

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

Visokošolski strokovni program laboratorijske biomedicine

MATEJA BIZJAK ANŽIČEK

**PROUČEVANJE VPLIVA GLIADINSKIH PEPTIDOV NA KULTURE  
PODGANJIH IN HUMANIH KOLONOCITOV**

**STUDYING OF INFLUENCE OF GLIADIN PEPTIDES ON THE  
CULTURES OF RATS AND HUMANS COLONOCYTES**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Jane Lukač Bajalo in somentorstvom doc. dr. Roka Orla.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Jani Lukač Bajalo za strokovno pomoč, uspešno sodelovanje in usmerjanje pri eksperimentalnem delu ter kasnejšem pisanju diplome. Poleg tega pa bi se rada zahvalila še za ves namenjen čas in razumevanje.

Želim se zahvaliti tudi asist. Matevžu Prijateljju za pomoč pri eksperimentalnem delu in za slikanje celic ter tehnični sodelavki Manji Cedilnik.

Zahvaljujem pa se tudi študentki Nini Klinc za velikodušno pomoč pri eksperimentalnem delu in kasnejše nasvete; mami in možu za vsakršno podporo, spodbudo, potrpežljivost in zaupanje vame.

## **IZJAVA**

Izjavljam, da sem delo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Jane Lukač Bajalo, univ. dipl. kem., spec. med. biokem. in somentorstvom doc. dr. Roka Orla, dr. med., spec. ped..

Ljubljana, junij, 2010

Predsednik diplomske komisije: prof.dr.Borut Božič, mag. farm., spec. med. biokem.

Član diplomske komisije: asist.dr.Simon Žakelj, mag. farm.

**KAZALO**

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Struktura in funkcija ozkega črevesa</b>	<b>1</b>
1.1.1 Epitelijske celice ozkega črevesa	3
<b>1.2 Struktura in funkcija širokega črevesa</b>	<b>5</b>
1.2.1 Epitelijske celice širokega črevesa	7
<b>1.3 Kronične vnetne črevesne bolezni</b>	<b>8</b>
1.3.1 Crohnova bolezen	8
1.3.2 Ulcerozni kolitis	9
1.3.3 Sindrom razdražljivega črevesa	10
<b>1.4 Celiakija</b>	<b>10</b>
<b>1.5 Toksični peptidi glutena</b>	<b>12</b>
1.5.1 Gliadinski perptidi	12
<b>1.6 In vitro testni modeli</b>	<b>14</b>
<b>1.7 Kultiviranje epitelijskih celic črevesa</b>	<b>15</b>
<b>2. NAMEN DELA</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE</b>	<b>18</b>
<b>3.1 Materiali</b>	<b>18</b>
3.1.1 Biološki vzorci	18
3.1.2 Laboratorijski pribor	18
3.1.3 Aparature	18
<b>3.2 Reagenti in kemikalije ter priprava delovnih reagentov</b>	<b>19</b>
<b>3.3 Metode</b>	<b>20</b>
3.3.1 Živalski model	20
3.3.2 Statistična metoda za analizo rezultatov	20
3.3.3 Izolacija in shranjevanje humanih enterocitov in kolonocitov	20
3.3.4 Kultiviranje podganjih in humanih kolonocitov	23
3.3.5 Štetje celic in spremljanje živosti.....	25

3.3.6 Merjenje aktivnosti tkivne transglutaminaze in aktivnosti maltaze in saharaze v celičnem lizatu .....	28
<b>4. REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>38</b>
4.1 Kultiviranje primarnih kultur podganjih in humanih epiteljskih celic širokega črevesa z gliadinskimi peptidi .....	38
4.2 Spremljanje vpliva gliadinskega pentapeptida p39-43 (P1) na podganje kolonocite .....	38
4.2.1 Vpliv gliadinskega pentapeptida na število in živost podganjih epiteljskih celic širokega črevesa .....	38
4.2.2 Vpliv gliadinskega pentapeptida na aktivnost tkivne transglutaminaze podganjih kolonocitov .....	40
4.3 Spremljanje vpliva toksičnega peptida p31-43 (TP) na podganje in »zdrave« humane kolonocite ter kolonocite bolnika s Crohnovo boleznijo .....	43
4.3.1 Vpliv toksičnega peptida p31-39 (TP) na podganje kolonocite .....	44
4.3.2 Spremljanje vpliva toksičnega peptida p31-43 (TP) na »zdrave« humane kolonocite .....	53
4.3.3 Spremljanje vpliva toksičnega peptida p31-43 (TP) na kolonocite bolnika s Crohnovo boleznijo .....	61
<b>5. SKLEPI .....</b>	<b>66</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>68</b>

