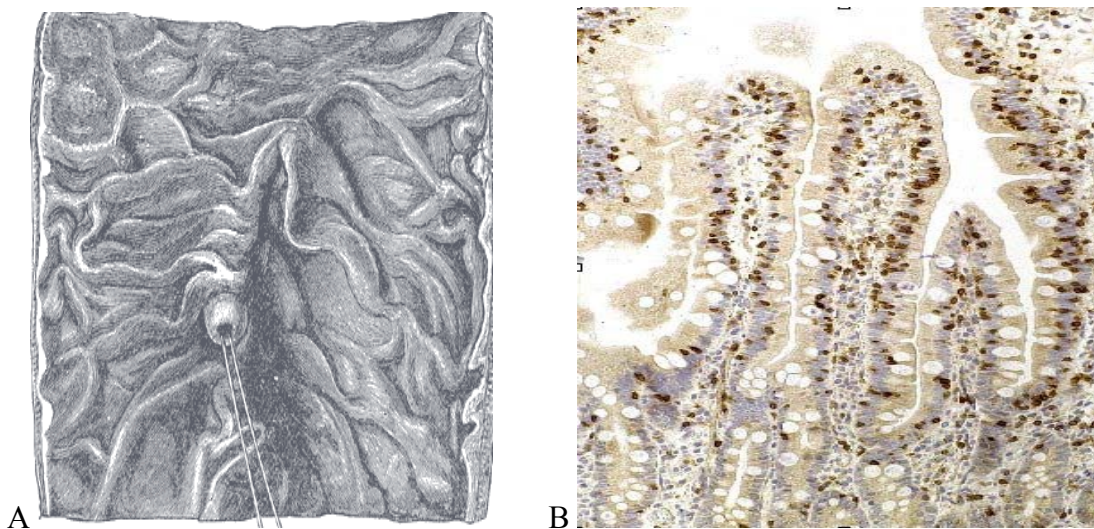
Z mikroskopskega vidika sestoji tanko črevo iz sluznice (mukoza in submukoza), gladko mišičnega sloja ter krvnih in limfnih žil. Sluznico sestavljajo enoslojni epitelij, rahlo vezivo in mišični sloj (1, 2, 21). Absorptivno površino sluznice, ki je že tako velika, pa povečujejo tri značilne "tvorbe":

- **Kerckringove gube**: sluznične gube, ki potekajo prečno glede na laminalno površino tankega črevesa. Najbolj so izrazite v jejunumu in do terminalnega ileuma izginejo. Poleg tega da povečajo absorptivno površino sluznice 3 krat, tudi mešajo zaužito hrano s pomočjo peristaltike (slika 1A) (1, 2, 4, 5).
- **Resice ali vili**: številčne sluznične strukture, ki segajo v lumen črevesa in so prekrite z epitelnimi celicami. Najbolj goste so v dvanajstniku in jejunumu. Visoke so okrog 1mm in povečajo absorptivno površino sluznice za 10 krat (slika 1B) (1, 2, 4, 5).

▪ **Mikroresice ali mikrovili:** epitelijske celice oz. diferencirani enterociti so zelo na gosto prekriti z mikroresicami na svoji apikalni strani membrane. Mikroresice so dolge $1\mu\text{m}$ in imajo premer $0,1\mu\text{m}$. Prekriva jih visoko specializirana plazemska membrana, ki sestoji iz zunajceličnega polisaharidnega plašča, ki nosi poglobitne sluznične prebavne encime kot so: disaharidaze, aminopeptidaze, lipaze, alkalna fosfataza. Mikroresice povečajo absorptivno površino tankega črevesa za 20 krat (1, 3, 5).

Vse tri omenjene strukture povečajo absorptivno površino tankega črevesa za do 600 krat.

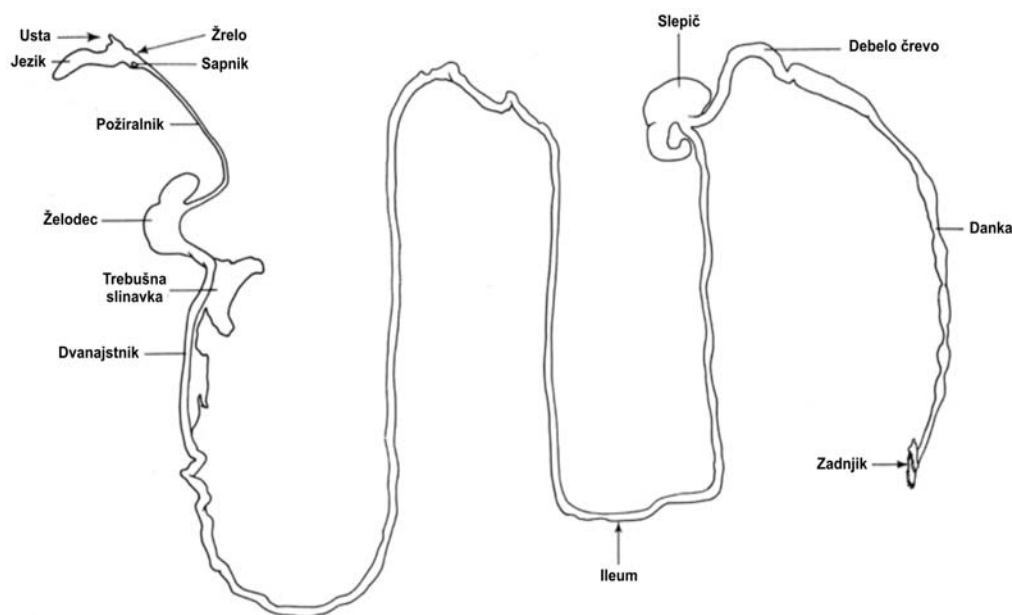
* **Lieberkühnove kripe** so jamicam podobne vdolbinice epitelija okrog črevesnih resic.



Slika 1: A) Kerckringove gube – shema B) Mikroskopski pregled kript in resic

ZGRADBA TANKEGA ČREVEESA PRI MIŠI:

Prebavni trakt miši je kratek in po strukturi ter funkciji zelo podoben oziroma enak kot pri ostalih sesalcih (glodalcih). Sestavni segmenti tankega črevesa opravljajo enako nalogo kot pri človeku. Duodenum, jejunum in ileum merijo skupaj okoli 35cm (6, 7) (slika 2).



Slika 2: Prebavni trakt miši

ZGRADBA TANKEGA ČREVEŠA PRI PODGANI:

Pri podgani je prebavni trakt dolg in precej zavit. Tudi pri podgani tanko črevesje sestoji iz enakih segmentov kot pri človeku in miši in opravlja enake funkcije. Duodenum meri 9,5-10 cm, jejunum meri 90-135 cm, ileum meri 2,5-3,5 cm (8).

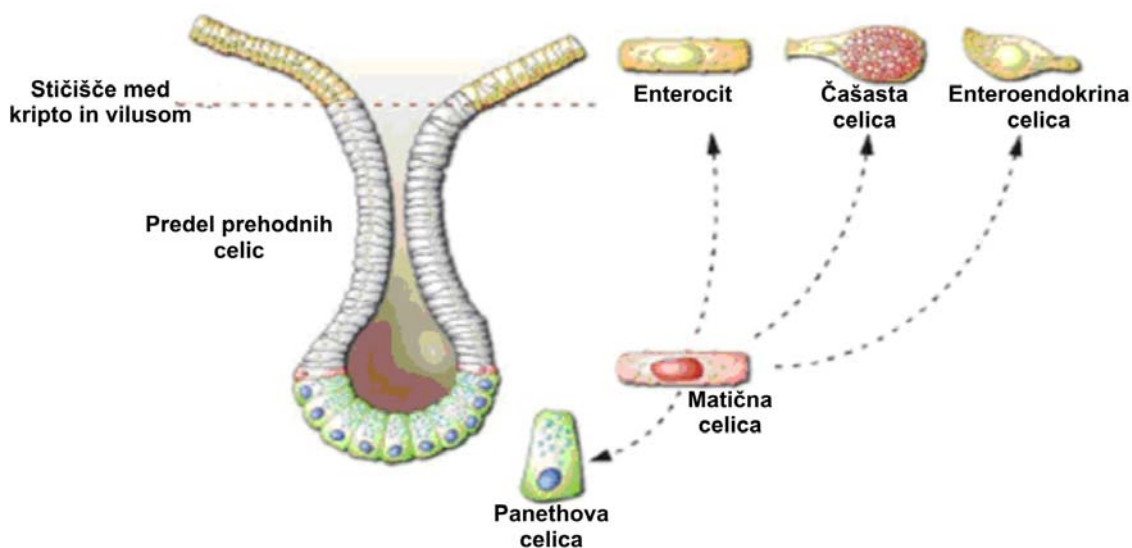
1.2 Dinamika celic tankega črevesa

Mukoza tankega črevesa je urejena v dveh osnovnih strukturah: vilih in kriptah. Vili so prekriti pretežno z zreliimi, absorptivnimi enterociti. Prisotne pa so tudi posamezne čašaste celice in enteroendokrine celice. Kripte poleg enterocitov in Panethovih celic vsebujejo tudi izvorne celice in prehodne celice (1, 2, 5).

Celice v vilih živijo le nekaj dni in se nato izločijo v lumen črevesa. Izvorne celice v kriptah se konstantno delijo in tako predstavljajo vir vseh epitelnih črevesnih celic v kriptah in na vilih.

1.2.1 Izvorne celice

Izvorne (matične) celice v kriptah se delijo in posledično nastaneta dve hčerinski celici. Ena novonastala hčerinska celica ostane matična celica, druga pa se diferencira preko prehodnih delečih se celic v enterocit, enteroendokrino celico, čašasto celico in Panethovo celico. Izvorne celice v kriptah predstavljajo obnovljiv vir črevesnih epitelijskih celic in prav tako v pogojih "*in vitro*" (slika 3) (9, 10).



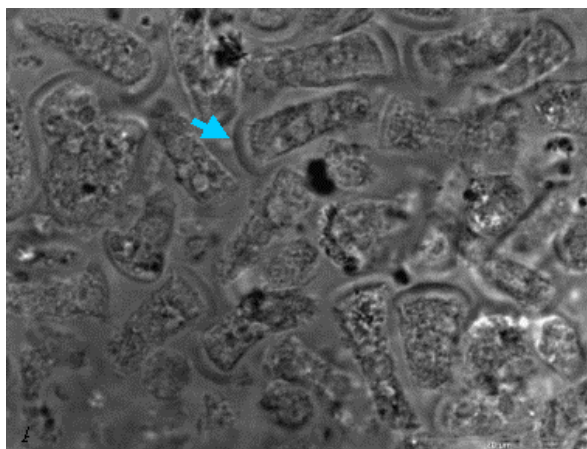
Slika 3: Shematski prikaz kripe in resic (11).

1.2.2 Prehodne celice

So prevladujoče celice v srednjem delu črevesnih žlez (Lieberkühnovih kript). Sposobne so omejenega števila celičnih delitev preden se diferencirajo v eno izmed petih vrst zrelih celic. Prve tri generacije prehodnih celic, ki nastanejo iz pravih izvornih celic, so potencialne izvorne celice. To pomeni, da so sposobne delovati kot izvorne celice, če je to potrebno (npr. po obsežni poškodbi celic) (slika 3) (11).

1.2.3 Enterociti

Hčerinske celice, ki se diferencirajo v enterocitne celice se pri potovanju navzgor po kripti še nekajkrat delijo preden se ustalijo v vilih. Tako so na vilih oz. resicah že prisotne zrele absorptivne celice, ki izražajo karakteristike oz. značilnosti tovrstnih celic npr. absorpcija tekočine in končnih produktov prebave, transport proteinov in encimov,... Ko propadejo se odluščijo v lumen črevesa. Vzrok za propad enterocitov je lahko poškodba ali pa normalna fiziološka regeneracija celic (5, 6, 7, 8, 9, 10). Diferencirani enterociti imajo značilno visoko prizmatsko obliko z mikrovresicami na apikalni strani celice, kjer so poleg drugih membranskih proteinov locirane tudi disaharidaze, kot sta maltaza in saharaza, ki sta tako imenovana "markerska" encima za enterocite (slika 4) (12).



Slika 4: Diferencirani vilusni enterociti v kulturi po enem tednu kultiviranja. Vidimo značilno stebričasto obliko celic z izrazitimi mikrovili na apikalnem delu, ki dajejo pod mikroskopom resast videz (modra puščica) z značilno morfologijo.

1.2.4 Enteroendokrine celice

Enteroendokrine celice v kri izločajo hormone kot so gastrin, holecistokinin, sekretin, kromogranin,... Gastrin ima pomembno vlogo pri nadzoru izločanja želodčne kisline. Holecistokinin je majhen črevesen hormon, ki stimulira izločanje pankreatičnih encimov in žolča. Sekretin izločajo epitelne celice tankega črevesa in stimulira izločanje bikarbonatno bogatih tekočin iz pankreasa in jeter. Tovrstni hormoni se ne izločajo

konstantno pač pa kot odgovor na specifične stimulatorje (sprožilne dejavnike) in se prenehajo izločati ko ti stimulatorji niso več prisotni (slika 3) (5, 9).

1.2.5 Čašaste celice

Čašaste celice izločajo sluz oz. mukus v lumen črevesa. Mukus je viskozna tekočina, ki sestoji primarno iz visoko glikoziliranih proteinov imenovanih mucini v raztopini elektrolitov. Čašaste celice ga izločajo predvsem zaradi delovanja dražečih stimulatorjev. Izločanje mukusa je lahko bazalno (konstantno) in stimulirano (kot odgovor na izven celične stimulatorje). Naloga mukusa je varovanje črevesa pred kemičnimi in fizikalnimi poškodbami. Čašaste celice so razporejene med ostalimi epitelnimi celicami v črevesu. Njihovo število je relativno nizko glede na število ostalih vrst epitelnih celic v črevesu (slika 3) (5, 9).

1.2.6 Panethove celice

Panethove celice so prisotne v najglobljem delu Lieberkühnovih kript. So neutrofilcem podobne celice, ki izločajo anti-mikrobne peptide (lizocim,...), ki varujejo epitelij črevesa pred škodljivimi učinki mikrobov v tankem črevesu. Njihova naloga je tudi obramba matičnih celic in uravnavanje črevesne flore (slika 3) (5, 9).

1.3 Disaharidaze tankega črevesa

Polisaharidi in disaharidi se morajo pred absorpcijo encimsko razgraditi oz. hidrolizirati v monosaharide. Tovrstno hidrolizo glikozidnih vezi vršijo encimi disaharidaze v tankem črevesu. Disaharidaze so glikoproteini sestavljeni iz 80% proteinov in 20% ogljikovih hidratov. Največjo aktivnost imajo v zgornjem delu jejunuma pri pH okoli 6. Njihova katalitična aktivnost je v duodenumu nižja in v ileumu (terminalnem) najnižja, kar je lahko posledica razlik v pH vrednosti v posameznem odseku tankega črevesa. Na katalitično aktivnost disaharidaz pa vplivajo tudi cirkadialni ritmi (aktivnost črevesnih disaharidaz je najvišja v obdobju hranjenja posameznega organizma) (34). Glavni nosilci disaharidaznih aktivnosti so diferencirani vilusni enterociti, ki imajo na svojem

apikalnem delu številne mikrovile. Mikrovili so prekriti z glikokaliksom in imajo z mikroskopskega aspekta resast videz (brush border). Črevesne disaharidaze se nahajajo na resasti površini in imajo svoje aktivno mesto izpostavljeno v lumen črevesa (13, 14, 19).

- Saharaza – cepi saharozo na molekulo fruktoze in glukoze
- Maltaza – cepi maltozo na dve molekuli glukoze
- Laktaza – cepi laktozo na molekulo glukoze in galaktoze
- Trehalaza – cepi trehalozo na dve molekuli glukoze
- Izomaltaza – cepi izomaltozo na dve molekuli glukoze

Glukoza in galaktoza se absorbirata preko enterocitov s kotransportom v prisotnosti natrija. Fruktoza pa preide iz črevesnega lumna v celice z olajšano difuzijo.

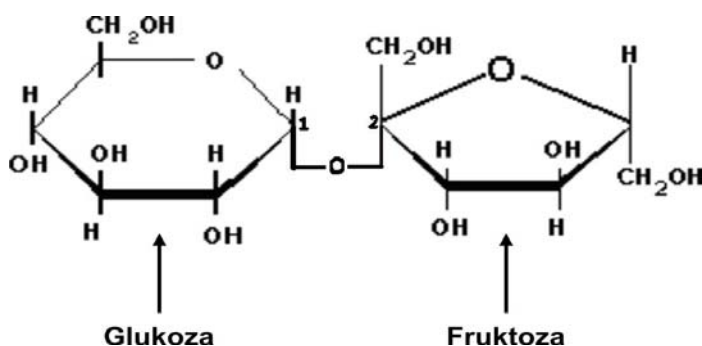
Glede na vez, ki jo posamezna disaharidaza cepi, jih delimo v dve skupini:

- α -glikozidaze: saharazno-izomaltazni kompleks (saharaza)
maltazno-glukoamilazni kompleks (maltaza)
trehalaza
- β -glikozidaze: laktazno-glikozilceramidazni kompleks (laktaza)

1.3.1 Disaharidi

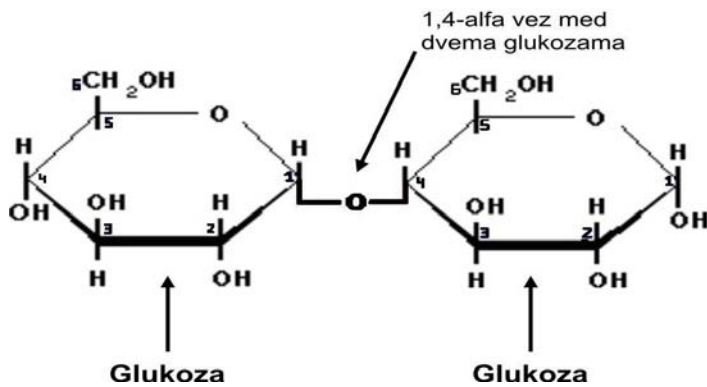
- **Saharaza**

- Saharaza cepi vez na mestu α -1- β -2



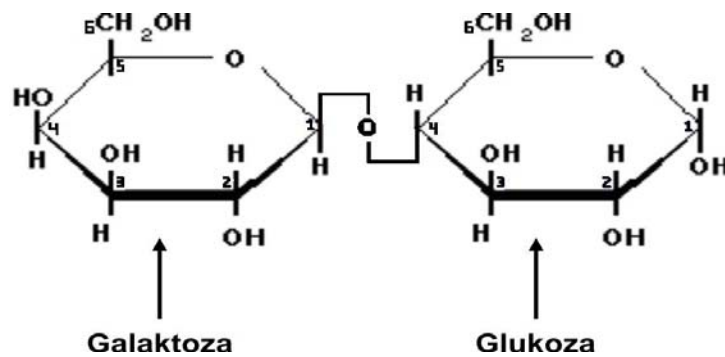
▪ **Maltoza**

- Maltaza cepi vez na mestu α -1,4



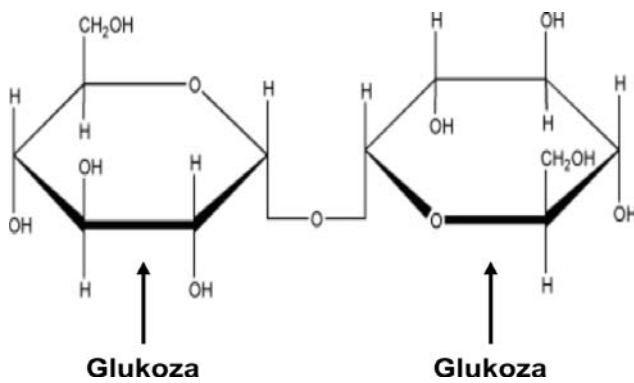
▪ **Laktoza**

- Laktaza cepi vez na mestu β -1,4



▪ **Trehaloza**

- Trehalaza cepi vez na mestu α -1,1



1.4 Encim saharaza

Saharaza je encim tankega črevesa, ki cepi disaharid saharozo na molekulo glukoze in fruktoze. Biokemijsko ime saharaze je β -fruktofuranozidaza (E.C 3.2.1.26). Reakcija, ki poteče je hidroliza v kislem okolju pri pH 6. Saharaza je integralni membranski encim resaste površine vilusnih enterocitov. Ob rojstvu je aktivnost nizka, zato se saharoza ne prebavi ustrezno. Posledica tega je pojav hude diareje. Aktivnost saharaze poraste z leti, ko se aktivnost laktaze na črevesnih epitelih celicah zmanjša. Zmanjšanje aktivnosti disaharidaz v črevesu spremljajo tudi kronične vnetne črevesne bolezni (KVČB) (15, 16, 18, 19).