## POVZETEK

Bolezni prebavnega sistema so zelo razširjene, zato je tudi proučevanje vzrokov nastanka teh bolezni, tako in vivo, kot in vitro, predmet sodobne medicinske in biomedicinske znanosti. Najpogostejše so kronične vnetne črevesne bolezni ozkega in širokega črevesa, kot so na primer, celiakija in Crohnova bolezen. Za razvoj celiakije so poleg genetske predispozicije ključni predvsem toksični peptidi glutena, ki so prisotni tako med gliadini kot tudi med glutamini. Ti peptidi povzročajo značilne histološke spremembe sluznice tankega črevesa. Do sedaj je bilo izvedeno malo raziskav, ki bi potrdile, ali imajo ti peptidi tudi morebiti kakšen vpliv na široko črevo. Za testiranje učinkov glutenskih (gliadinskih) peptidov so se razvili številni in vitro testni modeli. Velik pomen imajo primarne kulture epitelijskih celic debelega črevesa. Le-te omogočajo proučevanje tako dejavnikov tveganja, sprožilcev, kot tudi sam potek kroničnih vnetnih črevesnih bolezni.

Namen naloge je bil proučiti vpliv gliadinskega pentapeptida p39-43 (P1) in toksičnega peptida p31-43 (TP) na kultivirane podganje kolonocite in vpliv istega toksičnega peptida na kultivirane humane »zdrave« kolonocite in kolonocite bolnika z Crohnovo boleznijo. Vplive peptidov v kulturah podganjih in humanih kolonocitov smo spremljali v toku 48 urnega kultiviranja s peptidom in pri tem ugotavljali morebiten vpliv gliadinskih peptidov preko števila in živosti epitelijskih celic širokega črevesa, aktivnosti encima tkivne transglutaminaze (t-TG) ter preko aktivnosti maltaze in saharaze.

Ugotovili smo, da pentapeptid p39-43 (P1) nima značilnega vpliva na število in živost podganjih epitelijskih celic širokega črevesa, niti na aktivnost t-TG kolonocitov tokom 48 urnega kultiviranja. Tudi pri kultiviranju s toksičnim peptidom p31-43 (TP) nismo ugotovili značilnega vpliva na število in živost epitelijskih celic širokega črevesa, niti na aktivnost t-TG, kot tudi ne na aktivnost maltaze in saharaze kolonocitov v primerjavi s kulturo brez TP.

Pri proučevanju vpliva toksičnega peptida p31-43 (TP) na »zdrave« humane epitelijske celice prav tako nismo dokazali vpliva na število in živost epitelijskih celic širokega črevesa ter na aktivnost t-TG in aktivnost maltaze in saharaze kolonocitov. Proučevali pa smo tudi vpliv istega TP na epitelijske celice širokega črevesa bolnika s Crohnovo boleznijo in ugotovili značilen vpliv na aktivnost t-TG in aktivnost saharaze, medtem ko pa na število in živost celic ter aktivnost maltaze ni imel značilnega vpliva.

Izsledki raziskave so pomembni predvsem za nadaljnje proučevanje vpliva gliadinskih peptidov pri kroničnih vnetnih črevesnih boleznih.

**Ključne besede:** Crohnova bolezen, celiakija, gluten, gliadinski peptidi, in vitro testni modeli, kultiviranje, podganji in humani kolonociti, število in živost epiteljskih celic, aktivnost t-TG, aktivnost maltaze in saharaze.

**SEZNAM OKRAJŠAV**

**A = absorbanca**

**ATP = adenzin trifosfat**

**BP = oznaka za kulture brez dodanega proučevanega peptida**

**CB = Crohnova bolezen**

**CD4 = membranski glikoprotein na citotoksičnih limfocitih T**

**Caco-2 = celična linija iz humanega adenokarcinoma kolona**

**DMSO = dimetil sulfoksid**

**FBS = fetalni goveji serum (angl. Fetal Bovine Serum)**

**GOD = glukoza-oksidadza**

**HLA = človeški levkocitni antigen (angl. Human Leukocyte Antigen)**

**HPLC = tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. High Performance Liquid Chromatography)**

**Hep-2 = celična linija iz humanega karcinoma grla**

**HT-29 = celična linija iz humanega adenokarcinoma kolona**

**HEPES = 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina**

**HMW = visoka molekulska masa (proteinov) (angl. High Molecular Weight)**

**HD = oznaka vzorcev humanih epitelijskih celic debelega črevesa (poleg je še pripisana številka zaporednih biopsij)**

**IU = enota katalitične aktivnosti encima (angl. International Unit)**

**INF- $\gamma$  = interferon- $\gamma$**

**IEC = intestinalna epitelna celična linija**

**KVČB = kronična vnetna črevesna bolezen**

**LMW = nizka molekulska masa (proteinov) (angl. Low Molecular Weight)**

**MF UL = Medicinska fakulteta, Univerza Ljubljana**

**P = prolin**

**P1 = sintezni gliadinski peptid p39-43 (H – PQQPY – OH · HCl)**

**PD = oznaka vzorcev podganjih epitelijskih celic debelega črevesa (poleg je še pripisana številka zaporednih žrtvovanih podgan oziroma zaporedja izoliranega črevesa)**