1.5 Encim maltaza

Maltaza je encim tankega črevesa, ki cepi disaharid maltozo, in sicer na dve molekuli glukoze (razgradnja škroba in glikogena). Biokemijsko ime maltaze je α -1,4-glukozidaza (E.C 3.2.1.20). Tako kot ostale črevesne disaharidaze, so tudi encimi maltaze vezani na resasto površino vilusnih enterocitov v tankem črevesu. Na resasti površini sta prisotni dve vrsti maltaz: maltaza-glokoamilazo (E.C 3.2.1.20 in E.C 3.2.1.3) in saharaza-izomaltazo (E.C 3.2.1.48 in E.C 3.2.1.10). Reakcija, ki poteče je hidroliza v kislem okolju pri pH 6. Maltaza je ob rojstvu v črevesu nizka, zato se škrob ne more ustrezno prebaviti. Tudi okvara oz. odsotnost encima maltaze vodi do KVČB (17, 18, 19).

1.6 Kronične vnetne črevesne bolezni ali KVČB

Kronične vnetne črevesne bolezni (KVČB) so dolgotrajno (kronično) obolenje črevesa. Med KVČB uvrščamo dve bolezni, ki sta si zelo podobni, to sta Crohnova bolezen (CB) in ulcerozni kolitis (UK). Poleg omenjenih dveh stanj lahko prištevamo med KVČB tudi celiakijo (glutenska enteropatija) in intermediarni kolitis. KVČB so posledica trajne in neustrezne imunske aktivnosti črevesne sluznice, vzroki pa še niso v celoti pojasnjeni in so predmet številnih raziskav (22, 23, 24).

1.6.1 Crohnova bolezen (Morbus Crohn)

Crohnova bolezen je KVČB, ki lahko prizadene vse dele prebavil, od ust do anusa. Vnetje zajame celotno steno prizadetega dela prebavil. Znano je, da je za nastanek bolezni odločilna genetska predispozicija. Vzrok pripisujejo nenormalnim imunskim odzivom, posledica česar je prekomerno vnetje v sluznici črevesa. Bolezen je prisotna do konca življenja in poteka v zagonih in remisijah. Pogosto se pojavi v prikriti obliki in sprva ni mogoče zagotovo trditi za katero obliko KVČB gre (22, 23, 24). Incidenca CB znaša 2-4 novi primeri na 100.000 prebivalcev letno. Prevalenca CB pa znaša 30-50 bolnikov na 100.000 prebivalcev.

Klinični znaki bolezni so: bolečine v trebuhu, mehkejša, vodenasta ali krvavo blato, hujšanje ali nepridobivanje na teži, zaostalost v rasti in razvoju,... Zdravljenje oz. zamejitev bolezni se opravi s/z: kortikosteroidi (pri zmernih in hudih oblikah KVČB), aminosalicilati (pri blagih in zmernih oblikah KVČB in za preprečevanje zagonov bolezni, zlasti UK), imunosupresivi (zmanjšanje prekomernega vnetja črevesne sluznice). Dandanes so zelo učinkovita tudi biološka zdravila (infliximab, adalimumab), ki se uporabljajo pri bolnikih, ki ne odgovorijo na standardno zdravljenje. Biološka zdravila delujejo ciljno na vzrok vnetja v črevesu. Po naravi so to beljakovine, ki so enake ali podobne človeškim beljakovinom. Posledično je njihovo delovanje bolj specifično saj se močno in selektivno vežejo na tarče v človeškem organizmu in tako preprečijo razvoj bolezni. Za vzpostavitev remisije bolezni pride v poštev tudi enteralna prehrana (elementarna dieta). V skrajnih primerih, ko se bolnik ne odzove na terapijo, se lahko opravi tudi resekcija najbolj prizadetega dela črevesa (22, 23, 24, 25). Če se bolezni ne zdravi pride do resnih zapletov (obsežne krvavitve iz črevesa, nastanek stenoz, pojav fistul in fisur, abscesi, perforacije, adenokarcinom debelega črevesa,...) ali celo smrti (22, 23, 24).

1.6.2 Ulcerozni kolitis (Colitis ulcerosa)

UC se lahko pojavi v vseh življenjskih obdobjih, najpogosteje pa pri mlajših odraslih. Praviloma prizadane samo debelo črevo. Vnetje je omejeno na sluznico in submukozo in poteka neprekinjeno brez vmesnih neprizadetih predelov sluznice. Etiopatogeneza je

podobna ali celo enaka kot pri Crohnovi bolezni t.j. neustrezna imunska aktivnost črevesne sluznice, ki je posledica imunskega odgovora na normalno črevesno floro. Pri akutnem vnetju so histološko vidne deformirane in delno cepljene kriptе, ki so odmaknjene od mišične plasti sluznice, gost vnetni infiltrat in zmanjšana mucinska sekrecija. Klinična slika je podobna kot pri Crohnovi bolezni (krvava driska, bolečine v spodnjem delu trebuha, izguba teže, utrujenost,...). Diagnostika zajema histološki pregled sluznice po opravljeni kolonoskopiji (22, 23, 24).

1.6.3 Celiakija (glutenska enteropatija)

Celiakija ali glutenska enteropatija je doživljenska bolezen, ki prizadene sluznico tankega črevesa in je posledica trajne intolerance na gluten pri genetsko predispoziranih posameznikih. Prevalenca bolezni je izredno visoka in znaša 1:300. Vzroki za tovrstno stanje so tudi avtoimunski dejavniki. Pogosto se pojavi v določenih družinah, torej mora obstajati neka genetska zasnova, da lahko nekdo zanjo zboli. Natančna pot dedovanja še ni znana (26, 27, 28).

Gluten je skupina v vodi netopnih proteinov zrnja pšenice. Podobne proteine pa lahko srečamo tudi v zrnju ječmena, rži in ovsa. Najpomembnejša proteina, ki sestavljata gluten sta glutenin in gliadin. Pri bolnikih s celiakijo ima gluten direkten destruktiven učinek na enterocite, ki se nahajajo v črevesju in posledično upadejo aktivnosti vseh črevesnih disaharidaz. Izjema je blaga oblika bolezni, kjer se zmanjša le aktivnost laktaze medtem ko je aktivnost maltaze in saharaze normalna. Za sprožitev imunskega odziva naj bi bil odgovoren predvsem aktivni peptid α -gliadina, ki je zaradi značilne strukture (zaporedja AK prolina, serina, glutamina) med vsemi najbolj toksičen in predstavlja glavni substrat encima tkivne transglutaminaze (tTG), ki se nahaja v enterocitih in v izvenceličnem matriksu črevesne sluznice (26, 27, 28).

V lažji obliki te bolezni gluten uniči in reducira nekatere vilusne enterocite in tako zmanjša absorpcijsko površino. Za hujšo obliko celiakije pa je značilna atrofija sluznice tankega črevesa z značilnimi zadebelitvami (hipertrofija) in posledično izguba funkcionalnega nagubanega epitela. Posledično je zmanjšana absorpcija hranilnih snovi (malabsorpcija).

Celiakija se lahko pojavi v klasični obliki z značilnimi kliničnimi znaki (driske, bruhanje, bruhanje, hujšanje, bledica, utrujenost, pomanjkanje apetita, zmanjšana odpornost organizma, deformacija zobovja, ...) ali pa v atipičnih oblikah. Možna je tudi asimptomatska oblika bolezni. Zapleti pri celiakiji so lahko pojav malignega limfoma črevesja, rahitis, osteoporoza, zaostalost v rasti, anemija, hipoproteinemija, okvara jeter,... (26, 27, 28). Pri upoštevanju stroge brezglutenske prehrane se lahko normalno stanje povrne, še posebej pri otrocih.

1.7 *In vitro* testni modeli

In vitro raziskave predstavljajo osnovni pristop k spoznavanju ozadja nastanka oziroma pojava kroničnih črevesnih bolezni. S tovrstnimi testnimi modeli posnemamo okolje, ki je prisotno v živem organizmu *in vivo*. V ta namen se uporabljajo naslednji *in vitro* testni modeli: celične kulture, tkivne kulture in organske kulture.

Pri celični kulturi ohranjamo celice v *in vitro* okolju pri kontroliranih pogojih. Pripravimo jo tako, da prekinemo medcelične stike v koščku tkiva. V ta namen se najpogosteje uporabijo proteolitični encimi (tripsin, kolagenaza). Koščke tkiva pa lahko nasadimo tudi v rastni medij in ko se le ti pritrdijo na trdno podlago, začnejo iz njih izraščati celice. Koščke tkiva v nadaljevanju odstranimo, v ravnem (kultivacijskem) mediju pa ostanejo samo celice. Tako pripravljeno celično kulturo lahko ohranimo v kultivacijskem mediju, ki vsebuje hranilne snovi in ima primeren pH in temperaturo. Za maksimalno uspešno rast in razmnoževanje celic v kulturi, mora kultiviranje potekati v sterilnem okolju in ustrezni atmosferi (zrak, v katerem je 5% CO₂). Normalne (netransformirane in nepatološke) celice se v kulturi delijo, če so vezane na trdno podlago (plastika, steklo). Delitev pa poteka dokler se ne zapolni površina nosilca (kontaktna inhibicija delitve) oziroma so prisotne hranilne snovi v mediju (30, 31, 32).

Tkivno kulturo pripravimo tako, da zelo majhen košček tkiva (odvzem v sterilnih pogojih) prenesemo na hranilno gojišče. Celice tu dobivajo hranilne snovi z difuzijo. Pri organski kulturi se uporabijo nerazbiti deli tkiva, lahko pa tudi celoten organ. Tu so histološke značilnosti tkiva povsem enake kot *in vivo*. Primarne kulture pripravimo neposredno iz tkiva, celice pa imajo omejeno število delitev. Izjema so trajne celične linije, ki imajo neskončno število delitev in se morfološko in fiziološko razlikujejo od

celic iz katerih izvirajo. Prednosti *in vitro* testnih modelov so v tem, da so nam celice v kulturah bolj dostopne za eksperimentiranje in lažje zagotovimo enake pogoje za vse celice.

1.8 Kultiviranje epitelijskih celic tankega črevesa

Prvi uspešni poskusi kultiviranja epitelijskih celic tankega črevesa so bili opravljeni leta 1969, ko sta Browning in Trier prva kultivirala humane intestinalne biote. V organski kulturi (*in vitro*) so celice ohranile svojo strukturo in funkcije 24 ur (33). Tovrstni pomembni začetki *in vitro* kultiviranja so omogočili vpogled v ozadje etiopatogeneze intestinalnih bolezni kot so: celiakija, kronične vnetne črevesne bolezni,... Tako sta leta 1970 Browning in Trier svojo metodo kultiviranja prenesla na biopsijske vzorce tankega črevesa bolnikov s celiakijo. Po 24 urah kultiviranja sta ugotovila, da se sluznica v kulturi, ki ne vsebuje glutena, normalizira (33). Da bi se izognili nekaterim etičnim vprašanjem so metodo Browning-Trier nekoliko modificirali in uporabili za kultiviranje tkiva tankega črevesa nekaterih živalskih vrst. Ker se je izkazalo, da tovrstna metoda ni uspešna za kultiviranje tkiva podganjega tankega črevesa, so leta 1987 Lukač Bajalo in sod. izvedli modifikacijo Browning-Trier-jeve metode in uspešno kultivirali tkivo podganjega tankega črevesa 48ur (34, 35). Uspeh je moč pripisati predvsem boljši oksigenaciji tkiva v času kultiviranja. Pomembno je namreč spoznanje, da je za kultiviranje tkiva majhnih živali (podgana, miš) potrebna večja količina kisika za ohranitev strukture in funkcionalnosti tkiva kot pa za človeško tkivo. Poleg boljše oksigenacije tkiva, pa na uspešnost kultiviranja vplivajo tudi številni drugi faktorji (sterilnost okolja v katerem poteka priprava tkiva in samo kultiviranje, sestava kultivacijskega medija,...).

Nadalje je razvoj potekal od tkivnih in organskih kultur do celičnih kultur. Tako so nastale primarne celične kulture in celične linije (netransformirane in transformirane). Primer netransformirane celične linije so IEC linije, ki imajo sposobnost proliferacije in daljšega obstoja v *in vitro* pogojih. Tovrstne celične linije se običajno pridobijo iz tankega črevesa podgane. Transformirane (maligne) intestinalne celične linije pa izhajajo iz humanega adenokarcinoma debelega črevesa. Tu se najpogosteje uporabljajo celice Caco-2, ki so morfološko in biokemijsko podobne intestinalnim epitelijskim celicam.

Pojavljajo pa se dvomi ali so te celice res primerne za *in vitro* študije etiopatogeneze vnetnih črevesnih bolezni, saj mora celični model kar se da popolno ponazarjati *in vivo* razmere (36, 37). Tako so za študije etiopatogeneze vnetnih črevesnih bolezni najprimernejše primarne celične kulture, ki pa imajo to slabost, da v njih še ni mogoče ohranjati normalnih enterocitov skozi daljše obdobje kultiviranja. Kmalu po izolaciji iz tkiva se namreč pojavi visoka stopnja odmrtnosti celic, kar predstavlja problem in hkrati izziv za nadaljne raziskave.

2 NAMEN DELA

Namen te diplomske naloge je prenos predhodno razvite metode kultiviranja mišjih enterocitov na kultiviranje podganjih enterocitov in primerjati uspešnost kultiviranja. Pričakujemo, da bomo iz podganjega črevesa lahko izolirali večje število celic, kar bi omogočilo identifikacijo vseh podvrst epitelijskih celic in spremljanje njihove dinamike tekom kultiviranja.

Eksperimentalno delo bo potekalo po naslednjih fazah:

1. Priprava dolgožive primarne celične kulture podganjih enterocitov:
 - Izolacija črevesnih epitelijskih celic iz sluzi, tankega črevesa in debelega črevesa šestih podgan Wistar,
 - Kultiviranje podganjih enterocitov skozi več tednov.
2. Merjenje aktivnosti maltaze in saharaze v celičnih lizatih
 - priprava celičnega lizata iz podganjih kultur enterocitovCelični lizati iz mišjih celičnih kultur so bili že predhodno pripravljeni.
 - merjenje koncentracije proteinov po Bradford-ovi metodi in
 - merjenje aktivnosti maltaze in saharaze po Dahlqvist-ovi metodi
3. Spremljanje celične živosti s tripanskim modrim in metodo MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity.
4. Spremljanje celične proliferacije z luminiscentno metodo celične živosti (CellTiter-Glo®).
5. Opazovanje podganjih celičnih kultur, štetje deleža vilusnih enterocitov glede na njihovo specifično obliko in resasti obrobek ter štetje vseh epitelijskih celic s pomočjo Neubauerjeve komorice z inverznim svetlobnim mokroskopom.

Izolacija zadostnega števila celic in identifikacija vseh podvrst epitelijskih celic je predpogoj za prenos metode kultiviranja na humane črevesne celice, z namenom preučevanja črevesnih bolezni, kar je zastavljena naloga skupine Lukač Bajalo J. in sodelavcev.

3 METODE IN MATERIALI

3.1 Postopek odmrzovanja mišjih epiteljskih celic

- krioampule s celicami smo prenesli iz tekočega dušika v inkubator, ki je segret na 37°C;
- odmrznjenim celicam smo dodali nekaj kapljic na 37°C segretega RPMI medija za inkubiranje;
- s pipeto smo vse kvantitativno prenesli v epruveto za centrifugiranje in dodali 10 mL toplega (37°C) RPMI medija;
- centrifugiranje je potekalo 10 min. pri 129 x g (RCF - relativna centrifugalna sila);
- supernatant smo zavrgli, sediment celic pa prenesli v mikrotitrsko ploščico ter dodali primeren volumen svežega medija.

* Postopek odmrzovanja celic smo uporabili samo pri delu z mišjimi enterociti!

3.2 Izolacija podganjih epiteljskih celic

POISKUSNE ŽIVALI – PODGANE:

Za izvedbo eksperimentalnega dela te diplomske naloge smo žrtvovali 6 podgan (Wistar), moškega spola, starih 12 tednov, s povprečno težo 276,4 g. Podgane so bile hranjene s standardno prehrano za podgane (Altromin, Nemčija) in imele so vodo »ad libitum«. Izpostavljene so bile 12 urnemu svetloba/tema ciklu (svetloba med 7.00-19.00) pri temperaturi 22-23°C in 55 ± 10% vlažnosti. Pred usmrčitvijo so bile 24 ur brez trde hrane, na voljo pa so imele vodo. Usmrčene so bile med 10:30 in 11:40 dopoldan z inhalacijo CO₂. Neposredno po usmrčitvi jim je bilo odvzeta sluz, tanko črevo v celoti in debelo črevo. Ta del eksperimenta je bil opravljen v Medicinskem eksperimentalnem centru (MEC) Inštituta za patologijo MF UL s strani usposobljenega osebja MEC. Žrtvovanje poskusnih živali za izvajanje znanstveno-raziskovalnega dela na tkivu predhodno usmrčenih poskusnih živali je bilo odobreno s strani Veterinarske uprave RS dne 03. 02. 2009, pod številko 34401-72/2008/4.

Vsebinsko tankega črevesa smo najprej spirali s primerno količino fiziološke raztopine segrete na 37°C. Nato smo s plastičnim in neostrim strgalom iztisnili sluz, črevo sprali s Hanks-ovo raztopino z dodanim Ab/Am, prav tako segreto na 37°C in sluz kvantitativno prenesli v falkonko. Tanko črevo smo prenesli v falkonko s 5 mL Hanks-ove raztopine z dodanim Ab/Am, prav tako segreto na 37°C. Debelo črevo smo prerezali, odstranili blato s pomočjo fiziološke raztopine in ga prenesli v falkonko s Hanks-ovo raztopino. Tako shranjene vzorce tkiva smo hranili v termostatisirani torbi, kjer je bila vzdrževana telesna temperatura.

TANKO ČREVO:

Delo dalje potekalo v celičnem laboratoriju, kjer smo iz falkonk s tankim črevesom odlili del Hanks-ove raztopine. Tanko črevo smo s kirurškimi škargami razrezali v čaši in dodali 10 mL Hanks-ove raztopine s kolegenazo (1g/100mL) in dodanim Ab/Am, segrete na 37°C ter vse skupaj inkubirali pri enaki temperaturi (37°C).

- 30 min po dodatku kolagenaze v vsako čašo, smo dodali še 10 mL kompletiranega RPMI medija (brez merkaptotetanol).
- Nato smo v vsako čašo z vzorcem tankega črevesa dodali še 1 mL kolagenaze v Hanks-ovi raztopini (1g/100 mL) in dodanim Ab/Am, ker nam je ostala in inkubiramo dalje.
- Po 20 minutah smo vzorce prenesli iz čaš v falkonke in čaše sprali s 5 mL kompletiranega RPMI medija. Falkonke z vzorci smo centrifugirali 2 minuti pri 129 x g (RCF - relativna centrifugalna sila).
- Ker je bila vsebina še vedno motna in je tkivo lebdelo, smo se odločili, da ponovno centrifugiramo. 5 minut pri 129 x g (RCF - relativna centrifugalna sila).
- Postopek smo še enkrat ponovili. Tokrat 5 minut pri 358 x g (RCF).
- Približno 12 mL supernatanta smo odstranili in shranili, hkrati pa preverili morebitno prisotnost celic v njem.
- Dodali smo 10 mL RPMI medija in ponovno centrifugirali 5 minut pri 358 x g (RCF).
- Supernatant smo odstranili, vzorce tankega črevesa pa prenesli iz velikih v majhne falkonke in dodali 5 mL RPMI medija.

- Centrifugirali 5 minut pri $129 \times g$ (RCF - relativna centrifugalna sila).
- Odvzeli smo supernatant in dodali 5 mL novega RPMI medija.
- Centrifugirali 5 minut pri $358 \times g$ (RCF - relativna centrifugalna sila).
- Supernatant smo odvzeli in dodali 5 mL svežega RPMI medija v vsako falkonko.
- Centrifugirali 5 minut pri $358 \times g$ (RCF - relativna centrifugalna sila).
- Supernatant smo odlili, dodali 5 mL kompletiranega RPMI medija za kultiviranje, da smo resuspendirali sediment in vzorec iz falkonke prenesli v petrijevko oz. titersko ploščo. Falkonko smo sperali z 10 mL kompletiranega RPMI medija za kultiviranje in vse skupaj kvantitativno prenesli na titersko ploščo, kamor smo dodali še 5 mL kompletiranega RPMI medija. Pokrovček titerske plošče smo razkužili nad plamenom. Samo titersko ploščo pa smo obrisali z etanolom in pokrito postavili v kultivator (37°C , 100% vlažnost, zrak v katerem je 5% CO_2).

Od žrtvovanja živali do pričetka kultiviranja je preteklo približno 3,5 ure. Sama obdelava tankega črevesa pa približno 2,5 ure.

SLUZ:

Vzorci sluzi smo iz majhnih falkonk kvantitativno prenesli v velike falkonke in dodali 2 mL Hanks-ove raztopine s kolagenazo (1g/100mL) in dodanim Ab/Am segrete na 37°C ter inkubirali.

- Eno uro po dodatku kolagenaze je sledilo spiranje s 5mL kompletiranega RPMI medija.
- Centrifugirali 5 minut pri $358 \times g$ (RCF - relativna centrifugalna sila).
- Supernatant smo odstranili in dodali 10 mL svežega RPMI medija.
- Centrifugirali 5 minut pri $358 \times g$ (RCF - relativna centrifugalna sila).
- Vsebinsko smo kvantitativno prenesli v majhne falkonke in dodamo 10 mL RPMI medija.
- Centrifugirali 5 minut pri $129 \times g$ (RCF - relativna centrifugalna sila).

- Supernatant smo odstranili in dodali 10 mL svežega RPMI medija.
- Centrifugirali 5 minut pri $358 \times g$ (RCF - relativna centrifugalna sila).
- Supernatant smo odlijemo, dodali 5 mL kompletiranega RPMI medija za kultiviranje, da smo resuspendirali sediment in vzorec prenesli v petrijevko oz. titersko ploščo, kamor smo dodali še 5 mL kompletiranega RPMI medija. Pokrovček titerske plošče smo razkužili nad plamenom. Samo titersko ploščo pa obrisali z etanolom in pokrito postavili v kultivator (37°C , 100% vlažnost, zrak v katerem je 5% CO_2).

Od žrtvovanja živali do pričetka kultiviranja je preteklo približno 4 ure. Sama obdelava tankega črevesa pa približno 2,5 ure.

* Vzorce sluzi smo kasneje še zamrznili v tekočem dušiku in jih tako pripravili za nadaljne študije.

DEBELO ČREVO:

Del Hanks-ove raztopine smo najprej odlili, nato pa debelo črevo s kirurškimi škarpami razrezali v čaši in dodali 4 mL Hanks-ove raztopine s kolagenazo (1g/100 mL) in dodanim Ab/Am, segrete na 37°C in inkubirali pri isti temperaturi.

- V vsako čašo z vzorcem debelega črevesa smo dodali 0,5 mL kolegenaze v Hans-ovi raztopini (1g/100 mL) in dodanim Ab/Am, ker nam je ostala in inkubirali.
- Eno uro po dodatku kolagenaze smo vzorce prenesli v 15 mL falkonke in čašo sprali s 5 mL kompletiranega RPMI medija.
- Centrifugirali 5 minut pri $129 \times g$ (RCF - relativna centrifugalna sila).
- Supernatant smo odvzeli in dodali 9 mL kompletiranega RPMI medija.
- Centrifugirali 5 minut pri $129 \times g$ (RCF - relativna centrifugalna sila).
- Supernatant smo odvzeli in dodali 10 mL svežega RPMI medija.
- Centrifugirali 5 minut pri $129 \times g$ (RCF - relativna centrifugalna sila).
- Supernatant smo odvzeli in dodali 10 mL svežega RPMI medija.
- Centrifugirali 5 minut pri $358 \times g$ (RCF - relativna centrifugalna sila).

- Odlili smo supernatant, dodali 5 mL kompletiranega RPMI medija za kultiviranje, da smo resuspendirali sediment in vzorec prenesli v petrijevko oz. titersko ploščo. Falkonko smo sperali z 10 mL kompletiranega RPMI medija za kultiviranje in vse kvantitativno prenesli v titersko ploščo, kamor smo dodali še 5 mL kompletiranega RPMI medija. Pokrovček titerske plošče smo razkužili nad plamenom. Samo titersko ploščo pa obrisali z etanolom in pokrito postavili v kultivator (37°C, 100% vlažnost, zrak v katerem je 5% CO₂).

Od žrtvovanja živali do pričetka kultiviranja je preteklo približno 4 ure. Sama obdelava debelega črevesa pa približno 2,5 ure.

* Vzorce debelega črevesa smo kasneje še zamrznili v tekočem dušiku in jih tako pripravili za nadaljne študije.

3.2.1 Postopek zamrzovanja vzorcev debelega črevesa in sluzi

Reagenti in kemikalije:

- RPMI 1640 medij 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 vzorcev debelega črevesa in sluzi smo izvajali na ledu. Celično kulturo smo najprej prenesli v centrifugirko in centrifugirali 10 minut pri 1200 obratov/min. Supernatant smo odlili in sediment resuspendirali v 0,5 mL raztopine A. Vsebinsko smo premešali in kvantitativno prenesli v krioampule ter dodali še 0,5 mL raztopine B, ki vsebuje DMSO. Le ta prepreči negativne posledice zamrzovanja. Krioampule smo nato postavili za 1 uro na -80° C in nato v tekoči dušik.

3.3 Kultiviranje podganjih enterocitov

Izolirane podganje enterocite smo kultivirali po modificirani metodi Lukač Bajalo in sod., ki je bila razvita za kultiviranje tankega črevesa (34) in v predhodnih poskusih prilagojena za kultiviranje iz tkiva izoliranih enterocitov.

Medij, v katerem se kultivira podganje enterocite, je kompletiran RPMI 1640. Svež medij je rdeče barve in ko se izrabi (pH medija pade), se barva spremeni v čebulno rdečkasto oziroma rumenkasto. Sprememba barve medija je zelo dober pokazatelj, kdaj je potrebno celicam zamenjati medij, narediti pasažo ali dodati nekaj svežega medija. Sprememba barve medija pa je lahko tudi pokazatelj okužbe celične kulture.

Za uspešno rast izoliranih enterocitov je zelo pomembna gostota celic v kulturi, ki ne sme biti previsoka in prav tako ne prenizka (v območju 10^6 celic/ml). Če imamo previsoko število celic v kulturi, lahko dodamo svež medij (5-10 ml k prvotno 10 ml celične kulture) ali pa vsebin petrijevke razdelimo med dve petrijevki in nato vsako petrijevko dodamo svež medij (5ml, po potrebi tudi več). V primeru prenizke gostote celic, je potrebno celice kultivirati v manjšem volumnu medija. To naredimo tako, da kulturo centrifugiramo, medij odlijemo, usedlino celic pa resuspendiramo v ustrezno manjšem volumnu medija in kulturo nasadimo v manjšo petrijevko (lahko tudi v mikrotitrsko ploščico).

3.3.1 Priprava kompletiranega RPMI 1640 medija

Sestava 250 mL kompletiranega RPMI 1640 medija

- 220 mL RPMI 1640 s HEPES-om (Sigma R5886, Nemčija)
- 25 mL FBS (Sigma F4135, ZDA)
- 2,5 mL raztopine antibiotik/antimikotik; ki vsebuje 10000U/mL penicilina, 10 mg/mL streptomicina in 25 µg/mL amfotericina B (Sigma 5955, Nemčija)
- 2,5 mL 200 mM raztopine L-glutamina (Sigma G7513, Nemčija)
- 50 nM 2-merkaptetanola → 250 µL
- 250 mg glukoze (Zorka-Šabac)

3.4 Spremljanje celične živosti (viabilnosti) s tripanskim modrilom

Ob začetku kultiviranja (1dan) in nato ob koncu vsakega tedna kultiviranja smo spremljali viabilnost oz. delež živih celic v kulturi s tripanskim modrilom. Metoda bo služila kot primerjava za spremljanje viabilnosti celic z metodo MultiTox – Fluor Multiplex Cytotoxicity. Metoda s tripanskim modrilom temelji na dejstvu, da je pri živi (viabilni) celici integriteta membrane ohranjena, zaradi česar barvilo ne more preiti v celico in celica se ne obarva. Pri mrtvi (neviabilni) celici se integriteta membrane poruši, barvilo pa lahko preide v celico in celica se obarva modro in pri vrtenju mikro vijaka na mikroskopu rahlo zasveti. Slaba lastnost te metode je, da celice ne smejo biti predolgo izpostavljene barvilu (3-5 minut), saj v tem primeru pride do uničenja živih celic, kar povzroči prevzem barvila tudi v te celice (43). Posledica le tega je lažno negativen rezultat. Temu pa se lahko izognemo z uporabo digitalne kamere v sklopu mikroskopa. Tako lahko napravimo posnetke (barvne fotografije) že nekaj sekund po začetku mikroskopiranja in nato ocenimo živost celic glede na nastale fotografije. Na ta način dobimo kar najbolj reprezentativne podatke oz. rezultate.

Reagenti in kemikalije:

- tripan modro (0,4 %) raztopina (Sigma T8154, Nemčija)
- NaCl (Fluka 71383, Švica)
- KCl (Kemika 11209, Zagreb)
- KH_2PO_4 (Kemika 11123, Zagreb)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Riedel-de Haën 04272, Nemčija)
- destilirana voda

Priprava delovnih reagentov:

- PBS pufer

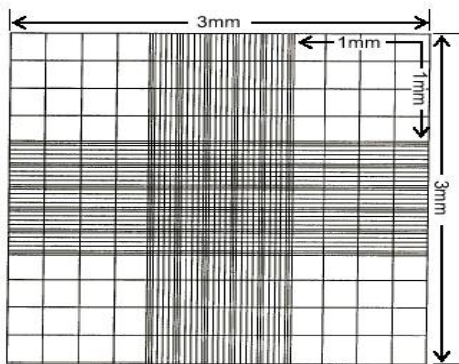
40 g NaCl, 1 g KCl, 1,2 g KH_2PO_4 in 9,03 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ raztopimo v 400 mL destilirane vode in pH uravnamo na 7,4. Z destilirano vodo nato dopolnimo do 500 mL in steriliziramo (0,2 μm filter). Tako pripravljeno raztopino pred uporabo 10 x redčimo z avtoklavirano vodo.

Potek dela:

- 1.) Suspenzijo celic dobro premešamo s pipeto, da razbijemo morebitne skupke celic (dvojčki, trojčki,...) in pripravimo čimbolj homogeno suspenzijo celic. Vilusni enterociti imajo namreč težnjo po združevanju,
- 2.) Zmešamo 20 μL celične suspenzije z 20 μL barvila tripan modro, predhodno zmešanega s PBS pufrom v razmerju 1:2,
- 3.) Na Neubauerjevo komorico položimo krovno stekelce in ga namestimo tako, da pokriva obe shrambici Neubauerjeve komorice,
- 4.) S pipeto naneseemo 10 μL celične suspenzije z dodanim barvilom tripan modro v obe shrambici Neubauerjeve komorice tako, da se z nastavkom pipete previdno dotaknemo roba krovnega stekelca in pustimo, da se shrambica napolni zaradi kapilarnih sil (kapilarni tok), pri čemer ne sme biti niti preveč niti premalo napolnjena,
- 5.) Neubauerjevo komorico damo pod mikroskop pod 200 x povečavo in v štirih stranskih poljih (S1, S2, S3, S4) ločeno preštejemo vse viabilne in neviabilne celice,
- 6.) Izračunamo odstotek viabilnih celic in odstotek vilusnih enterocitov

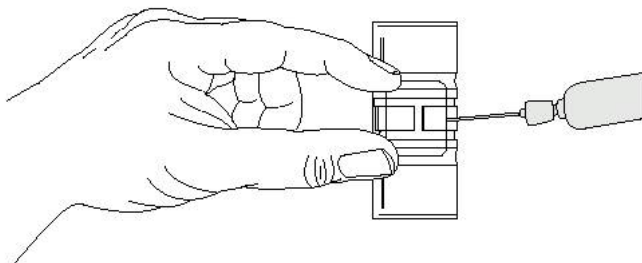
3.4.1 Štetje vilusnih enterocitov z Neubauerjevo komoro

Za oceno skupnega števila enterocitov v posamezni kulturi, smo uporabili Neubauerjevo števno komoro (slika 7). To je steklena ploščica z dvema osrednjima ploščadma, ki sta natančno 0,1 mm pod nivojem ravnine stranskih grebenov. Vsaka sredinska ploščad ima natančno vgravirano mrežico s standardizirano velikostjo kvadratkov (slika 5). Takšna mrežica je sestavljena iz devetih velikih kvadratov (1mm x 1mm), tako da je volumen na enem kvadratu 10^{-4} ml ($1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0,1\text{mm} = 0,1\text{mm}^3 = 10^{-4} \text{cm}^3$ oz. 10^{-4} mL).



Slika 5: Mrežica v Neubauerjevi komori.

Neubauerjevo komoro pripravimo tako, da nanjo položimo krovno stekelce, ki mora pokrivati obe osrednji ploščadi. Nato s pipeto dobro premešamo suspenzijo celic. Homogeno suspenzijo nanese v obe ploščadi komore, tako da konico pipete previdno prislonimo na rob krovnega stekelca, kjer kapilarni tok sam potegne vsebino v števeni prostor (slika 6). Komora ne sme biti niti preveč niti premalo napolnjena. Volumen, potreben za pravilno napolnjeno komoro, je približno 10 μL . Pod mikroskopom se najprej pod 100x povečavo orientiramo po mrežici. Celice nato štejemo pod 200x povečavo v štirih stranskih kvadratih (S1, S2, S3, S4) površine 1 mm^2 (slika 5).



Slika 6: Nanos homogene celične suspenzije v ploščad Neubauerjeve komore.

Izračun:

A) Celokupno število celic/mL = $n \times 10^4 \times f$

n = povprečno število prešteti celic v polju površine 1 mm^2

$$\blacksquare n = (n_{S1} + n_{S2} + n_{S3} + n_{S4})/4$$

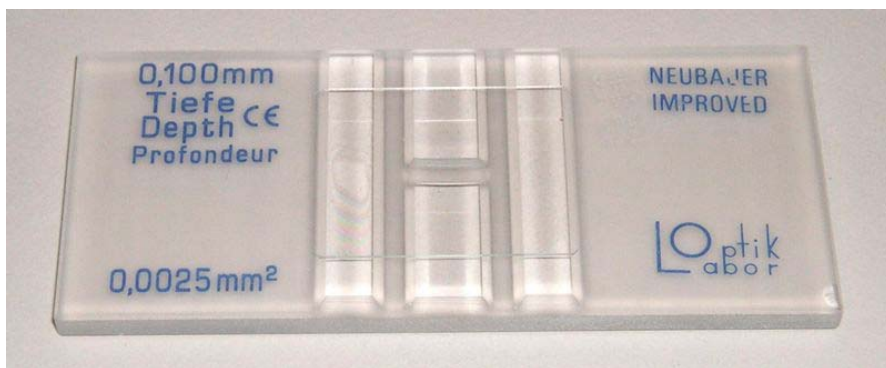
10^4 = volumen polja, ki ima površino 1 mm^2

f = dilucijski faktor (=1, kjer nismo redčili celične suspenzije)

B) Celokupno število celic = (celokupno število celic/mL) x V

V = volumen celične suspenzije

C) % viliusnih enterocitov = $\frac{(\text{celokupno število viliusnih enterocitov})}{(\text{celokupno število celic})} \times 100$



Slika 7: Neubauerjeva komora.

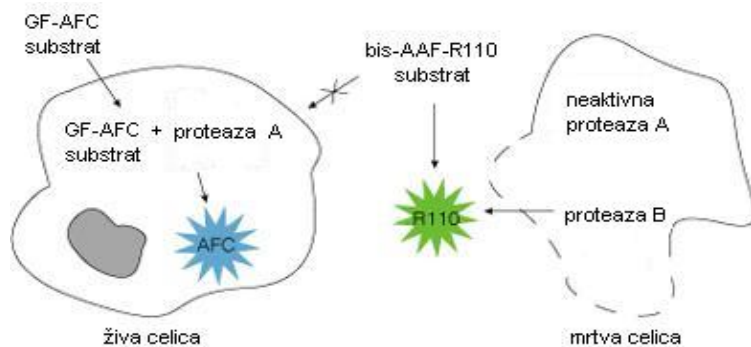
3.5 Spremljanje živosti celic z metodo MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity

MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay je fluorescenčni test, s katerim lahko simultano izmerimo relativno število živih in mrtvih celic v celični populaciji. Test temelji na merjenju dveh proteaznih aktivnosti. Prva je označevalec celične viabilnosti (živosti), druga pa označevalec citotoksičnosti. Aktivnost "žive" celične proteaze je omejena na intaktne žive celice in jo izmerimo s pomočjo fluorogenega peptida glicil-fenilalanil-aminofluorokumarina (GF-AFC). Ta substrat prehaja celično membrano in tako vstopa v žive celice, kjer ga "živa" celična proteaza cepi do AFC, ki fluorescira (slika 8). Dobljen fluorescentni signal je sorazmeren številu živih celic (38).