**POD = peroksidaza**

**PBS = fosfatni pufer**

**RS = Republika Slovenija**

**RPMI = tip medija za celične kulture (angl. Roswell Park Memorial Institute)**

**SD = standardna deviacija**

**t-TG = tkivna transglutaminaza**

**TP = sintezni toksični peptid p31-43 (H-LGQQQPFPPQQPY-OH\*HCl)**

**TGO = Tris Glukoza-Oksidazni reagent**

**TMB = 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin**

**UK = ulcerozni kolitis**

**Q = glutamin**



## 1. UVOD

Bolezni prebavnega sistema so zelo razširjene, zato je tudi proučevanje vzrokov nastanka teh bolezni, tako in vivo, kot in vitro, predmet sodobne medicinske in biomedicinske znanosti. Najbolj pogoste so kronične vnetne črevesne bolezni ozkega in širokega črevesa, kot so, na primer, celiakija in Crohnova bolezen. Vsako raziskovanje pa zahteva dobro poznavanje preiskovanega organskega sistema, organa, tkiva in celične strukture le-tega, tako pri človeku, kot pri živalskih modelih, ki so nam v pomoč pri bazičnih raziskavah fizioloških in patoloških procesov, ki privedejo do izražene bolezni.

### 1.1 Zgradba in funkcija ozkega črevesa

Ozko črevo (latinsko *intestinum tenue*) je najdaljši del prebavnega sistema (pri človeku 6-7m, pri podganah 1,4m in pri miših 35cm), v katerem poteka dokončno prebavljanje hrane, absorpcija hranilnih snovi, ionov in vode, sekrecija, tvorba hormonov in nevrotransmiterjev ter obramba pred bakterijami, endotoksini itd. Sestoji iz treh predelov, ki tvorijo prehod iz želodca do širokega črevesa (2, 3):

**dvanaestnik** (latinsko *duodenum*), v katerega pritekajo sokovi iz trebušne slinavke ter žolč iz jeter:

- ◆ poteka od vratarja želodca do duodeno-jejunalnega zavoja
- ◆ leži pred hrbtenico v žlični in popkovni regiji
- ◆ zvit je v obliki podkve in objema glavo trebušne slinavke
- ◆ je razmeroma negibljiv

**tešče črevo** (lat. *jejunum*):

- ◆ zgornje ozko črevo je dolgo 2,5 metra
- ◆ začne se v duodeno-jejunalnem zavoju
- ◆ leži zgoraj in levo od popka
- ◆ ima širšo svetlino in debelejšo steno

**vito črevo** (lat. *ileum*):

- ◆ spodnje ozko črevo je v povprečju dolgo 3,5 metra
- ◆ konča se v ileo-cekalni zaklopki (prehod v široko črevo)
- ◆ leži bolj desno, spodaj in v medenici

Stena ozkega črevesa je zgrajena iz štirih plasti:

**Seroza** ali visceralni peritonej je enoskladen ploščat epitelij na zunanji strani ozkega črevesa (15).

**Mišična plast** je sestavljena iz krožno in vzdolžno urejene gladke mišičnine. Krožna mišičnina izvaja lokalne kontrakcije, kar omogoča mešanje vsebine z prebavnimi sokovi ter stik s sluznico. Vzdolžna plast mišic se krči peristatično in potiska vsebino ozkega črevesa naprej (14,2).