Če celica izgubi membransko integriteto, postane "živa" celična proteaza neaktivna in začne uhajati v medij; prav tako se iz celice sprosti tudi "mrtva" celična proteaza. Za merjenje aktivnosti "mrtve" celične proteaze, je v testu prisoten še drug fluorogeni peptidni substrat bis-alanil-alanil-fenilalanil-rodamin 110 (bis-AAS-R110), ki ne prehaja

celične membrane, zato ne pride do fluorescentnega signala pri živih celicah. Iz mrtvih celic sproščena "mrtva" celična proteaza pretvori bis-AAS-R110 v R110 (slika 8). Produkta obeh proteaz (AFC in R110) fluorescirata, vendar imata različen ekscitacijski in emisijski spekter, kar omogoča, da ju lahko detektiramo hkrati (38).

Flourescenco produkta AFC merimo pri 450ex/505em, medtem ko fluorescenco R110 merimo pri 485ex/520em.



Slika 8: Princip razlikovanja med živimi in mrtvimi celicami z določanjem aktivnosti dveh proteaz.

Reagenti in kemikalije:

- MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay (Promega G9200, ZDA)
 - GF-AFC substrat (10 μ L, 100 mM v DMSO, (G608A))
 - bis-AAS-R110 substrat (10 μ L, 100 mM v DMSO, (G609A))
 - pufer (10 mL, (G610A))
- RPMI 1640 (kompletiran) s HEPES-om (Sigma R5886, Nemčija)

Priprava in pogoji shranjevanja delovnega reagenta:

(MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay Reagent)

- A) Celoten test, ki se shranjuje na -20°C , segrejemo na 37°C , tako da ga prenesemo v inkubator ali na vodno kopel;
- B) Oba substrata GF-AFC in bis-AAS-R110 prenesemo v vsebnik s pufrom (se nahaja v setu) in premešamo, pri čemer dobimo reagent (slika 9).

Pri sobni temperaturi je reagent uporaben 24h. Neuporabljeni substrata GF-AFC in bis-AAS-R110 ter pufer so lahko shranjeni 7 dni na 4°C , aktivnost se jim pri tem ne

zmanjša. Če izvajamo več testiranj v časovnih razmikih, je smiselno substrata in pufer na začetku alikvotirati in pred vsakim testiranjem pripraviti "svež" reagent.

Izvedba testa:

Preglednica I: Postopek dela za merjenje živosti celic

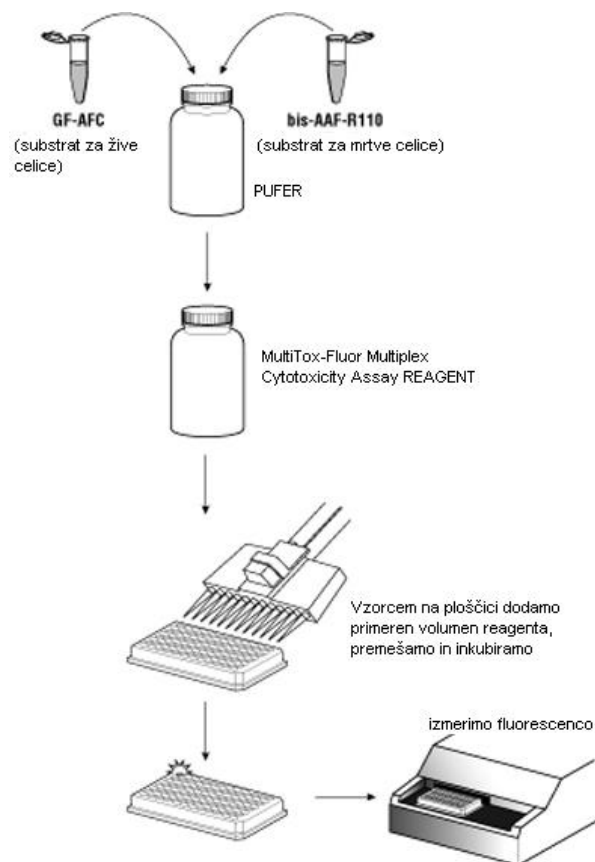
	Reagenčna slepa			Vzorec		
Mesto na mikrotitrski plošči	1A	1B	1C	2A	2B	2C
Kompletiran medij RPMI 1640 (μL)	100	100	100	-	-	-
Vzorec (homogena celična kultura) (μL)	-	-	-	100	100	100
Reagent (μL)	100	100	100	100	100	100

* Premešamo in inkubiramo najmanj 30 minut na 37°C.

Nato izmerimo fluorescenco:

- viabilnost (živost celic): ekscitacija 400 nm, emisija 505 nm;
- citotoksičnost: ekscitacija 485 nm, emisija 520 nm.

Meritve živosti celic in citotoksičnosti so inverzno povezane in radiometrične. Tako lahko neodvisna testa živosti (viabilnosti) in citotoksičnosti služita tudi kot interna kontrola.



Slika 9: Postopek dela pri MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity testu

Izračun odstotka živih celic po 48h:

$$\frac{(F_{vz.}(48h) - F_{sl.}(48h)) \times 100\%}{(F_{vz.}(0h) - F_{sl.}(0h))} = \dots \text{vlabljenost po 48h v \%}$$

- $F_{vz.}$ = Fluorescenca vzorca
- $F_{sl.}$ = Fluorescenca slepega vzorca

3.6 Spremljanje proliferacije celic z luminiscentno metodo celične živosti (CellTiter-Glo[®])

Luminiscentna metoda celične živosti (CellTiter-Glo[®]) je metoda za določanje koncentracije ATP v celičnih kulturah intestinalnih epitelijskih celic. Po lizi celic izmerimo luminiscentni signal, ki je sorazmeren s količino prisotne ATP. Za tvorbo tega

signala je bistvena termostabilna luciferaza, ki katalizira pretvorbo luciferina v oksiluciferin ob prisotnosti ATP (44).

Postopek izvedbe testa:

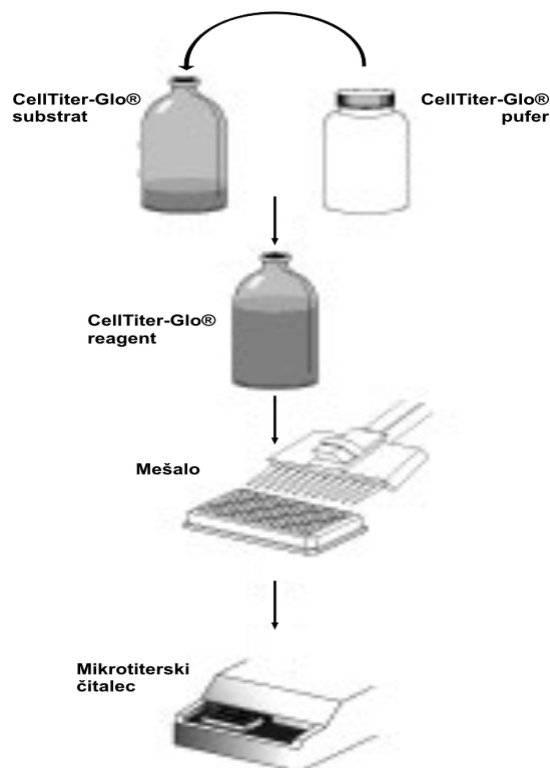
- a. Odmrznili smo CellTiter-Glo[®] pufer in pustili, da doseže sobno temperaturo preden smo ga uporabili.
- b. Liofiliziran CellTiter-Glo[®] substrat smo prav tako pustili, da doseže sobno temperaturo.
- c. Celoten volumen (10 ml) CellTiter-Glo[®] pufra smo prenesli v stekleničko s CellTiter-Glo[®] substratom in tako pripravili CellTiter-Glo[®] reagent (slika 10).
- d. Stekleničko smo rahlo premešali s pomočjo vibracijskega mešala tako, da smo dobili homogeno raztopino.
- e. Po potrebi lahko reagent razdelimo na več delov in ga hranimo pri temperaturi - 20°C do 21 tednov pri čemer pride do približno 3% znižanja aktivnosti.
- f. Nanesli smo po 100 µl celic v suspenziji v dveh paralelkah na mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami primerno za merjenje luminiscence.
- g. Nato smo nanesli po 100 µl slepega vzorca (samo kultivacijski medij brez celic) za meritev luminiscence ozadja.
- h. Tako pripravljeno ploščo smo pustili pri sobni temperaturi približno 30 minut, da se vzpostavi ravnotežje.
- i. Pripravili smo 10,0 µM standardno raztopino ATP v kultivacijskem mediju za izdelavo umeritvene krivulje.
- j. V 7 vdolbinic na mikrotitrski plošči smo nanesli po 100 µl kultivacijskega medija v dveh paralelkah.
- k. V prvo vdolbinico smo dodali 25 µl 10,0 µM standardne raztopine ATP in premešali s pipetiranjem. Nato smo prenesli 25 µl raztopine iz prve v drugo vdolbinico in ponovno premešali s pipetiranjem. Tako nadaljujemo do zadnje vdolbinice pri kateri smo 25 µl raztopine zavrgli.
- l. Dodali smo 100 µl CellTiter-Glo[®] reagenta v vdolbinice s kultivacijskim medijem (količina dodanega reagenta naj bo enaka količini tekočine v posamezni vdolbinici).
- m. Lizo celic smo sprožili z mešanjem na eliptičnem mešalu 2 minuti.

n. Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali pri sobni temperaturi 10 minut in s tem stabilizirali luminiscenčni signal.

o. Izmerimo luminiscenco.

Reagenti in kemikalije:

- CellTiter-Glo[®] Luminiscent Cell Viability Assay kit (Promega, G7571, ZDA)
- RPMI 1640 (kompletiran) s HEPES-om (Sigma R5886, Nemčija)



Slika 10: Postopek dela pri CellTiter-Glo[®] Luminiscent Cell Viability testu.

3.7 Priprava celičnega lizata

Reagenti in kemikalije:

- NaCl (Fluka 71383, Švica)
- destilirana voda

Priprava fiziološke raztopine (0,9 % NaCl): 9g NaCl raztopimo v 1L destilirane vode.

Postopek priprave celičnega lizata:

- a.) del celične kulture smo prenesli v centrifugirko in centrifugirali 10 minut pri 129 x g (RCF - relativna centrifugalna sila);
- b.) supernatant smo odlili, sediment resuspendirali v 10 mL fiziološke raztopine in centrifugirali 10 minut pri 129 x g (RCF - relativna centrifugalna sila); ta korak smo še enkrat ponovili, da je nastal bister, brezbarven supernatant;
- c.) supernatant smo odlili ter s pipetiranjem previdno odstranili preostanek fiziološke raztopine nad sedimentom;
- d.) sediment smo resuspendirali v 250 μ L destilirane vode, nato vsebino centrifugirke prenesli v plastično epruveto z zamaškom ($V = 1,5$ mL);
- e.) epruvete smo dali za 30 minut na -20°C in nato za 5 minut na 37°C ; ta korak še enkrat ponovili.

* Celični lizat mora biti homogen, zato epruveto tik pred pipetiranjem še temeljito premešamo z vibracijskim mešalom (Vortex).

* Tik pred pipetiranjem smo v podganje celične lizate dodali še Titon-X 100 in sicer 10 μ L/800 μ L lizata.

3.8 Merjenje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu

Za določanje koncentracije proteinov v celičnem lizatu smo uporabili metodo po Bradfordu, ki temelji na vezavi barvila Coomassijevega briliantnega modrila v kislem na proteine oz. na bazične in aromatske aminokisline (primarno na arginin, lizin in histidin). Posledica te vezave je sprememba barve iz rdeče v modro. Posledično se spremeni oz. premakne tudi valovna dolžina absorpcijskega maksimuma barvila iz 465 nm na 595 nm. Absorbanca, ki jo izmerimo pri 595 nm, je sorazmerna količini proteina v vzorcu (39, 40, 41) (slika 11).

Proste amino kisline, peptidi in proteini z nizko molekulsko maso ne tvorijo barvnega kompleksa s Coomassijevim briliantnim modrim. Praviloma mora znašati masa peptida 3000 Da, da ga lahko analiziramo na ta način. Metoda se izvaja pri sobni temperaturi (39, 40, 41).

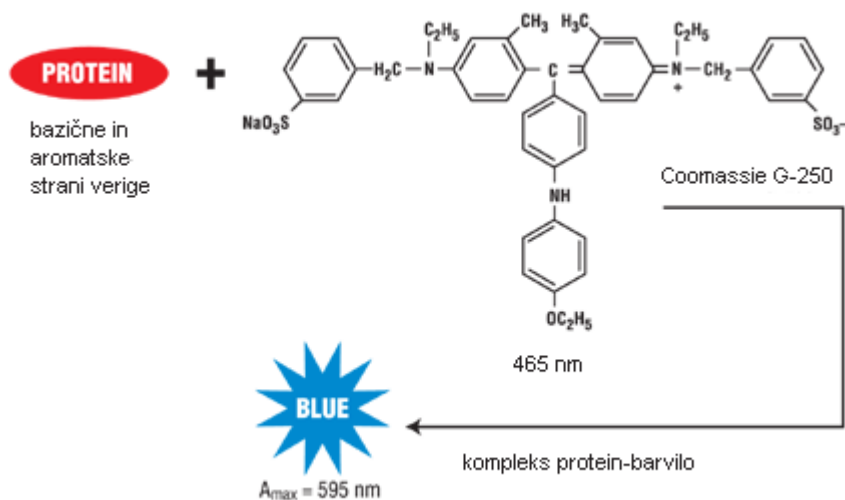
Hidrofobne ionske interakcije stabilizirajo modro (anionsko) obliko barvila, vendar je kompleks barvilo-protein obstojen le v določenem časovnem intervalu t.j. najmanj 30 minut.

Prednosti metode:

- Bradford metoda je združljiva z reducirajočimi sladkorji, tioli, pufri, kelatnimi sredstvi in ostalimi reducenti.
- Uporabna je za določevanje koncentracij proteinov od 100 – 1500 µg/mL (z Micro izvedbo tudi 1-25 µg/mL)
- Uporabna tudi za mikrotitrne plošče

Slabosti metode:

- Nekompatibilnost s površinsko aktivnimi snovmi oz. detergenti pri koncentracijah, ki jih običajno uporabljamo za raztapljanje membranskih proteinov. Takšna prisotnost površinsko aktivnih snovi (tudi v majhnih koncentracijah) vodi v nastanek precipitacije reagenta.
- Zaradi kislosti Coomassiejevega briljantnega modrila ni možna analiza majhnega števila proteinov, zaradi njihove slabe topnosti v kislem reagentu.
- Coomassie barvila obarvajo tudi steklene kivete ali kivete iz kvarčnega stekla. Da se izognemo čiščenju kivet, se v ta namen uporabljajo kivete iz polistirena, ki jih po uporabi zavržemo.



Slika 11: Shema reakcije pri merjenju koncentracije proteinov z metodo Bradford.

Reagenti in kemikalije:

- Total Protein Kit, Micro (Sigma TP100, Nemčija):
 - barvni reagent (B 5809)
Brilliant Blue G, 0,35mg/mL
 - standardna raztopina proteina (P 9744)
humani albumin, 0,3 mg/mL
- fiziološka raztopina (0,9% NaCl)
- destilirana voda

Priprava delovnih reagentov:

- standardne raztopine proteina

Izhajali smo iz standardne raztopine proteina s koncentracijo 0,3 mg/mL, ki je bil prisoten v setu Total Protein Kit, Micro. Z ustreznim redčenjem smo pripravili raztopine s koncentracijami 0,15 mg/mL; 0,075 mg/mL; 0,05 mg/mL; 0,025 mg/mL in 0,0125mg/mL.

- testna raztopina (redčen barvni reagent)

1 volumski del barvnega reagenta (rdeče barve) redčimo s 4 volumskimi deli destilirane vode. Tako pripravljena testna raztopina (rjave barve) je stabilna 14 dni, če je shranjena pri sobni temperaturi (18-26°C C) ali dlje, če se shranjuje v hladilniku (2-8°C).

Izvedba testa:

Preglednica II: Postopek dela za merjenje koncentracije proteinov.

	Reagenčna slepa			Standard			Vzorec		
Mesto na mikrotitrski plošči	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C
Fiziološka raztopina (μL)	25	25	25	-	-	-	-	-	-
Standard (μL)	-	-	-	25	25	25	-	-	-

Vzorec (μL)	-	-	-	-	-	-	25	25	25
Testna raztopina (μL)	200	200	200	200	200	200	200	200	200

* Inkubiramo 5 minut pri sobni temperaturi. Nato izmerimo absorbanco pri 595 nm.

Opomba: Za merjenje koncentracije proteinov, na modelu miši, smo uporabili dve paralelki!

Iz šestih različnih koncentracij standardne raztopine proteina smo dobili enačbo umeritvene premice, iz katere smo na osnovi absorbanc vzorcev izračunali koncentracije proteinov v posameznem vzorcu ($C = A_{vz} - A_{sl} / y$)

C = koncentracija proteinov

A_{vz} = absorbanca vzorca

A_{sl} = absorbanca reagenčne slepe

y = iz enačbe umeritvene premice

* Koncentracijo proteinov v celičnih lizatih se lahko izračuna tudi po formuli, ki je navedena spodaj.

Enačba 1: Izračun koncentracije proteinov v vzorcu

$$\frac{(A_{vz} - A_{sl})}{(A_{st} - A_{sl})} \times C_{st} = \dots \frac{g}{L} \text{ proteina}$$

A_{vz} = absorbanca vzorca

A_{st} = absorbanca standarda

A_{sl} = absorbanca reagenčne slepe

C_{st} = koncentracija standarda

3.9 Merjenje aktivnosti maltaze in saharaze z metodo po Dahlqvistu

Disaharidaze hidrolizirajo disaharide v dva monosaharida, od katerih je vsaj eden glukoza. Tako maltaza hidrolizira maltozo v dve molekuli glukoze, saharaza pa hidrolizira saharozo v molekulo glukoze in fruktoze (reakcija I in II).

I.) Maltoza —maltaza→ glukoza + glukoza

II.) Saharoza —saharaza→ glukoza + fruktoza

Specifično aktivnost maltaze in saharaze v celičnem lizatu določimo po Dahlqvistovi metodi na osnovi hitrosti nastajanja produkta – glukoze iz dodanega specifičnega substrata (maltoze oz. saharoze). Po določenem času ustavimo delovanje encima s Tris-HCl pufrom, ki ga v našem primeru vsebuje TGO reagent. V nadeljevanju določimo količino sproščene glukoze z glukoza-oksidadnim testom, ki poteče v dveh stopnjah. V prvi stopnji (reakcija III) encim glukozaoksidaza oksidira glukozo v glukonsko kislino, pri čemer nastane tudi vodikov peroksid, ki pa sodeluje v naslednji stopnji (reakcija IV). V tej stopnji se s pomočjo peroksidaze in ustreznega reagenta tvori obarvan produkt (42).



▪ Spektrofotometrično merjenje absorbance obarvanega produkta (kinonimin) pri dveh valovnih dolžinah (620 nm in 450 nm). Vrednosti, ki jih spektrofotometer izpiše, so že izračunane razlike med absorbancama obeh filtrov (A450 – A620).

Reagenti in kemikalije:

- NaOH (J.T. Baker S4034, Nizozemska)
- HCl (Merck 109057, Nemčija)
- maltoza (Sigma M5895, Nemčija)
- saharoza (Sigma S0389, Nemčija)
- maleinska kislina (Sigma M0375, Nemčija)
- Tris-baza (Fluka Biochemica 93362, Švica)
- standardna raztopina glukoze (Glucose GOD/PAP, Randox GL2614, Velika Britanija)
- destilirana voda
- glukoza-oksidadni reagent (Glucose GOD/PAP, Randox GL2614, Velika Britanija):
 - fosfatni pufer (50mmol/L, pH 7,0)
 - MOPS pufer (50 mmol/L, pH 7,0)
 - Fenol (11 mmol/L)
 - 4-aminofenazon (0,77 mmol/L)
 - Glukoza-oksidadza ($\geq 1,5$ kU/L)
 - Peroksidaza ($\geq 1,5$ kU/L)

Priprava delovnih reagentov:

- maleatni pufer (0,1 mol/L, pH 6,0)

1,16 g maleinske kisline raztopimo v 15,3 mL 1M NaOH in dodamo približno 50 mL vode, nato redčimo do 100mL in uravnavamo pH na 6,0.

▪ raztopina substrata (0,0056M)

a.) raztopina maltoze: 20,16 mg maltoze raztopimo v 1 mL maleatnega pufru

b.) raztopina saharoze: 19,15 mg saharoze raztopimo v 1 mL maleatnega pufru

▪ standardna raztopina glukoze (0,556 mmol/L)

V setu je glukozni standard s koncentracijo 5,56 mmol/L oz 1 mg/mL. Pripravimo standard s koncentracijo 0,1 mg/mL z redčitvijo (1 volumski delež glukoznega standarda in 9 volumskih deležev destilirane vode).

▪ Tris-HCl pufer (0,5 mol/L, pH 7,0)

15,25 g Tris-baze raztopimo v 110 mL 1M HCl in z destilirano vodo redčimo na 250 mL, pH vrednost uravnavamo na 7,0.

▪ TGO reagent (Tris Glukoza-Oksidazni reagent)

1 del glukoza-oksidadnega reagenta (že pripravljen v glukoznem setu) zmešamo z 2 deloma Tris-HCl pufru.

Izvedba testa:

Preglednica III: Postopek dela za merjenje aktivnosti maltaze in saharaze v celičnem lizatu.

	Reagenčna slepa	Standard	Vzorčna slepa	Vzorec (maltaza)	Vzorec (saharaza)
Mesto na mikrotitrski plošči	1A 1B 1C	2A 2B 2C	3A 3B 3C	4A 4B 4C	5A 5B 5C
H ₂ O (μL)	20 20 20	10 10 10	10 10 10	- - -	- - -
Vzorec (μL)	- - -	- - -	10 10 10	10 10 10	10 10 10
Ekvilibracija 10 minut na 37°C.					

Glikozni standard (μL)	- - -	10 10 10	- - -	- - -	- - -
Standard – maltoza ali saharoza (μL)	- - -	- - -	- - -	10 10 10 (maltoza)	10 10 10 (saharoza)
Previdno premešamo in inkubiramo 60 minut na 37°C.					
TGO reagent (μL)	100 100 100	100 100 100	100 100 100	100 100 100	100 100 100
Premešamo in inkubiramo 60 minut na 37°C. Izmerimo absorbanco vzorcev.					

Opomba: Za merjenje aktivnosti maltaze in saharaze, na modelu miši, smo uporabili dve paralelki!

Enačba 2: Izračun specifične aktivnosti maltaze in saharaze.

$$\frac{(A_{vz} - A_{vz \cdot sl}) \times d \times 10^5}{(A_{st} - A_{sl}) \times t \times p \times M \times g} = \dots \text{ IU/g proteinov}$$

A_{vz} = absorbance vzorca

$A_{vz \cdot sl}$ = absorbanca vzorčne slepe

A_{st} = absorbanca standarda

A_{sl} = absorbanca reagenčne slepe

d = redčitev homogenata (=1 za miš in 5 za podgano)

t = čas prve inkubacije v minutah (= 60)

p = koncentracija proteinov v homogenatu (g/L)

M = molekulska masa glukoze (= 180)

g = število molekul glukoze, ki nastanejo pri hidrolizi substrata (pri maltazi → 2, pri saharazi → 1)

10^5 = faktor pretvorbe mg v g proteinov, mmol v μ mol in razredčitev standarda

* Aktivnosti maltaze in saharaze so izražene kot specifične vrednosti IU/g proteina, kjer je IU katalitična aktivnost maltaze oz. saharaze, ki je potrebna za razgradnjo 1 μ mol substrata v 1 minuti pri danih pogojih (37°C, pH 6,0 in pri 0,1M koncentraciji substrata).

* IU je mednarodna enota (International Unit).

3.10 Laboratorijski material

Aparature:

- inkubator Heraeus (Thermo Scientific, Ulm, Nemčija)
- centrifuga (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- laminarij (Variolab Waldner, Nemčija)
- mikrotitrski čitalec Safire² (Tecan, Grödig, Avstrija)
- mikrotitrski čitalec Sunrise (Tecan, Grödig, Avstrija)
- vibracijsko mešalo Bio Vortex V1 (Biosan, Riga, Latvija)
- analitska tehtnica (Gibertini, Milano, Italija)
- tehtnica (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- pH meter (Radiometer Copenhagen, Danska)
- inverzni svetlobni mikroskop CX40-SL (Olympus, Japonska)
- inverzni svetlobni mikroskop CKX41 (Olympus, Japonska)
- mikroskopski sistem cell R Olympus IX81 (Olympus, Japonska)
- digitalni fotoaparati C-7070 (Olympus, Japonska)
- Dewarjeva posoda s tekočim dušikom

Delovni pribor:

- polnilna pipeta (Biohit, Helsinki, Finska)
- pipete: 0,5-10 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L (Biohit, Helsinki, Finska)
- steklene pipete: 5mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL
- plastični nastavki za pipete (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)
- plastične epruvete z zamaškom: 1,5 mL in 2,0 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)
- centrifugirke: 15 mL in 50 mL (TPP, Trasadingen, Švica)
- mikrotitrne ploščice (TPP, Trasadingen, Švica)

- Neubauerjeva komora (BRAND, Wertheim, Nemčija)
- plinski gorilnik
- injekcijske brizge
- stojala za epruvete in centrifugirke
- steklovina
- parafilm
- stoparica
- staničevina
- laboratorijska halja in gumijaste rokavice za enkratno uporabo

4 REZULTATI IN DISKUSIJA

4.1 Mišji model

4.1.1 Število celic

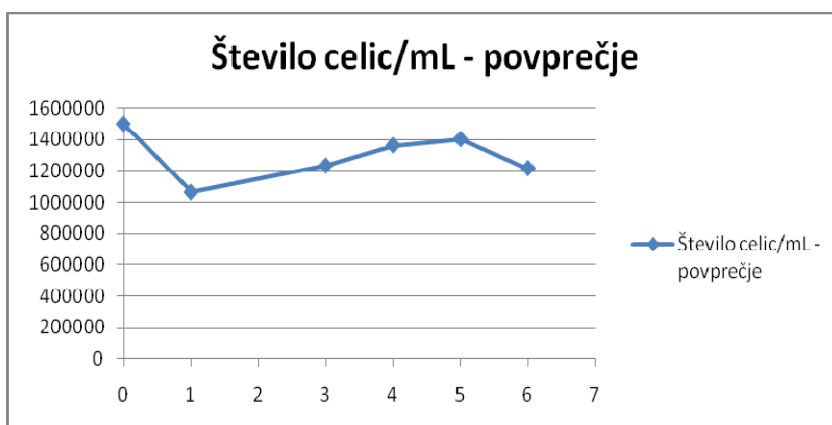
Število celic/mL kulture smo izračunali iz podatkov, ki smo jih dobili od predhodne raziskovalne skupine (Jerneja Gosak, Anja Eržen) (preglednica 1). Za število celic ob času T2 nismo imeli podatkov (preglednica 1).

Preglednica 1: Število celic v šestih kulturah mišjih intestinalnih epiteljskih celic tankega črevesa v obdobju šest tedenskega kultiviranja. T = teden kultiviranja.

Število celic/mL $\rightarrow \times 10^6$								
Čas (tedni)	kultura 1	kultura 2	kultura 3	kultura 4	kultura 5	kultura 6	povprečje	SD
T0	1,84	1,92	0,60	1,92	1,24	1,86	1,50	0,55
T1	2,42	1,30	0,96	1,58	1,28	0,64	1,06	0,48
T3	0,88	0,94	1,16	1,06	2,56	0,64	1,23	0,58
T4	1,18	0,70	0,80	0,52	1,28	1,26	1,36	0,50
T5	1,28	0,82	1,92	1,58	0,92	1,70	1,40	0,58
T6	1,40	0,70	1,96	1,52	1,14	1,20	1,22	0,51

Preglednica 2: Vrednosti *t*-testa za število celic/mL skozi šest tedensko obdobje kultiviranja glede na začetno vrednost *T0*. ↓ = statistično značilno/neznačilno nižja vrednost.

	t-vrednost	p-vrednost	Statistična značilnost
T0 → T1	2,33	0,067087	Neznačilno ↓
T0 → T3	0,71	0,507349	Neznačilno ↓
T0 → T4	0,69	0,520127	Neznačilno ↓
T0 → T5	0,25	0,815476	Neznačilno ↓
T0 → T6	0,90	0,408952	Neznačilno ↓



Graf 1: Število celic/mL – povprečje vrednosti skozi šest tedensko obdobje kultiviranja mišjih intestinalnih epiteljskih celic.

4.1.2 Delež vilusnih enterocitov

Delež vilusnih enterocitov v kulturi smo izračunali iz podatkov, ki smo jih dobili od predhodne raziskovalne skupine (Jerneja Gosak, Anja Eržen) (preglednica 3). Za število oziroma odstotek vilusnih enterocitov ob časih T1-T4 in T6 nismo imeli podatkov.

Preglednica 3: Delež vilusnih enterocitov v šestih kulturah mišjih intestinalnih epiteljskih celic tankega črevesa ob času kultiviranja T0 in T5. T = teden kultiviranja.

Delež vilusnih enterocitov (%)								
Čas (tedni)	kultura 1	kultura 2	kultura 3	kultura 4	kultura 5	kultura 6	povprečje	SD
T0	13	16	19	15	12	13	14,7	2,6
T5	2	2	10	10	6	2	5,3	3,9

Preglednica 4: Vrednosti t-testa za delež vilusnih enterocitov ob času kultiviranja T5 glede na začetno vrednost T0. ↓ = statistično značilno/neznačilno nižja vrednost.

	t-vrednost	p-vrednost	Statistična značilnost
T0 → T5	6,75	0,001082	Značilno ↓

Število celic/mL kulture se pri mišjem modelu giblje v območju 10^6 . Ob času T0 je moč opaziti najvišje število celic skozi celotno obdobje kultiviranja (povprečje znaša $1,50 \times 10^6$ celic/mL) (graf 1). Ob času T1 je opazno znižanje števila celic na povprečno $1,06 \times 10^6$ celic/mL kulture. Ta sprememba pa ni statistično značilna ($p=0,067$) in jo je moč pripisati stresu celic po sami izolaciji. Za število celic ob času T2 nismo imeli podatkov. Kljub temu pa je število celic ob času T3 nekoliko višje kot ob času T1 in znaša v povprečju $1,23 \times 10^6$ celic/mL kulture. Tudi ta sprememba ni statistično značilna ($p=0,507$) glede na začetno vrednost T0. To je pričakovano, saj celice po izolaciji potrebujejo nekaj dni, da se adaptirajo in ponovno vzpostavijo biokemijske funkcije. Nadalje je število celic v kulturi ob času T4 še nekoliko naraslo (v povprečju za $1,36 \times 10^6$ celic/mL), vendar tudi ta sprememba ni statistično značilna ($p=0,520$) glede na začetno vrednost T0. Ob času T5 je sicer število celic v kulturi minimalno naraslo (povprečje znaša $1,40 \times 10^6$), vendar ne toliko, da bi bil to znak kakšnih ekstremnih dogajanj v sami celični kulturi. Ta minimalna sprememba je statistično neznačilna ($p=0,815$) glede na začetno vrednost ob času T0. Zadnji teden kultiviranja število celic pade na povprečno vrednost $1,22 \times 10^6$ celic/mL.

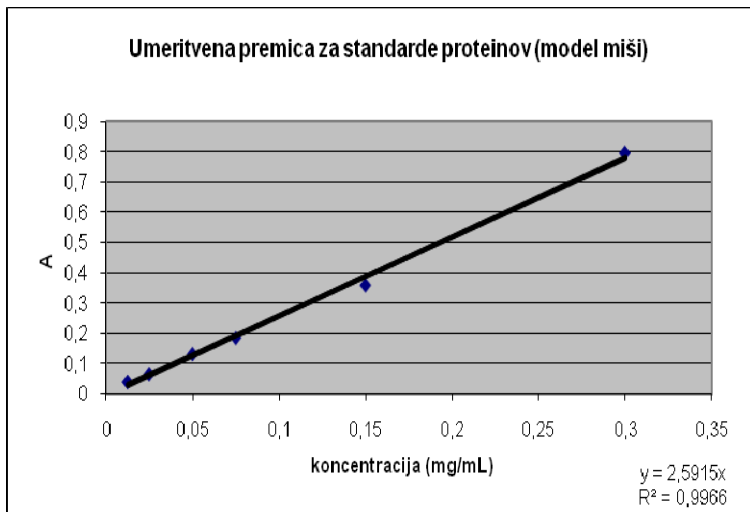
Sprememba je statistično neznačilna ($p=0,409$) glede na začetno vrednost ob času T0. Glede na to, da se število celic/mL kulture tudi po šestih tednih kultiviranja giblje v območju 10^6 , bi bilo smiselno kulture, ki so neokužene, še dodatno kultivirati.

Ob času T0 je bilo opravljeno tudi štetje vilusnih enterocitov. Iz podatkov smo izračunali odstotek le teh (preglednica 3). Na začetku kultiviranja je odstotek vilusnih enterocitov v kulturi znašal v povprečju 14,7%. Vilusni enterociti so bili ponovno prešteti ob času T5. V tem obdobju je odstotek občutno padel in znašal v povprečju 5,3%. Ta sprememba je statistično značilno nižja ($p=0,001$) glede na začetno vrednost ob času T0. Rezultat sovпада z relativno aktivnostjo maltaze in saharaze, saj so vilusni enterociti nosilci disaharidaznih aktivnosti, ki pa v enakem obdobju prav tako upadejo (gledano v povprečju).

4.1.3 Spremljanje relativne aktivnosti maltaze in saharaze

Encimsko aktivnost smo izmerili v celičnih lizatih, ki pa so bili že predhodno pripravljene in zamrznjeni v tekočem dušiku. Celični lizati so bili obdelani po protokolu in pripravljene za izvedbo meritev. Koncentracijo proteinov smo izmerili z metodo Bradford, encimsko aktivnost pa smo izmerili z metodo Dahlqvist. Za umeritveno premico (Bradford) smo uporabili serijo standardnih raztopin, ki smo jih pripravili z redčenjem humanega albumina s koncentracijo 0,3 mg/mL (graf 2) (preglednica 5). Redčenje je bilo opravljeno z destilirano vodo. Pri obeh metodah je bil vsak vzorec apliciran na mikrotitersko ploščo v dveh paralelkah.

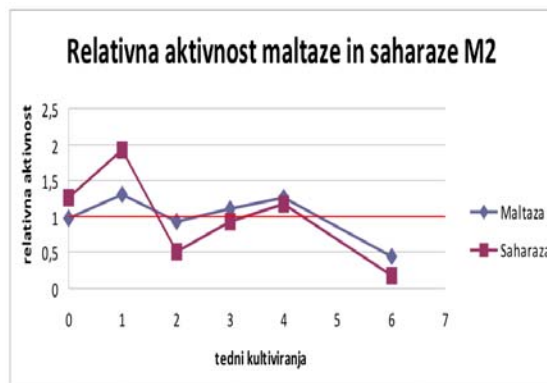
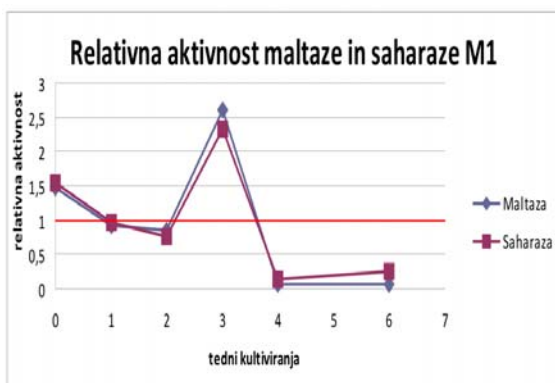
Preglednica 5: serija standardnih redčitev.

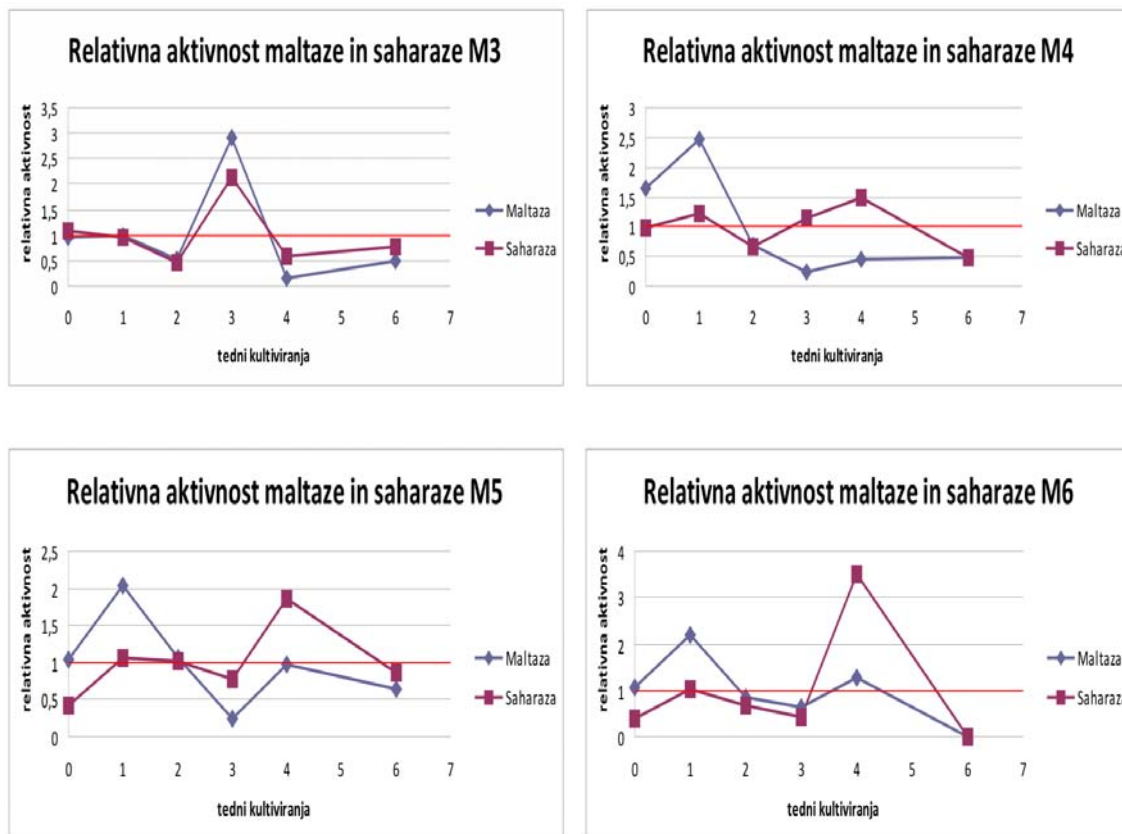


Koncentracija standarda (mg/mL)	Absorbanca (A)
0,0125	0,0388
0,025	0,0644
0,05	0,1308
0,075	0,1842
0,15	0,3580
0,3	0,7949

Graf 2: Umeritvena premica za proteine

Relativne aktivnosti maltaze in saharaze v posamezni kulturi skozi obdobje kultiviranja so grafično prikazane.