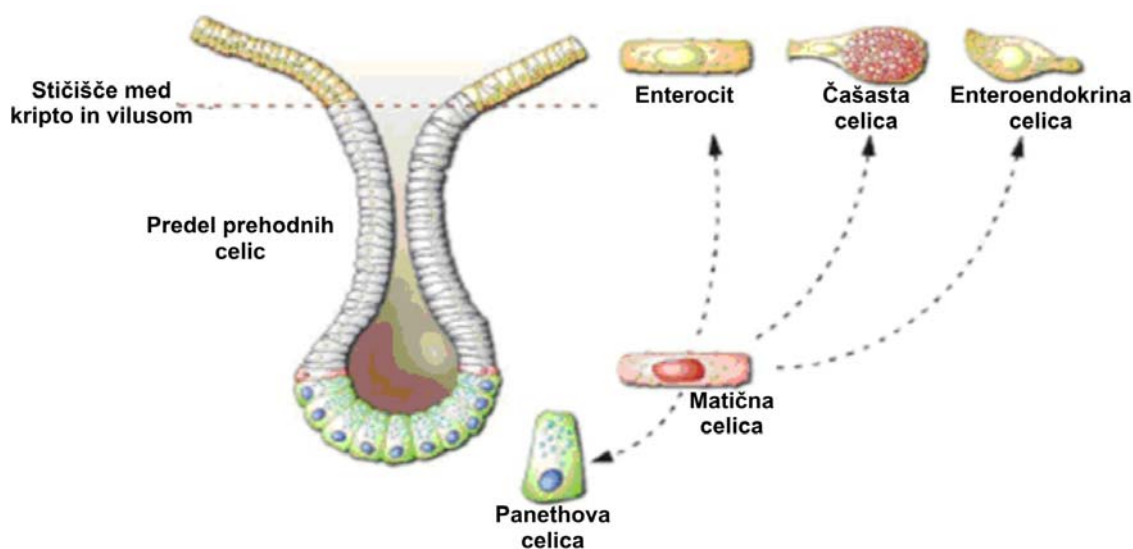
**Podskuznica** ali submukoza je sestavljena iz rahlega vezivnega tkiva, krvnih in limfnih žil, živcev in živčnih vozljev; prisotne so lahko tudi maščobne celice. Submukoza dvanajstnika se razlikuje od submukoze preostalega ozkega črevesa po prisotnosti Brunnejevih žlez, ki izločajo viskozno, alkalno tekočino. Izločki žlez ščitijo začetni del ozkega črevesa, tako da nevtralizirajo kislo vsebino, ki pride iz želodca (14).

**Črevesna sluznica** ali mukoza je močno prečno nagubana. Z mikroskopom vidimo številne prsaste izrastke imenovane resice. Črevesne resice skupno s sluzničnimi gubami močno povečajo notranjo površino črevesa. S tem je zelo olajšano vsrkavanje hranilnih snovi. V vsako resico vodijo krvne žilice in drobni limfni vodi. Zunanjo plast resic prekrivajo absorptivne epiteljske celice imenovane enterociti. Enterociti imajo na površini mikrovile, ki so prekriti z glikokaliksom. Vse skupaj ima pod mikroskopom krtačast videz. Na površinskem delu enterocita so lokalizirani poglobitni sluznični prebavni encimi (disaharidaze in aminopeptidaze). Lamina proprija mukoze vsebuje številne celice, ki sodelujejo pri imunskem odzivu in so del t.i. črevesnega imunskega sistema. Te celice so limfociti, plazmatke, makrofagi, eozinofilci in tkivni bazofilci (3,4).

Med posameznimi resicami so jamice imenovane, Lieberkühnove kripte, ki potekajo skozi lamino proprijo do mišične plasti sluznice. V sluznici ozkega črevesa so številne žleze, ki izločajo v črevo črevesni sok (15).

### 1.1.1 Epitelijske celice ozkega črevesa

**Izvirne celice** (matične celice) ležijo na dnu Lieberkúhnovih kript. Gre za nediferencirane celice, ki se neprestano delijo in producirajo nove epitelijske celice. Izvirna celica se v kripti vsakih 24 ur deli na dve hčerinski celici, od katerih ena ostane izvorna, druga se diferencira preko hitro deleče se progenitorne celice v eno izmed preostalih epitelijskih celic; bodisi v enterocit, čašasto, enteroendokrino celico ali pa v Panethovo celico (Slika 1). Med diferenciacijo se vrši migracija epitelijskih celic proti vrhu resice, le Panethove celice med diferenciacijo migrirajo v obratno smer – proti dnu kripte. Izvirne celice v črevesu predstavljajo ene izmed najhitreje delečih se celic v telesu, kar omogoča, da se epitelij ozkega črevesa obnovi pri človeku v 3-6 dneh. Ko epitelijske celice dosežejo vrh črevesne resice, zapadejo procesu apoptoze in se odluščijo v lumen črevesa. Le Panethove celice odmrejo na dnu kripte, kjer jih fagocitirajo okoliške celice. Procesi proliferacije, celične migracije, diferenciacije ter apoptoze morajo biti strogo regulirani, da se zagotavlja homeostaza črevesnega epitelijskega (12,13).



**Slika 1:** Shematski prikaz petih vrst epitelijskih celic ozkega črevesa.

**Enterociti** so visoke stebričaste celice. Na apikalni strani (ki gleda proti svetlini črevesa) imajo resasto površino iz številnih mikroresic, le-te so prekrivane z glikokaliksom. Struktura enterocitov odseva njihovo visoko metabolno aktivnost, proteinsko sintezo in sekretorno aktivnost. Zato je njihova citoplazma bogata z mitohondriji in endoplazmatskim retikulumom. Številni mitohondriji oskrbujejo celico s potrebno energijo v obliki ATP; zrnati