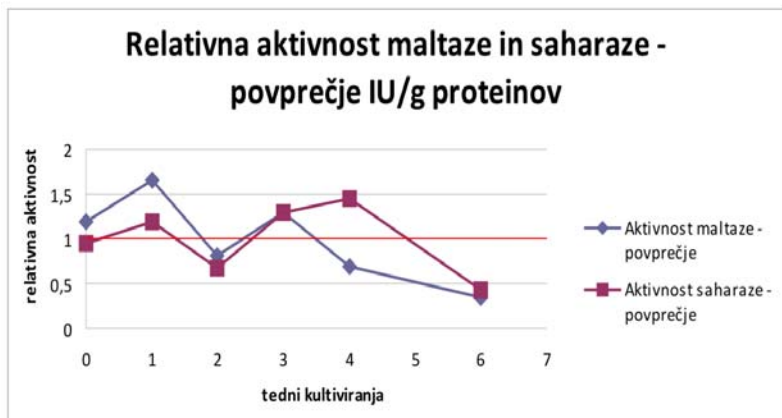




Graf 3: Relativne aktivnosti maltaze in saharaze v šestih kulturah mišjih intestinalnih epiteljskih celic tankega črevesa v obdobju pet tedenskega kultiviranja.

Relativna aktivnost maltaze in saharaze se pri posamezni kulturi giblje zelo podobno. Trendi so med seboj primerljivi. Pričakovali smo, da se bo po enem tednu kultiviranja (T1) aktivnost pri posamezni kulturi nekoliko dvignila glede na začetno vrednost T0. To se je v štirih primerih res zgodilo (M2, M4, M5, M6) (graf 3). To je najbrž posledica adaptacije posamezne kulture, ki je bila potrebna v času T0 in je trajala do T1. Pri kulturi M1 je že ob času T1 opazen padec aktivnosti tako maltaze kot tudi saharaze glede na začetno vrednost T0. Pri kulturi M3 je opazen samo padec aktivnosti saharaze ob času T1, medtem ko je aktivnost maltaze za malenkost višja glede na začetno vrednost T0. Zanimivo je videti, da se trendi gibljejo zelo podobno oz. enako. Ko se poveča aktivnost maltaze v določeni točki kultiviranja, se poveča tudi aktivnost saharaze v enaki točki (izjeme so le točke M3T1, M4T3 in M4T6) (graf 3). Aktivnost obeh parametrov se v prvem tednu kultiviranja (T1) statistično neznačilno ($p=0,141$ za maltazo in $p=0,288$ za saharazo) spremenita glede na začetno vrednost T0. Tudi v nadaljevanju kultiviranja so spremembe statistično neznačilne. V drugem tednu kultiviranja (T2) aktivnosti pri vseh

kulturah statistično neznačilno padejo ($p=0,060$ za maltazo in $p=0,312$ za saharazo) glede na začetno vrednost T_0 . V tem obdobju padejo aktivnosti obeh parametrov pri kulturah M1, M2, M3 in M4 pod začetno vrednost T_0 (grafi 3). Pri kulturi M5 je tako aktivnost maltaze kot tudi saharaze višja ob času T_2 glede na T_0 . Pri kulturi M6 pa je ob času T_2 aktivnost maltaze nižja glede na začetno vrednost, aktivnost saharaze pa višja. Ob času T_3 je očitno opazen močan porast aktivnosti obeh parametrov pri kulturah M1 in M3. Vendar tudi tu sprememba ni statistično značilna ($p=0,856$ za maltazo in $p=0,156$ za saharazo) glede na začetno vrednost T_0 . Tako očitni porast vrednosti pri omenjenih kulturah je moč pripisati povečani diferenciaciji (večje število) vilusnih enterocitov. Lahko pa je posledica tega tudi odpipetiranje nehomogenega celičnega lizata (večje število enterocitov v odvzetem vzorcu celic). Vsak vzorec mora biti ob času aplikacije homogen. Pri ostalih kulturah pa spremembe niso tako znatne. Pri kulturi M2 oba parametra nekoliko porasteta glede na vrednosti ob času T_2 , pri kulturah M5 in M6 je opazen rahel padec v aktivnosti obeh parametrov, medtem ko pri kulturi M4 aktivnost maltaze nekoliko pade, aktivnost saharaze pa nekoliko poraste glede na predhodno vrednost ob času T_2 . V četrtem tednu kultiviranja pa je pri kulturah M1 in M3 kot posledica na predhodno močno povišanje aktivnosti, opazno močno znižanje aktivnosti. Pri ostalih kulturah (M2, M4, M5 in M6) pa vrednosti narastejo. Pri kulturi M6 je opazen močan porast aktivnosti saharaze v tem obdobju. Tudi ob času T_4 so spremembe statistično neznačilne ($p=0,159$ za maltazo in $p=0,468$ za saharazo) glede na začetno vrednost T_0 . V petem tednu kultiviranja se vrednosti pri kulturah M1 in M3 celo nekoliko zvišajo glede na predhodne vrednosti ob času T_4 . Pri kulturah M2, M5 in M6 se vrednosti po pričakovanjih znižajo. Pri kulturi M4 pa se aktivnost maltaze celo nekoliko zviša, aktivnost saharaze pa se zniža. V tem obdobju kultiviranja je sprememba aktivnosti maltaze statistično značilno nižja ($p=0,005$), saharaze pa statistično neznačilna ($p=0,093$) glede na začetno vrednost T_0 . Povprečno relativno aktivnost maltaze in saharaze prikazuje graf 4.



Graf 4: Relativne aktivnosti maltaze in saharaze (povprečje) v šestih kulturah mišjih intestinalnih epiteljskih celic tankega črevesa v obdobju pet tedenskega kultiviranja.

4.2 Podganji model

4.2.1 Število celic

Za ugotovitev števila celic v celičnih kulturah smo uporabili tehniko, ki temelji na uporabi Neubauerjeve komore. Celice smo šteli pod 100x povečavo invertnega mikroskopa. Ker so bile kulture zelo goste s celicami, smo izvedli 4x redčenje le teh. Tudi po redčenju so bile kulture goste, zato smo štetje opravili samo v enem kvadrantu.

Preglednica 6: Število celic v šestih kulturah podganjih intestinalnih epiteljskih celic tankega črevesa v obdobju pet tedenskega kultiviranja. T = tedni kultiviranja.

Število celic/mL $\rightarrow 10^6$								
Čas (tedni)	kultura 1	kultura 2	kultura 3	kultura 4	kultura 5	kultura 6	povprečje	SD
T0	8,8	9,1	9,4	8,3	9,0	9,1	9,0	0,4
T1	12,4	12,6	11,3	9,5	10,1	10,0	11,0	1,3
T2	5,8	7,8	5,2	6,1	9,0	8,3	7,0	1,5

T3	4,3	4,4	5,9	5,4	3,9	5,4	4,9	0,8
T4	8,7	9,8	7,3	9,7	5,7	7,3	8,1	1,6
T5	5,7	5,0	4,7	3,8	3,5	6,5	4,9	1,1

Preglednica 7: Vrednosti *t*-testa za število celic/mL v podganji celični kulturi skozi obdobje kultiviranja glede na začetno vrednost *T0*. ↓ in ↑ = statistično značilno/neznačilno nižja oz. višja vrednost.

	t-vrednost	p-vrednost	Statistična značilnost
T0 → T1	4,07	0,009597	Značilno ↑
T0 → T2	3,06	0,028096	Značilno ↓
T0 → T3	11,95	0,000072	Značilno ↓
T0 → T4	1,17	0,295153	Neznačilno ↓
T0 → T5	9,34	0,000236	Značilno ↓

4.2.2 Živost celic

Živost celic v kulturah smo določili s pomočjo barvanja kulture s tripanskim modrilom. Po obarvanju dela homogene celične kulture in nanosu na Neubauerjevo komoro smo le te opazovali pod mikroskopom in določili živost celic glede na njihovo obarvanost. Z rahlim vrtenjem mikro vijaka je bilo moč ločiti viabilne (žive) celice od mrtvih. Žive celice se niso obarvale in so rahlo zasijale, kot bi imele nekakšno auro, medtem ko so se mrtve celice obarvale temno modro.

Preglednica 8: Spremljanje živosti v šestih kulturah podganjih intestinalnih epiteljskih celic tankega črevesa v obdobju pet tedenskega kultiviranja. *T* = tedni kultiviranja.

Živost celične kulture (%)								
Čas (tedni)	kultura 1	kultura 2	kultura 3	kultura 4	kultura 5	kultura 6	povprečje	SD
T0	76,1	78,0	81,9	75,9	74,4	84,6	78,5	4,0
T1	79,0	78,6	78,8	82,1	84,2	86,0	81,4	3,2
T2	73,1	74,3	74,5	74,6	71,6	74,7	73,8	1,2
T3	64,1	60,0	64,2	57,1	54,3	59,2	59,8	3,9
T4	53,9	49,2	52,3	55,2	64,7	52,3	54,6	5,4
T5	47,1	43,3	46,4	39,1	47,6	48,7	45,4	3,6

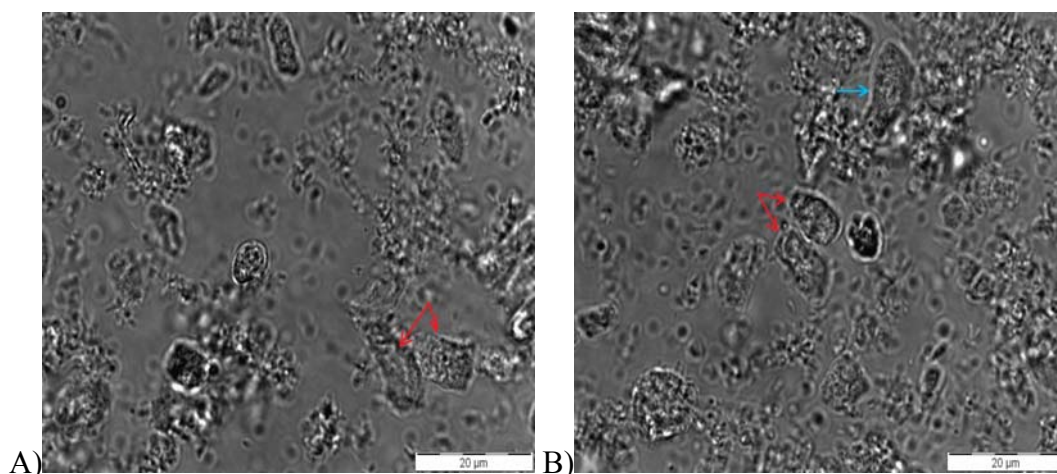
Preglednica 9: Vrednosti *t*-testa za živost podganje celične kulture skozi obdobje kultiviranja glede na začetno vrednost *T0*. ↓ in ↑ = statistično značilno/neznačilno nižja oz. višja vrednost.

	t-vrednost	p-vrednost	Statistična značilnost
T0 → T1	1,59	0,1723	Neznačilno ↑
T0 → T2	3,54	0,0165	Značilno ↓
T0 → T3	10,60	0,0001	Značilno ↓
T0 → T4	7,08	0,0009	Značilno ↓
T0 → T5	19,67	0,0000	Značilno ↓

4.2.3 Delež vilusnih enterocitov

Medtem ko smo določali živost posamezne celične kulture z Neubauerjevo komoro in uporabo tripanskega modrila, smo v istem preparatu določili še število vilusnih enterocitov. Iz števila smo izračunali delež le teh glede na število vseh celic v homogeni

celični kulturi. Vilusne enterocite smo prepoznali glede na njihovo značilno morfologijo in tudi velikost (slika 11).



Slika 11: Intestinalne epitelijske celice. Na sliki A sta vidna agregirana vilusna enterocita (rdeče puščice). Na sliki B sta vidna še ne povsem agregirana vilusna enterocita (rdeča puščica) in diferenciran vilusni enterocit z značilno stebričasto obliko (modra puščica).

Preglednica 10: Delež vilusnih enterocitov v šestih kulturah podganjih intestinalnih epitelijskih celic tankega črevesa v obdobju pet tedenskega kultiviranja. *T* = tedni kultiviranja.

Delež vilusnih enterocitov (%)								
Čas (tedni)	kultura 1	kultura 2	kultura 3	kultura 4	kultura 5	kultura 6	povprečje	SD
T0	31,8	20,9	14,9	15,7	17,8	20,9	20,3	6,2
T1	17,7	18,3	15,9	16,8	15,8	21,0	17,6	1,9
T2	21,2	20,0	21,3	16,4	30,9	22,7	22,1	4,8
T3	18,0	32,5	22,6	18,4	20,0	18,4	21,6	5,6
T4	9,6	10,2	11,4	5,2	18,2	25,0	13,3	7,1
T5	11,8	13,3	14,3	8,7	14,3	15,4	13,0	2,4

Preglednica 11: Vrednosti *t*-testa za odstotek podganjih vilusnih enterocitov skozi obdobje kultiviranja glede na začetno vrednost *T0*. ↓ in ↑ = statistično značilno/neznačilno nižja oz. višja vrednost.

	t-vrednost	p-vrednost	Statistična značilnost
T0 → T1	1,15	0,3015	Neznačilno ↓
T0 → T2	0,54	0,6138	Neznačilno ↑
T0 → T3	0,36	0,7311	Neznačilno ↑
T0 → T4	2,27	0,0725	Neznačilno ↓
T0 → T5	2,68	0,0436	Značilno ↓

4.2.4 Proliferacija intestinalnih epiteljskih celic

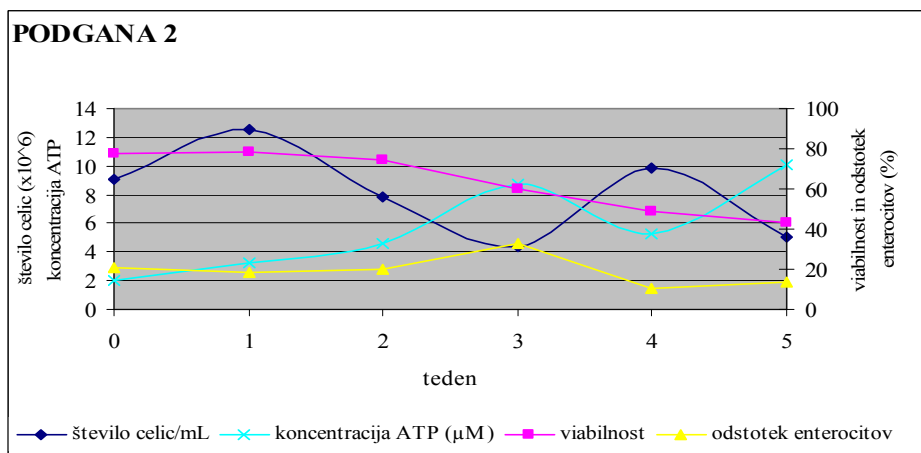
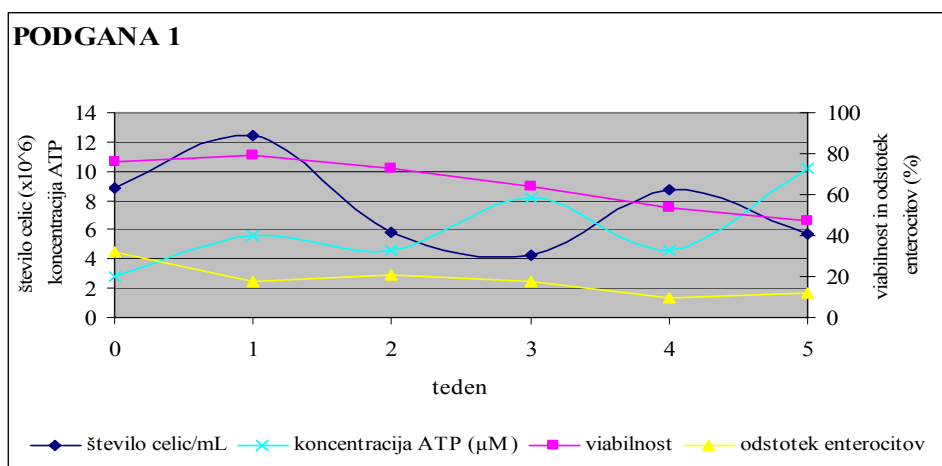
Poleg omenjenih parametrov smo na podganjem modelu izvedli tudi test proliferacije. Namen testa je ugotoviti prisotnost izvornih celic v kulturi z merjenjem koncentracije ATP. Omenjeni parameter se lepo poda k viabilnosti celične kulture, saj so pretekle študije pokazale, da če je kultura živa, je v njej prisotna tudi izvorna celica.

Preglednica 12: Koncentracija ATP v šestih kulturah podganjih intestinalnih epiteljskih celic tankega črevesa v obdobju pet tedenskega kultiviranja. *T* = tedni kultiviranja.

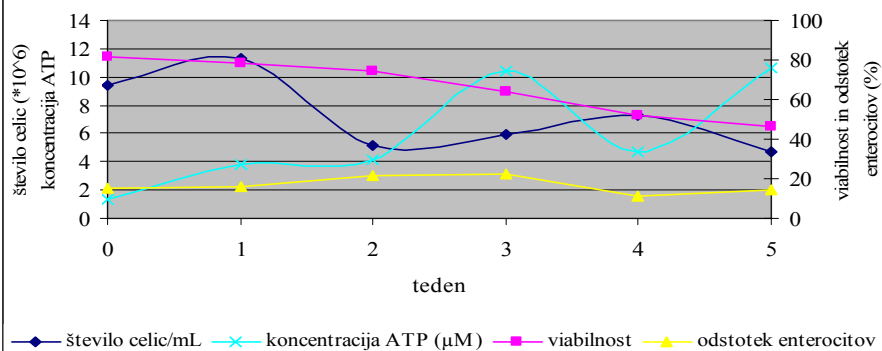
Koncentracija ATP (μM)								
Čas (tedni)	kultura 1	kultura 2	kultura 3	kultura 4	kultura 5	kultura 6	povprečje	SD
T0	2,83	2,02	1,33	1,66	3,01	1,34	2,03	0,74
T1	5,6	3,22	3,76	3,44	4,24	4,14	4,07	0,85
T2	4,62	4,56	4,06	4,99	5,81	4,95	4,84	0,58
T3	8,20	8,70	10,39	9,21	9,53	9,53	9,26	0,76
T4	4,54	5,29	4,70	4,15	4,38	6,16	4,87	0,74
T5	10,16	10,13	10,64	11,48	9,22	10,24	10,31	0,74

Preglednica 13: Vrednosti *t*-testa za koncentracijo ATP (podganje kulture) skozi obdobje kultiviranja glede na začetno vrednost *T0*. ↑ = statistično značilno višja vrednost.