endoplazmatski retikulum in Golgijev aparat pa sta odgovorna za sintezo in glikozilacijo tako citoplazemskih kot membranskih proteinov. Enterociti so med seboj povezani s tesnimi stiki. Ti fizično in funkcionalno razdelijo celico na apikalno in bazalno površino in preprečujejo gibanje membranskih proteinov preko cone celičnega stika. Tesni stiki v organizmu preprečujejo prehod molekul in ionov skozi medcelični prostor. Ti stiki med enterociti pa vendarle niso tako tesni, saj poteka absorpcija nekaterih snovi tudi paracelularno. Glavni funkciji enterocitov sta končna prebava in absorpcija hranilnih snovi, elektrolitov in vode. Zadnja stopnja razgradnje manjših peptidov in disaharidov se vrši na resasti površini enterocitov. Tukaj so peptidaze in črevesne disaharidaze zasidrane v membrano kot integralni membranski proteini. Na resasti površini enterocitov so poleg encimov tudi številni prenašalci, ki omogočajo absorpcijo prebavljenih snovi: ionov, monosaharidov, aminokislin in manjših peptidov. Lipidi prehajajo v enterocite z difuzijo. Življenjska doba enterocitov je kratka, in sicer pri človeku le 5-6 dni. V zadnji stopnji njihovega življenjskega cikla, ko dosežejo vrh resice, pride do apoptoze in luščenja enterocitov v svetlino črevesa (16,17).

**Čašaste celice** izločajo z glikoproteini bogato sluz na apikalno stran celice. Plast sluzi na črevesni površini predstavlja zaščitno pregrado in preprečuje encimsko razgradnjo stene črevesa. Celice so čašaste oblike s številnimi mucinogenimi granulami ter ozkim bazalnim delom, kjer ležijo jedro in organeli. Število čašastih celic narašča od dvanajstnika do terminalnega dela ileuma. Njihova življenjska doba je tako kot pri enterocitih 5-6 dni (16).

**Enteroendokrine celice** so v ozkem črevesu najpogosteje prisotne v nižjih plasteh kript, vendar se lahko pojavijo na vseh področjih epitelijskega. Izločajo številne hormone: holecistokinin (stimulira izločanje pankreatičnih encimov in kontrakcijo žolčnika), sekretin (stimulira izločanje bikarbonata in s tem uravnava pH v ozkem črevesu), gastrični inhibitorni peptid (inhibira praznjenje želodca in izločanje kisline),... (14,15)

**Panethove celice** najdemo na dnu Lieberkühnovih kript. Izločajo številne antimikrobne molekule (lizocim,  $\alpha$ -defenzin, fosfolipazo A<sub>2</sub> in druge glikoproteine) v svetlino kripte in tako prispevajo k vzdrževanju črevesneintestinalne pregrade. Panethove celice fagocitirajo nekatere bakterije in imajo verjetno vlogo pri regulaciji črevesne mikrobiote in zaščiti izvornih celic. Življenjska doba teh celic je približno štiri tedne (14).

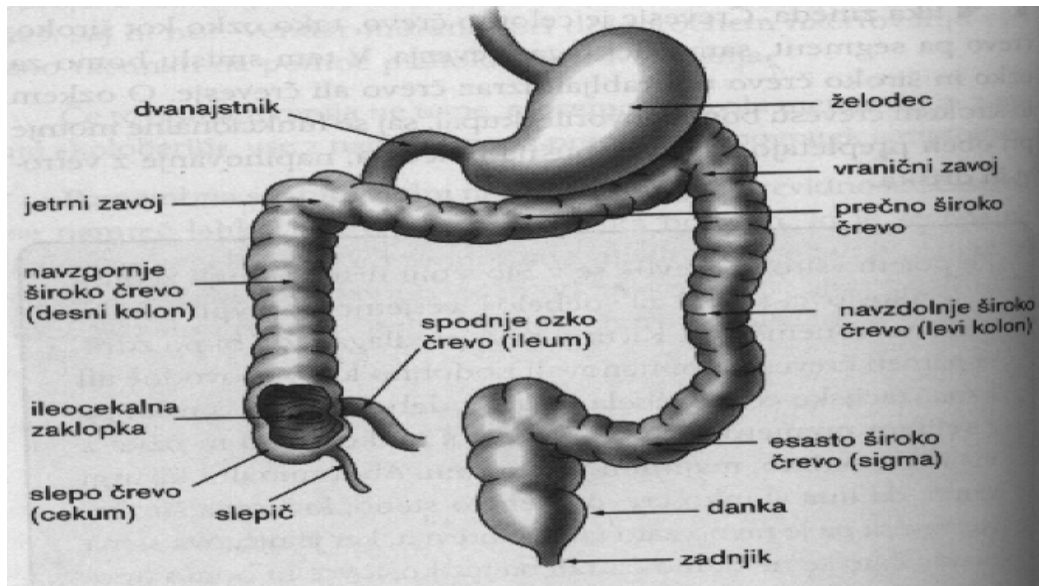
## 1.2 Zgradba in funkcija širokega črevesa