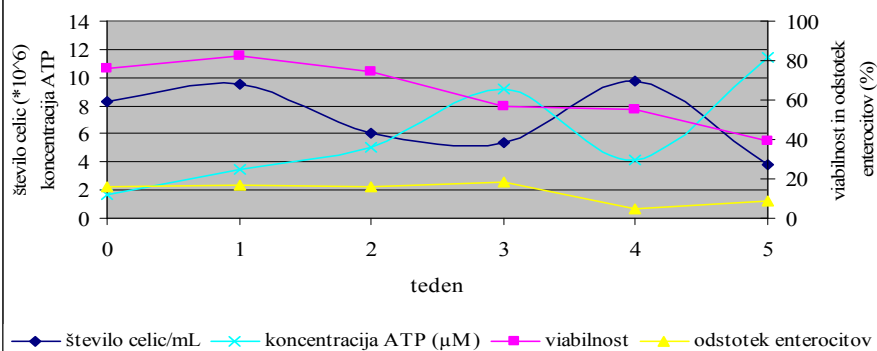
	t-vrednost	p-vrednost	Statistična značilnost
T0 → T1	6,79	0,001052	Značilno ↑
T0 → T2	10,79	0,000118	Značilno ↑
T0 → T3	13,47	0,0000403803	Značilno ↑
T0 → T4	5,51	0,002683	Značilno ↑
T0 → T5	15,09	0,0000231596	Značilno ↑



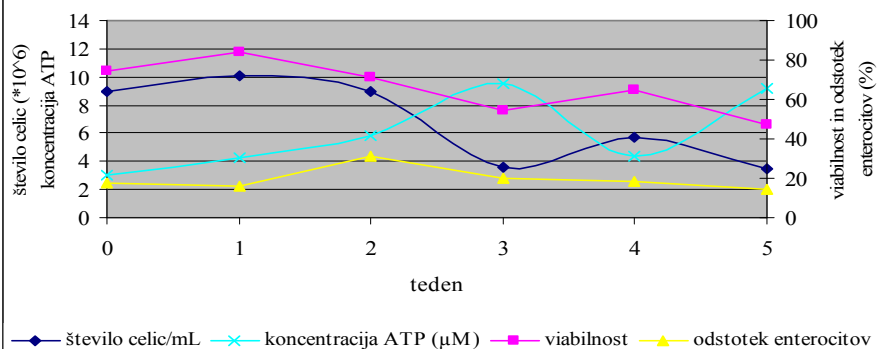
PODGANA 3

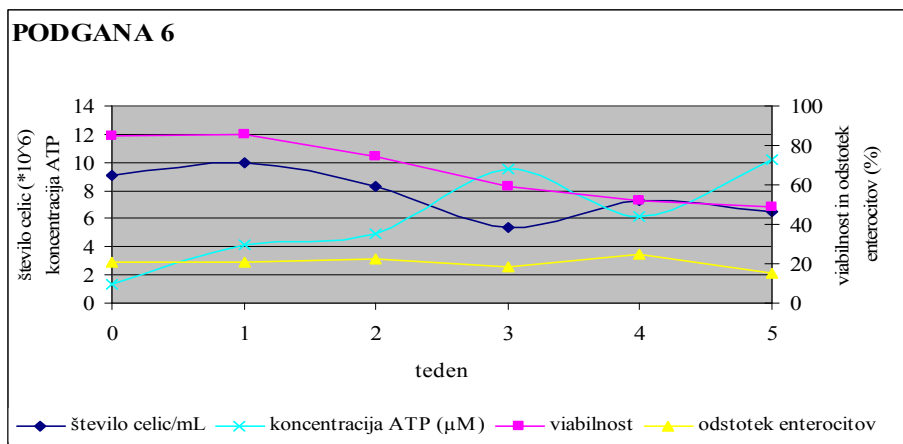


PODGANA 4

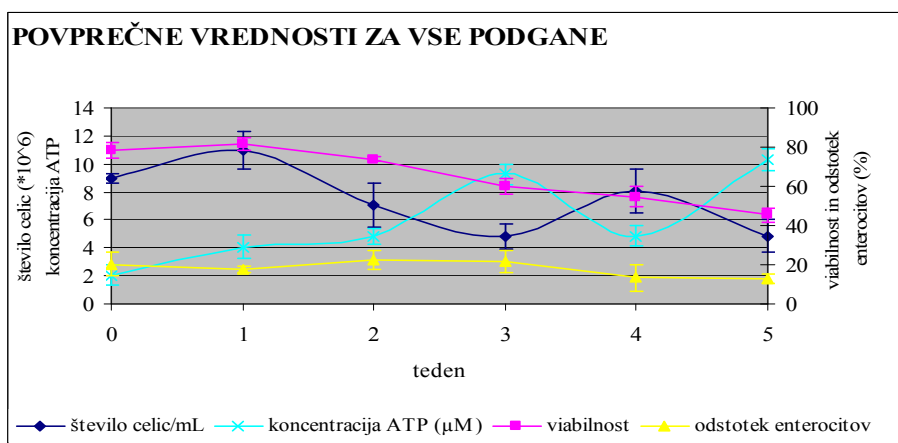


PODGANA 5





Graf 5: Prikaz vseh parametrov hkrati za posamezno kulturo podganjih intestinalnih epiteljskih celic tankega črevesa v obdobju pettedenskega kultiviranja.



Graf 6: Prikaz povprečnih vrednosti vseh parametrov hkrati.

V začetku kultiviranja smo pričakovali, da se bo število celic na mL kulture gibalo nekje v območju 10^6 . Nesmiselno bi bilo nadaljevati po načrtu, ki smo si ga zadali t.j. kultivirati celične kulture pet tednov, če bi že v začetku imeli "le" 10^5 ali manj celic/mL kulture. To bi pomenilo, da smo del celic izgubili v fazi spiranja. Oziraje se na rezultate, ki smo jih dobili je moč videti, da smo imeli v vseh kulturah dovolj celic za kultiviranje in sicer v povprečju $9,0 \times 10^6$ celic/mL (preglednica 6) (graf 6). Po prvem tednu kultiviranja je število celic/mL statistično značilno naraslo ($p=0,0096$) (preglednica 7), kar je znak adaptacije celic in vzpostavitve biokemijskih procesov. To se kaže tudi v viabilnosti, ki se po enem tednu kultiviranja nekoliko zviša (iz povprečno 78,5% na 81,4%) (preglednica 8), vendar ta sprememba ni statistično značilna ($p=0,1723$) (preglednica 9).

Opazili smo tudi, da se po enem tednu kultiviranja poleg števila celic in viabilnosti poviša tudi koncentracija ATP kot pokazatelj stopnje proliferacije (iz povprečno 2,03 μM na povprečno 4,07 μM) (preglednica 12). V drugem tednu (T2) kultiviranja število celic pade na povprečno $7,0 \times 10^6$ celic/mL kulture, kar je statistično značilno glede na začetno vrednost T0. Hkrati se zniža tudi viabilnost celične kulture (iz povprečno 81,4% ob času T1 na povprečno 73,8% ob času T2), medtem ko koncentracija ATP nekoliko naraste glede na predhodno meritev ob času T1. Vendar ta sprememba ni statistično značilna ($p=0,112$). V tretjem tednu kultiviranja se število celic statistično značilno zniža ($p=0,00007$) glede na T0, na enako vrednost kot smo jo dosegli ob koncu kultiviranja (povprečno $4,9 \times 10^6$ celic/mL). Prav tako se statistično značilno zniža viabilnost ($p=0,00013$) celične kulture in pade pod 60% (na povprečno 59,8%). Koncentracija ATP pa se je ponovno zvišala. Tokrat iz povprečno 4,84 μM ob času T2 na povprečno 9,26 μM . Pri gibanju teh treh parametrov ob času T3 gre najbrž za pospešeno proliferacijo izvornih celic, ki je odraz zmanjšane števila celic in viabilnosti. Ker sta ta dva parametra (število celic in viabilnost) znižana, je lahko prišlo do sprožitve določenega signala, ki je dal izvornim celicam znak za pospešeno tvorbo celic. Pri tem so lahko nastale tudi celice, katerih metabolni potencial je večji od končno diferenciranih celic, na primer prehodne deleče se celice. Sklepamo lahko, da toliko celic kolikor jih propade jih mora tudi na novo nastati, drugače celična kultura ne preživi. V četrtem tednu kultiviranja se število celic poveča (na povprečno $8,1 \times 10^6$ celic/mL), kar je najbrž posledica zvišane koncentracije ATP ob času T3. Ta sprememba ni statistično značilna ($p=0,295$) glede na število celic ob času T0. Viabilnost se še nekoliko zniža (na povprečno 54,6%), kar smo tudi pričakovali. Prav tako se statistično značilno ($p=0,0027$) zniža tudi koncentracija ATP (povprečno 4,87 μM), ki se vrne v območje vrednosti, ki smo jih izmerili ob času T2. Ker se število celic in koncentracija ATP gibljeta ravno nasprotno kot pri zadnji meritvi ob času T3, lahko to razložimo na način, da se je število celic oz. gostota celic povečala zaradi predhodno povečane proliferacije ob času T3, koncentracija ATP pa se je posledično znižala zaradi večjega števila končno diferenciranih celic v kulturi, ki imajo manjši metabolni potencial. V petem tednu kultiviranja število celic ponovno pade na povprečno $4,9 \times 10^6$ celic/mL. Ta sprememba je statistično značilna ($p=0,00023$) glede na vrednost ob času T0. In ker je gostota celic manjša, se ponovno poveča koncentracija ATP (iz povprečno 4,87 μM ob času T4 na

povprečno 10,31 μM). To je zelo velik porast vrednosti, zato smo začeli sumiti na okužbo kulture z bakterijami in glivami. Naša ugibanja smo potrdili z nanosom izrabljenega kultivacijskega medija na gojišče iz agarja, ki ni vseboval antibiotika. Po inkubaciji na 37°C so bile že po enem dnevu vidne kolonije bakterij, ki (so verjetno zašle v celične) jih nismo uspeli v zadostni meri odstraniti že v fazi spiranja črevesa. Zato smo se odločili, da pri nadaljnjih poskusih na temu področju uporabimo dvakrat večjo koncentracijo raztopine antibiotika/antimikotika. Bakterije so se v kultivacijskem mediju zelo hitro razmnoževale, na kar je nakazovala tudi barva izrabljenega medija. Zato je velika verjetnost, da smo pri zadnji meritvi ATP-ja dejansko izmerili tudi ATP konstantno deležih se bakterij. Ker je v tem tednu tudi viabilnost padla pod 50% (povprečno na 45,4%) smo se odločili, da s kultiviranjem prenehamo. Oziraje se na viabilnost bi bilo smiselno kultivirati tri tedne, saj se je pri našem poskusu viabilnost ob času T3 še vedno gibala okrog 60%.

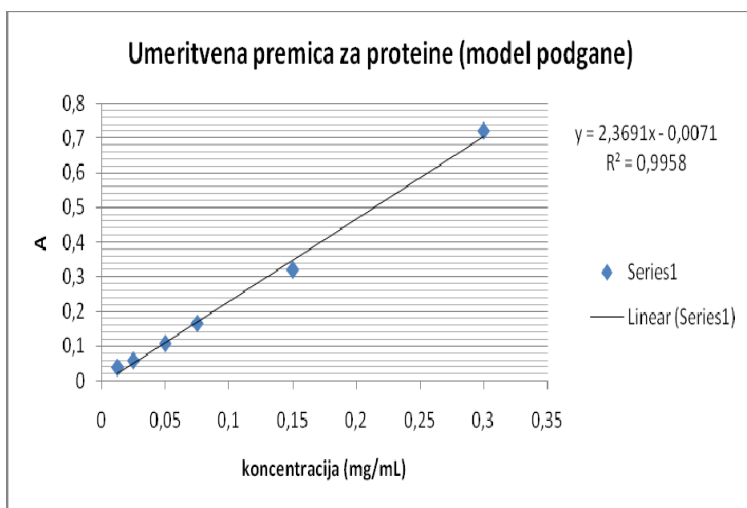
Delež vilusnih enterocitov se je ves čas kultiviranja statistično neznačilno spreminjal glede na začetno vrednost T0, razen v zadnjem tednu kultiviranja T5 (preglednica 10), ko je sprememba statistično značilna ($p=0,043$) (preglednica 11) glede na začetno vrednost. Po pričakovanjih so vrednosti znašale med 10% in 30% pri posameznih kulturah (grafi 5). V povprečju pa med 13% in 22% (graf 6). Gibanje vrednosti v tako ozkem intervalu je posledica dejstva, da se vilusni enterociti diferencirajo v zelo kratkem času t.j. le tri dni. Opazili smo, da se ob začetnem povišanju števila celic, delež vilusnih enterocitov ne spremeni. Od drugega tedna dalje, ko je odstotek najvišji (povprečno 22,1%) pa le ta skupaj z viabilnostjo konstantno pada do vrednosti 13,0% ob času T5. Ta sprememba je statistično značilna ($p=0,044$) glede na začetno vrednost T0.

4.2.5 Spremljanje relativne aktivnosti maltaze in saharaze

Encimsko aktivnost maltaze in saharaze smo izmerili v celičnih lizatih. V ta namen je bila uporabljena metoda po Dahlqvistu. Meritve so bile opravljene v treh paralelkah. Aktivnost je podana v mednarodnih enotah in sicer IU/g proteinov. Tako kot encimsko aktivnost smo tudi koncentracijo proteinov določili v celičnem lizatu in uporabili metodo po Bradfordu. Koncentracijo proteinov v posameznem vzorcu smo izračunali s pomočjo

enačbe umeritvene premice, ki smo jo dobili iz serije standardnih redčitev humanega albumina z začetno koncentracijo 0,3 mg/mL (graf 7) (preglednica 14). Meritve encimske aktivnosti kot tudi koncentracije proteinov so bile opravljene v treh paralelkah. Za primerjavo smo dodali še encimsko aktivnost preračunano na število vseh celic. Z omenjenima parametroma dobimo vpogled v ozadje razvoja KVČB.

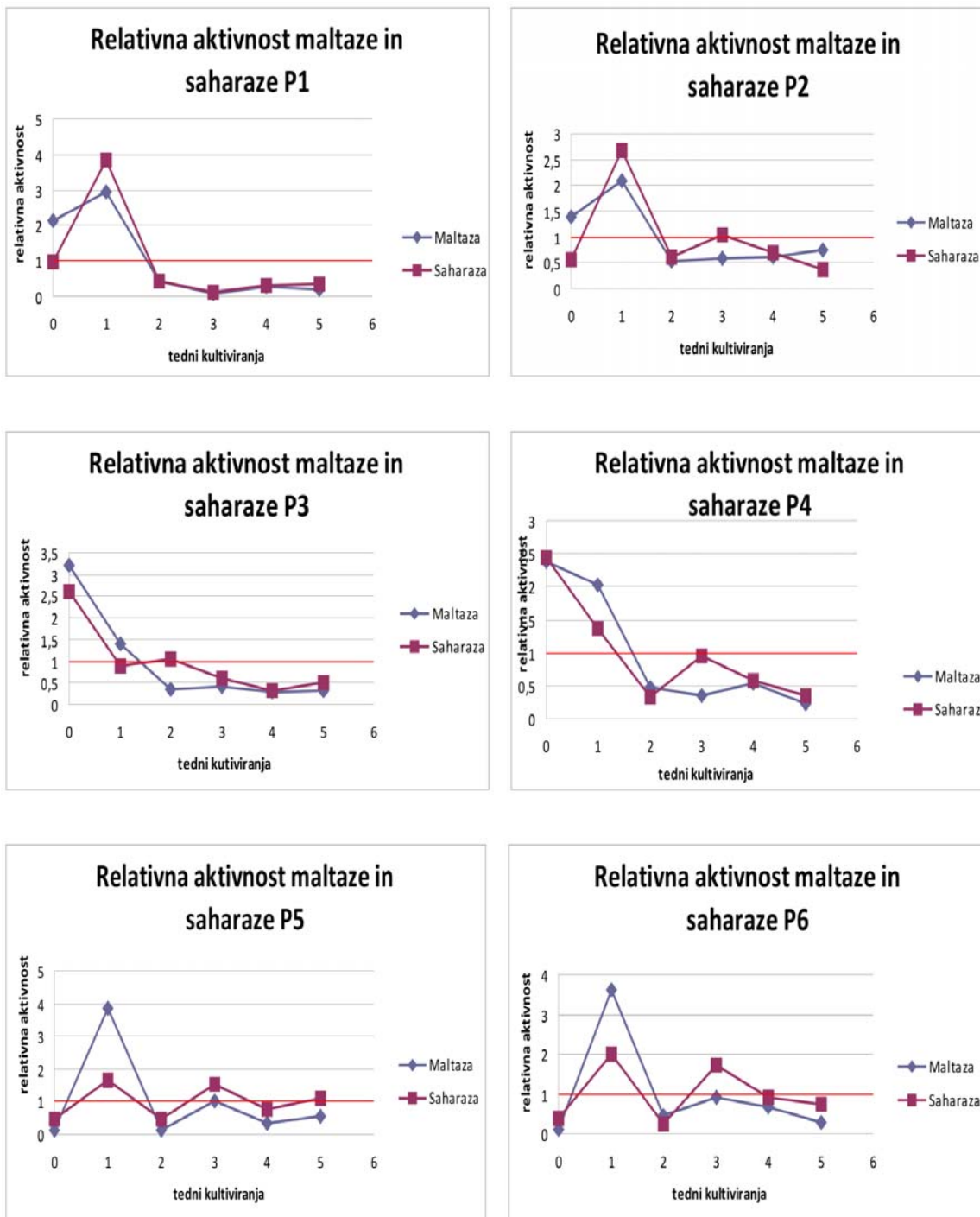
Preglednica 14: serija standardnih redčitev.



Graf 7: Umeritvena premica za proteine.

Koncentracija standarda (mg/mL)	Absorbanca (A)
0,0125	0,0387
0,025	0,0586
0,05	0,1077
0,075	0,1651
0,15	0,3195
0,3	0,7187

Vilusni enterociti so nosilci encimskih aktivnosti maltaze in saharaze. Encimski kompleksi se nahajajo na površini vilusnih enterocitov. V obdobju kultiviranja smo ugotovili delež vilusnih enterocitov v posamezni kulturi. V nadaljevanju eksperimentalnega dela pa je bilo potrebno ugotoviti še kakšne so dejanske aktivnosti encimskih kompleksov. Rezultati so prikazani v grafu 8.

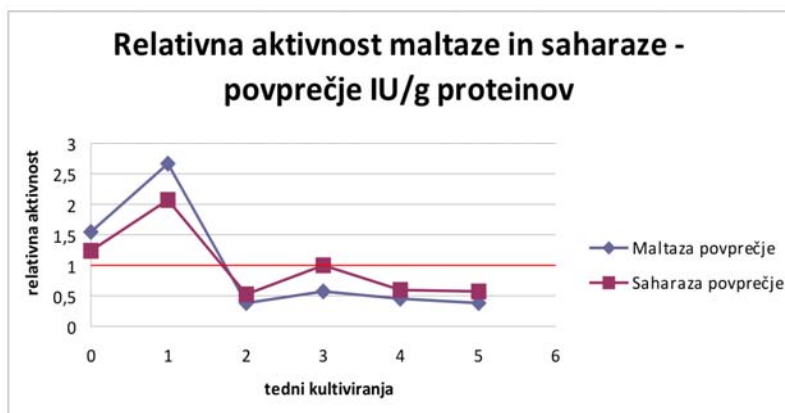


Graf 8: Relativne aktivnosti maltaze in saharaze v šestih kulturah podganjih intestinalnih epitelijskih celic tankega črevesa v obdobju pet tedenskega kultiviranja.