Široko črevo (*lat. intestinum crassum, colon*) je zadnji del prebavne cevi, ki se konča pri danki. Dolgo je približno meter in pol. Čeprav je ozko črevo za življenje bolj pomembno od širokega, ima le-ta tudi pomembno vlogo pri reabsorpciji vode in nekaterih vitaminov, tvorbi blata iz kaše, ki pride iz ozkega črevesa, zadrževanje blata do odvajanja, obenem pa je bolj dostopno in lažje se ga nadzira pri morebitnih motnjah. V ozkem črevesu deluje le malo bakterij, medtem ko v širokem črevesu živi več milijard bakterij. Črevesno floro sestavlja skupaj kar 100.000 milijard mikroorganizmov, ki jih je več kot 4000 različnih vrst. Tu je 10-krat več bakterij, kot je v telesu celic. Ti prebivalci črevesa pripomorejo k dokončnemu razkroju hrane. In sicer prebavljajo tiste ostanke hrane, ki jih organizem drugače ne more uporabiti (vlaknino). Iz njih pridobivajo energijo, pri njihovi presnovi pa nastajajo snovi, ki na različne načine ugodno učinkujejo na telo (2,19).

Za splošno rabo je najbolj ustrezna delitev na desno in levo široko črevo. Če pa hočemo natančnejšo delitev, ga razdelimo na tri dele: slepo črevo, široko črevo in danko (Slika 2).

**Slepo črevo** (*lat. cecum*) je kratek začetni del širokega črevesa, ki je na svojem slepem koncu podaljšano v tanek slepič (*lat. appendix vermiformis*). Ta meri v dolžino okrog 8 cm. Včasih doseže tudi dolžino 20 cm, ali pa je prav kratek. Mikroskopsko vidimo v sluznici slepiča mnogo limfatičnega tkiva s številnimi limfnimi folikli.

Od slepega črevesa poteka široko črevo navzgor do jeter (*lat. colon ascendens*), kjer zavije prečno in poteka od želodcem v levo stran do vranice (*lat. colon transversum*) in dalje navzdol do leve črevnice (*lat. descendens*). Nad levo črevnico poteka široko črevo v obliki črke S mimo brda (*lat. colon sigmoideum*) in vstopi v malo medenico kot danko (*lat. rectum*). Od slepega črevesa do danke široko črevo drugače skupaj imenujemo »široko črevo v ožjem pomenu« (*lat. colon*). Danko leži tik pred križnico, se nadaljuje ob trtici v loku navzad in se v zadnjični brazdi odpira na prosto kot zadnjik (*lat. anus*). Danko je pred križnico mehasto razširjena. Tu se kopiči blato. Danko nima mošnjic. Krožno mišičje danke je ob zadnjiku okrepljeno v krožno zadnjikovo notranjo zapiralko, ki je samogibna mišica. Druga je zadnjikova zunanja zapiralka, ki je del medenične prepone ob zadnjiku in zadaj priraščena na trtico. Zunanja zapiralka se krči voljno. Zunanja mišica zapiralka na koncu zadnjika ni več del širokega črevesa (2).



**Slika 2:** Shematski prikaz širokega črevesa in njegovega položaja v trebuhu.

Ozko črevo prehaja v široko črevo nad desno črevnico. Ustje oblikujeta visoki gubi iz sluznice in krožnega mišičja (Bauchinijeve zaklopke). Gubi sta tako usmerjeni, da se črevesna vsebina lahko preliva le iz ozkega v široko črevo, ne more pa praviloma uhajati v nasprotno smer. Zunanji videz širokega črevesa se izrazito razlikuje od zunanjega videza ozkega črevesa. A kljub temu je stena širokega črevesa v glavnem zgrajena kot pri ozkem črevesu, obstajajo pa znotraj zgradbe tudi posebnosti, značilne za široko črevo (2).

Stena širokega črevesa je zgrajena:

**Seroza** ali visceralni peritonej je enoskladen ploščati epitelij. Celotno prečno široko črevo je pokrito z serozo, medtem ko pa so deli v naraščajočem in padajočem širokem črevesu pokriti s perietalnim listom (14).

**Mišična plast** je sestavljena iz notranjih in zunanjih krožno, vzdolžno urejenih plasti gladke mišičnine. Sam videz mišične plasti je drugačen od tistega v ozkem črevesu. Notranja krožna mišičnina je tipična in predstavlja nekakšen tulec okrog širokega črevesa. Zunanja vzdolžna plast mišičnine pa je omejena na tri različne, zelo debele pasove (vzdolžnih) mišičnih vlaken, ki se imenujejo *teniae coli*. Le tanek sloj vzdolžnih mišic pa obdaja notranjo, krožno plast mišic med *teniae coli*. Mišična vlakna segajo približno centimeter v širino in so približno enakomerno razporejene okoli oboda širokega črevesa ter v nerednih intervalih prodirajo v

notranjo, krožno plast mišičnine. Te prekinitve mišične plasti omogočajo segmente širokega črevesa. Posebna značilnost pa predstavljajo številne vrečke, tako imenovane haustra, in ležijo oziroma potekajo vzdolž širokega črevesa (14,2).

**Podsluznica** ali submukoza je podobna tisti v ozkem črevesu. V podsluznici je mogoče najti precejšnje količine maščob (14).

**Črevesna sluznica** ali mukoza širokega črevesa sestavlja enoskladni, stolpničasti epitelij, vezivna lamina propria ter tanek mišični sloj. Sama struktura sluznice širokega črevesa je značilna. Tu sicer niso prisotne črevesne resice, gube, kot je to značilno za sluznico ozkega črevesa. Ne manjka pa v sluznici številnih cevastih žlez, ki so razširjene vse tja do mišičnega sloja. Sluznica v širokem črevesu ne izloča več prebavnih sokov, saj je prebava hrane tukaj že končana, pač pa samo sluz, ki maže iztrebke in jim lajša prehod. Protitelesa v sluzi nas ščitijo pred različnimi bakterijskimi okužbami. Lamina propria mukoze je videti zelo celična. Pretežno so prisotne plazmatke skupaj z razpršenimi limfociti (večinoma T-celice). Nevtrofilci pa so prisotni občasno pri normalni biopsiji kolona. Če se njihovo število poveča bodisi na površini ali v Lieberkühnovih kriptah to kaže na vnetje. Lamina propria je še posebej bogata z limfnimi folikli in limfnimi celicami, ki lahko prekinejo redni razmik Lieberkühnovih kript in se razširijo v podsluznico (14).

### 1.2.1 Epitelijske celice širokega črevesa

Pri širokem črevesu najdemo v epiteliju enake tipe celic kot pri ozkem črevesju. In sicer imamo naslednje celice: **izvirne celice** (matične celice), **člašaste celice**, **Panethove celice**, **enteroendokrine celice** ter **kolonocite**. Panethovih celic sicer pri odraslem človeku normalno ni veliko, pa tudi enteroendokrine celice so redke, medtem ko je število člašastih celic obilno. Člašaste celice se pogosteje pojavljajo v Lieberkühnovih kriptah, kot pa na površini, in njihovo število se povečuje od levega kolona proti danki. Izločajo kisli sulfomucin. Kot v ozkem črevesu, se tudi v širokem črevesu nediferencirane celice nahajajo na spodnjem delu Lieberkühnovih kript.

**Kolonociti** so zrele, stebričaste, nedeleče-se celice epitelija širokega črevesa. Uvrščamo jih v eno od večjih linij epiteljskih celic, ki se med seboj razlikujejo v morfološki in funkciji. Imajo tanko, progasto površino ter ultrastrukturne značilnosti, ki na splošno spominjajo na značilnosti enterocitov iz ozkega črevesa. Naloga kolonocitov je pretežno absorpcija vode.

Mehanizem absorpcije pri teh celicah je podoben mehanizmu absorpcije v ozkem črevesu. Življenjska doba kolonocitov je kratka, in sicer pri človeku le 4-6 dni (14).

### **1.3 Kronične vnetne črevesne bolezni**

Glavni obliki kroničnih vnetnih črevesnih bolezni (KVČB) sta ulcerozni kolitis in Crohnova bolezen. Pomembno vlogo pri nastanku KVČB imajo genetski dejavniki, hkrati pa na potek bolezni vplivajo tudi dejavniki okolja. Za KVČB obolevajo pogosteje ljudje v mestnih okoljih, predvsem belci, medtem ko med spoloma ni večjih razlik. Ulcerozni kolitis (UK) in Crohnova bolezen (CB) običajno potekata kronično z akutnimi zagoni vnetja in vmesnimi remisijami (29). Ti dve bolezni zaenkrat nista trajno ozdravljivi. Zdravljenje poteka simptomatsko, kjer se poskuša vzdrževati izboljšano stanje ter zmanjšati pogostnost zagonov bolezni. Na tem področju se izvajajo številne študije, ki poskušajo razjasniti etiopatogenezo obeh bolezni. Pri raziskavah so opazili določena dejstva, ki kažejo povezanost kroničnih vnetnih črevesnih bolezni (KVČB) s celiakijo. Obe prizadeneta prebavno cev in povzročita vnetno reakcijo in imunski odziv, kjer pride do patoloških sprememb črevesne sluznice. Pojavnost KVČB je pri bolnikih s celiakijo večja kot pri ostali populaciji. KVČB se običajno v teh primerih pojavi sekundarno (bolnik ima že celiakijo), manj je obratnih primerov, kjer se pri bolniku KVČB pojavi oziroma razvije še celiakija. Vsa ta dejstva kažejo na določene skupne točke obeh bolezni, vendar je na področju etiopatogeneze še veliko vprašanj (20,21).