Pred začetkom eksperimentalnega dela smo pričakovali, da bodo vrednosti ob času T1 višje napram začetnim vrednostim. To smo sklepali iz predhodnih raziskav, ki so bile opravljene na tem področju. Glede na zgornje rezultate se je to res zgodilo v štirih od

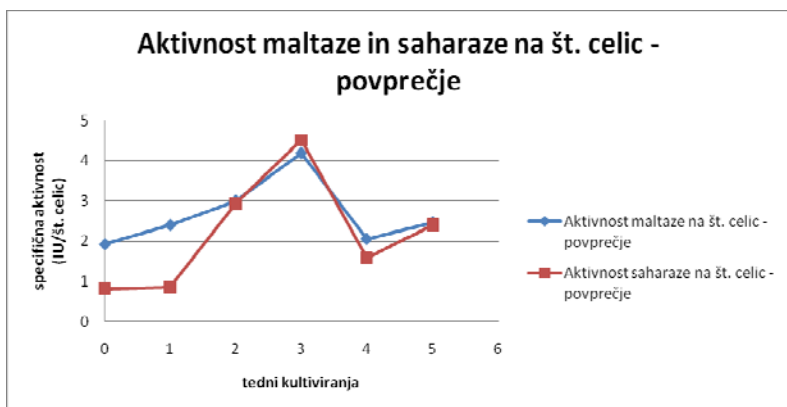
šestih kultur (P1, P2, P5 in P6) (graf 8). Pri omenjenih kulturah je to lahko vzrok adaptacije celic, ki je potrebna, da celice po obdelavi od tkiva do celične kulture ponovno vzpostavijo svoje biokemijske funkcije. Pri kulturah P3 in P4 pa aktivnost pade že v času T1 (graf 8), kar si je moč razlagati, da celice v omenjenih kulturah že v začetku niso bile tako izpostavljene stresnim situacijam (pasaže, večkratna centrifugiranja,...) kot celice v ostalih kulturah. Specifične aktivnosti maltaze in saharaze so pri podganjem modelu precej nižje kot pri mišjem modelu, če jih izrazimo na gram proteinov. To je posledica visokih koncentracij proteinov, ki pa je posledica dejstva, da že v začetku priprave celičnih kultur nismo dosegli željenega učinka kolagenaze. Zato je bilo tkivo nekoliko slabše razbito - razgrajeno. Posledično smo tako v celično kulturo vnesli tudi zelo majhne delčke tkiva ki so doprinesli k visokim koncentracijam proteinov v celičnih lizatih. V nadaljevanju kultiviranja vidimo, da se aktivnost obeh parametrov (maltaze in saharaze) ne spreminja statistično značilno ($p \geq 0,05$). Pri kulturah P1, P2, P3 in P4 je trend padanja encimske aktivnosti zelo očiten, kar je povsem normalno saj celične kulture ni mogoče ohranjati žive v nedogled ampak je potrebno poiskati optimalno obdobje kultiviranja. Pri kulturah P5 in P6 pa je trend padanja encimske aktivnosti nekoliko manj izrazit kot pri ostalih kulturah. Iz tega lahko sklepamo, da optimalen čas kultiviranja zavisi od kulture do kulture in je pri večini med 3 in 4 tedne.

Te trditve potrjujejo tudi rezultati, ki so prikazani na grafu 9, kjer je opazen trend padanja encimske aktivnosti. Le ta pa ob koncu kultiviranja (T5) ne pade na zanemarljivo nizko vrednost ampak se giblje nekje v območju vrednosti ob času T2. Zatorej bi bilo smiselno celične kulture, ki niso okužene z bakterijami in glivami in imajo zadostno število celic (v območju 10^6) še dodatno kultivirati pri tem pa sproti meriti encimsko aktivnost.



Graf 9: Relativne aktivnosti maltaze in saharaze (povprečje) v šestih kulturah podganjih intestinalnih epiteljskih celic tankega črevesa v obdobju pet tedenskega kultiviranja.

Aktivnost maltaze in saharaze smo izrazili še na število vseh celic v posamezni kulturi in izračunali povprečje vseh šestih kultur skozi obdobje kultiviranja (graf 10). Razvidno je, da se parametra gibljeta zelo podobno. Aktivnost tu raste od začetka kultiviranja do tretjega tedna (T3), kar je lahko posledica večje diferenciacije vilusnih enterocitov, katerih delež je najvišji ravno v obdobju T2 in T3 (povprečno 22,1% in 21,7%).



Graf 10: Specifična aktivnost maltaze in saharaze (povprečje) v šestih kulturah podganjih intestinalnih epiteljskih celic tankega črevesa v obdobju pet tedenskega kultiviranja.

5 SKLEPI

Naša naloga je bila prenos predhodno razvite metode kultiviranja mišjih enterocitov na kultiviranje podganjih enterocitov in primerjati uspešnost kultiviranja. Uspešnost kultiviranja mišjih in podganjih enterocitov smo ocenjevali s spremljanjem naslednjih parametrov: število celic/mL kulture, živost celic, proliferacija celic, odstotek vilusnih enterocitov in aktivnost maltaze in saharaze.

Naše ugotovitve so:

- Postopek izolacije podganjih enterocitov je v primerjavi z izolacijo mišjih enterocitov lažji. Vzrok temu je večja količina črevesnega tkiva.
- Primarna celična kultura podganjih in mišjih intestinalnih epiteljskih celic je heterogena kultura in potencialno sestoji iz izvornih celic ali predhodnih celic, diferenciranih vilusnih enterocitov, čašastih celic, Panethovih celic in enteroendokrinih celic.
- Vilusni enterociti, ki nastanejo z diferenciacijo med kultiviranjem v suspenziji nimajo težnje po združevanju.
- Diferencirani vilusni enterociti, ki jih v kulturo zajamemo v postopku izolacije se združujejo (dvojčki, trojčki,...).
- Tekom kultiviranja se na površini celične kulture pojavlja mukus v "oblačkih", kar kaže na prisotnost čašastih celic.
- Celice v kulturi potrebujejo en teden časa, da se adaptirajo po postopku izolacije. To se kaže tudi v številu celic/mL kulture in živosti celic ob času T1 napram T0.
- Mišje in podganje enterocite je moč kultivirati štiri tedne in pri tem ohraniti viabilnost nad 50% ter 10^6 celic/ml kulture.
- MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity metoda ni primerna za spremljanje živosti celic skozi celotno obdobje kultiviranja.
- Metodo izolacije bi bilo potrebno v prihodnje modificirati, da se izognemo prisotnosti tkivnih delcev v celični kulturi.

- V nadaljnjih poskusih bi bilo smiselno povečati koncentracijo raztopine antibiotik/antimikotik, da mikroorganizmi ne bi motili našega dela proti koncu kultiviranja (T3→).
- Za optimalne in reprezentativne rezultate je potrebno celično kulturo, pri izvedbi posameznega testa, tik pred nanosom na mikrotitersko ploščo homogenizirati.
- S testom proliferacije smo potrdili, da če je celična kultura živa, so v njej verjetno prisotne tudi izvirne celice ali prehodne proliferajoče celice.

Namen tega raziskovalnega dela je bil dosežen, saj smo dokazali, da je metoda kultiviranja mišjih enterocitov prenosljiva na podganje enterocite, jo je pa potrebno do določene mere prilagoditi večjemu številu celic (več kultivacijskega medija, več Ab/Am). Izolirali smo zadostno število celic kar omogoča poleg identifikacije vilusnih enterocitov tudi identifikacijo vseh podvrst epitelijskih celic, kar je predpogoj za prenos metode kultiviranja na humane črevesne celice, z namenom proučevanja črevesnih bolezni.

6 LITERATURA

- (1) Kocijančič A, Mravlje F, Štajer D: Interna medicina, 3. Izdaja, Littera picta, Ljubljana, 2005: 493-495.
- (2) <http://www.slodiver.net/medicina/prebavila.asp> (postopal 10.10.2008)
- (3) <http://sl.wikipedia.org/wiki/Jejunum> (postopal 10.10.2008).
- (4) Shargel L, Wu-Pong S, Yu ABC: Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics, 5th Ed., McGraw-Hill, New York, 2005: 387.
- (5) <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/smallgut/lifecycle.html> (postopal 11.10.2008).
- (6) <http://www.informatics.jax.org/cookbook/figures/figure57.shtml> (postopal 7.6.2009).
- (7) http://www.baa.duke.edu/companat/BAA_289L_2004/Digestive_system/Rat/ratgut.htm (postopal 7.6.2009).
- (8) <http://kentsimmons.uwinnipeg.ca/16cm05/16labman05/lb8pg3.htm> (postopal 7.6.2009).
- (9) Potten C. S, Loeffler M: Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties; Lessons for and from the Crypt, Company of Biologists Limited, Great Britain, 1990; 1001-1020.
- (10) Booth C, Potten C. S: Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. J Clin Invest 2000; 105: 1493–1499.
- (11) Barker N, van de Wetering M, Clevers H: The intestinal stem cell, Review. Genes & Development by Cold Spring Harbor Laboratory Press 2008; 22: 1856-1864.
- (12) Boštjančič Lidiya: Kultiviranje mišjih enterocitov in proučevanje njihovih funkcij in vitro, Diplomaska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2008.
- (13) Levin RJ: Digestion and absorption of carbohydrates – from molecules and membranes to humans. Am J Clin Nutr 1994; 59: 690S-698S.
- (14) Swallow DM, Poulter M, Hollox EJ: Intolerance to Lactose and Other Dietary Sugars. Drug Metab Dispos 2001; 29: 513-516.

- (15) Hunziker W, Spiess M, Semenza G, Lodish HF: The Sucrase-Isomaltase Complex: Primary Structure, Membrane-Orientation, and Evolution of a Stalked, Intrinsic Brush Border Protein. *Cell* 1986; 46: 227-234.
- (16) Naim HY, Sterchi EE, Lentze MJ: Biosynthesis of the Human Sucrase-Isomaltase Complex. Differential O-glycosylation of the sucrase subunit correlates with its position within the enzyme complex. *J Biol Chem* 1988; 263: 7242-7253.
- (17) Naim HY, Sterchi EE, Lentze MJ: Structure, biosynthesis, and glycosylation of human small intestinal maltase-glucoamylase. *J Biol Chem* 1988; 263: 19709-19717.
- (18) Carbohydrates: <http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/546maltose.html> (postopal 25.8.2009).
- (19) Boyer R. F: Temelji biokemije, Knjižna zbirka Skripta, Študentska založba, Ljubljana, 2005. 125-153, 179-195.
- (20) Carbohydrates: <http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/546sucrose.html> (postopal 25.8.2009).
- (21) Štiblar-Martinčič D, Vraspir-Porenta O, Zorc-Pleskovič R: Histologija. Inštitut za histologijo in embriologijo Medicinske fakultete, Ljubljana, 1998: 110.
- (22) Crohnova bolezen, Ulcerozni kolitis in Intermediarni kolitis.
<http://www.kvcb.si/crohnova.htm> (postopal 18.10.2008).
- (23) Ocepek A, Skok P: Kronične vnetne črevesne bolezni in rak debelega črevesa in danke. *Zdravstveni vestnik* 2006; 75: II-99-103.
- (24) Kronične vnetne črevesne bolezni:
http://med.over.net/za_bolnike/bolezni_clanki/crevesne_bolezni.php (postopal 18.10.2008).
- (25) Kronične vnetne črevesne bolezni in biološka zdravila:
<http://www.revijakapital.com/life/clanki.php?idclanka=50> (25.8.2009).
- (26) Dolinšek J, Urlep-Žužej D, Mičetić-Turk D: Sodobni principi diagnostike celiakije. *Zdravstveni vestnik* 2006; 75: II-89-97.
- (27) Bolezni - celiakija: http://med.over.net/za_bolnike/bolezni_clanki/celiakija.php (postopal 25.8.2009).
- (28) Tušek Bunc K: Celiakija v ambulantni zdravniku družinske medicine. »Celiakija« - glasilo slovenskega društva za celiakijo 2006; 5.

- (29) Veranič P., Romih R, Pšeničnik M: Praktični pouk celične biologije. 1. natis, Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 2003: 12-22; 32-33.
- (30) Organ culture: http://en.wikipedia.org/wiki/Organ_culture (postopal 24.8.2009).
- (31) Cell culture: http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_culture (postopal 24.8.2009).
- (32) Browning TH, Trier JS: Organ culture of mucosal biopsies of human small intestine. J Clin Invest 1969; 48(8): 1423-1432.
- (33) Trier JS, Browning TH: Epithelial-cell renewal in cultured duodenal biopsies in celiac sprue. New Eng J Med 1970; 283: 1245-1250.
- (34) Lukač-Bajalo J, Ungerer R, Hekkens AJM, Van de Bienen E, Hekkens WThJM: Circadian Aspects of In Vitro Culture of Rat Intestinal Rings. J Interdiscipl Cycle Res 1987; 18/4: 243-248.
- (35) Lukač-Bajalo J, Ungerer R, Hekkens WThJM: Circadian measurement of enzyme activity and protein composition of brush borders from rat intestine after 'in vitro' culture. Chronobiol 1987; XIV/2: 199-200.
- (36) 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.
- (37) Sumbuy Y, de Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stamatii A, Zucco F: The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. Cell Biology and Toxicology 2005; 21: 1-26.
- (38) MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity assay:
<http://www.promega.com/tbs/tb348/tb348.pdf> (postopal 9.11.2008)
- (39) Bradford M: 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.
- (40) Navodila proizvajalca: Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad laboratories 600-0005; 500:405.
- (41) VanKley, H. and Hale, S.M: Anal. Biochem. 1977; 81, 485-487.
- (42) Dahlqvist A: Assay of Intestinal Disaccharidases. Anal Biochem 1968; 22: 99-107.

(43) Freshney RI: Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique, 4th Ed., Wiley-Liss, New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Toronto, Singapore, 2000: 1-521.

(44) CellTiter-Glo: <http://www.promega.com/tbs/tb288/tb288.pdf> (postopal 26.8.2009).

Diplomsko delo sem opravljal na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Jane Lukač Bajalo, spec. med. biokem. in somentorstvom prof. dr. Boruta Božiča, spec. med. biokem.

Zahvaljujem se mentorici in somentorju za ponujeno priložnost, posredovanje njunih izkušenj na tem področju in usmerjanje pri opravljanju diplomskega dela, članom raziskovalne skupine (Tina Lapajne, Peter Vrtačnik in Katarina Štrukelj), ter asistentom in tehničnim sodelavcem na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo.

Posebna zahvala gre moji družini za podporo in veliko pozitivne energije v času opravljanja diplomskega dela.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Jane Lukač Bajalo, spec. med. biokem. in somentorstvom prof. dr. Boruta Božiča, spec. med. biokem.

Podpis diplomanta

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	Zgradba tankega črevesa – makroskopski in mikroskopski vidik	1
1.2	Dinamika celic tankega črevesa	3
1.2.1	Izvirne celice	4
1.2.2	Prehodne celice	4
1.2.3	Enterociti	5
1.2.4	Enteroendokrine celice	5
1.2.5	Čašaste celice	6
1.2.6	Panethove celice	6
1.3	Disaharidaze tankega črevesa	6
1.3.1	Disaharidi	7
1.4	Encim saharaza	9
1.5	Encim maltaza	9
1.6	Kronične vnetne črevesne bolezni ali KVČB	9
1.6.1	Crohnova bolezen (Morbus Crohn)	10
1.6.2	Ulcerozni kolitis (Colitis ulcerosa)	10
1.6.3	Celiakija (glutenska enteropatija)	11
1.7	<i>In vitro</i> testni modeli	12
1.8	Kultiviranje epitelijskih celic tankega črevesa	13
2	NAMEN DELA	15
3	METODE IN MATERIALI	16
3.1	Postopek odmrzovanja celic	16
3.2	Izolacija podganjih epitelijskih celic	16
3.2.1	Postopek zamrzovanja vzorcev debelega črevesa in sluzi.....	20
3.3	Kultiviranje podganjih enterocitov	21
3.3.1	Priprava kompletiranega RPMI 1640 medija	21
3.4	Spremljanje celične živosti (viabilnosti) s tripanskim modrilom.....	22
3.4.1	Štetje vilusnih enterocitov z Neubauerjevo komoro.....	23
3.5	Spremljanje živosti celic z metodo MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity	25
3.6	Spremljanje proliferacije celic z luminiscentno metodo celične živosti	28

3.7 Priprava celičnega lizata	30
3.8 Merjenje koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu	31
3.9 Merjenje aktivnosti maltaze in saharaze z metodo po Dahlqvistu	34
3.10 Laboratorijski material	38
4 REZULTATI IN DISKUSIJA	40
4.1 Mišji model	40
4.1.1 Število celic	40
4.1.2 Delež vilusnih enterocitov	41
4.1.3 Spremljanje relativne aktivnosti maltaze in saharaze	43
4.2 Podganji model	47
4.2.1 Število celic	47
4.2.2 Živost celic	48
4.2.3 Delež vilusnih enterocitov	49
4.2.4 Proliferacija inestinalnih epiteljskih celic	51
4.2.5 Spremljanje relativne aktivnosti maltaze in saharaze	56
5 SKLEPI	61
6 LITERATURA	63

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JERNEJ ROGLIČ

**PRIMERJAVA USPEŠNOSTI KULTIVIRANJA MIŠJIH IN
PODGANJIH ENTEROCITOV**

**COMPARISON OF CULTIVATION EFFECTIVENESS FOR MOUSE
AND RAT ENTEROCYTES**

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JERNEJ ROGLIČ

DIPLOMSKA NALOGA

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ
LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2009

POVZETEK

V preteklih poskusih je bilo dokazano, da je mogoče uspešno kultivirati mišje enterocite v celičnih kulturah skozi daljše obdobje. Pred prenosom študije na humani model je potrebno uspešno izvesti kultiviranje podganjih enterocitov. Z uspešno izvedbo kultiviranja skozi daljše obdobje, lahko primerjamo dobljene rezultate z rezultati, ki izhajajo iz mišjega modela. Primerjava uspešnosti kultiviranja mišjih in podganjih enterocitov pa predstavlja pomemben faktor pri prenosu študije etiopatogeneze celiakije in kronične vnetne črevesne bolezni na humani model.

S predhodno razvito metodo kultiviranja smo uspešno kultivirali podganje enterocite skozi daljše obdobje. V kulturah podganjih enterocitov smo *in vitro* proučevali vrsto in funkcijo intestinalnih epiteljskih celic (izvirne celice, diferencirani vilusni enterociti, čašaste celice, Panethove celice in enteroendokrine celice). Diferencirane vilusne enterocite smo identificirali glede na njihovo značilno obliko in preko aktivnosti maltaze in saharaze. Čašaste celice smo identificirali preko izločanja mukusa in detekcijo mucina 2. Panethove celice smo identificirali preko aktivnosti lizocima. Enteroendokrine celice smo identificirali z detekcijo romogranina A. Prisotnost in proliferacijo izvornih celic smo dokazali z merjenjem koncentracije ATP.

Uspešnost kultiviranja smo ocenjevali s spremljanjem živosti, proliferacije in številom celic v kulturi.

SUMMARY

It has been proven in the past studies that it is possible to cultivate mouse enterocytes for a long period of time. It is necessary to successfully cultivate rat enterocytes before transfer the cultivation method to a human study model. The comparison of cultivation effectiveness for mouse and rat enterocytes is a very important factor in the studies of etiopathogenesis of Celiac Disease and Inflammatory Bowel Disease.

We have successfully cultivated rat enterocytes for a long period of time with previously developed method. In the cultures of rat enterocytes we have *in vitro* studied the type and function of intestinal epithelial cells (stem cells, differentiated villus enterocytes, goblet cells, Paneth cells and enteroendocrine cells). Differentiated villus enterocytes were identified by their specific shape as well as maltase and sucrase activity. Goblet cells were identified by secretion of mucus as well as mucin 2 detection. Paneth cells were identified by activity of lysozyme. Enteroendocrine cells were identified by detection of chromogranin A. The presence of stem cells was proven with ATP concentration measurement.

The successfulness of cultivation was estimated by following cell viability, proliferation and number of cells in the culture.