#### **1.3.1 Crohnova bolezen**

Crohnova bolezen (CB) lahko prizadene prebavno cev od ust do zadnjične odprtine. Približno tretjina bolnikov ima prizadeto ozko črevo, tretjina široko črevo, preostali pa oba dela črevesa. Vnetje zajame vse sloje črevesne stene (pri UK je prizadeta le sluznica) in je lahko vzrok za zožitve črevesne sluznice, za fistule in abscese. Klinična slika oziroma bolezenski znaki pri Crohnovi bolezni so odvisni predvsem od umestitve vnetja v prebavni cevi, od razširjenosti vnetja in pridruženih zunajčrevesnih znakov. Značilni simptomi in znaki so bolečine v trebuhu, neješčnost, slabost, kronične (lahko krvave) driske, lahko tudi malabsorpcije (moteno vsrkavanje hranilnih snovi, vitaminov in mineralov iz črevesne svetline v kri) in s tem izguba telesne teže ter zaostanek v rasti in razvoju pri otrocih. Pojavijo se lahko še zunajčrevesni znaki: vnetje v sklepih, osteoporoza, vnetje beločnic, kožne spremembe,... Z diagnostičnim postopkom se poskuša ugotoviti bolezen, ki bolniku povzroča težave. Pri tem sta odločilna endoskopski in histološki izvid. Te vrstne preiskave niso pomembne samo za potrditev diagnoze, ampak tudi za ugotavljanje razširjenosti in resnosti



bolezni, zapletov, spremljanje zdravljenja in preprečevanje oziroma zgodnje odkrivanje raka širokega črevesa ,...Endoskopska podoba CB širokega črevesa je zelo raznolika. Klasična značilnost so segmentne bolezenske okvare sluznice, kjer so prizadeti deli ločeni od normalne črevesne sluznice. Lahko vidimo rane, sluznične krvavitve in t.i. lažne polipe. Pri endoskopskem pregledu se vedno naredi biopsija za histološki pregled. Histološke značilnosti CB so granulomi, neenakomerno vnetje sluznice z žarišnim kriptitisom, nesorazmerno intenzivno vnetje v submukozi. Čašaste celice so relativno dobro ohranjene, kriptni abscesi so redki. Bolnike s KVČB se večinoma zdravi z zdravili. Uporabljajo se kortikosteroidi, nesteroidna protivnetna zdravila (aminosalicilati), imunomodulatorji (npr. merkaptopurin, metotrekset, azetioptin), antibiotiki in t.i. biološka ali tarčna zdravila (npr. protitelesa proti faktorju tumorske nekroze). Pri otrocih se kot način zdravljenja pogosto uporablja zdravljenje s posebno prehrano – t.i. enteralna prehrana. V zadnjih letih se vedno bolj uporablja tudi probiotiki. Če tako zdravljenje ni uspešno ali če nastanejo zapleti, pa je potrebno včasih operativno zdravljenje. Operativno zdravljenje CB je samo simptomatsko. Potrebno je takrat, kadar bolezenski znaki ogrožajo življenje in kadar bolezen kljub ustreznemu zdravljenju z zdravili napreduje in močno poslabšuje kakovost bolnikovega življenja. Cilj kirurškega posega pri CB je pozdraviti zaplet in ob tem, kolikor je le mogoče, ohraniti črevo. Bolezni ni mogoče s kirurškim posegom pozdraviti (18).

### **1.3.2 Ulcerozni kolitis**

Ulcerozni kolitis (UK) praviloma prizadene le široko črevo in pri tem je vedno bolezensko spremenjena sluznica rektuma. Vnetni proces poteka neprekinjeno brez vmesnih neprizadetih predelov sluznice in je omejen na sluznico in podsluznico ter se začne v rektumu, kasneje pa se širi proksimalno po širokem črevesu. Klinična slika zagona UK je odvisna od aktivnosti in razširjenosti vnetja sluznice širokega črevesa. Pri blagi oziroma zmerni obliki boleznii so v ospredju driska, pojav krvi v blatu, bolečine v spodnjem delu trebuha ter občutek nujnega odvajanja blata. Pri hujših oblikah pa nastopijo tudi zunajčrevesni simptomi, kot so zvišana temperatura, neješčnost, izguba telesne teže, utrujenost, anemija, kožne spremembe,... Diagnostika zajema kolonoskopijo s histološkim pregledom sluznice. UK se zdravi na podoben način in z istimi zdravili kot CB. Bolnike z UK je z operacijo mogoče popolnoma pozdraviti, vendar samo, če se odstrani celo široko črevo in danko, vendar tak poseg povzroča invalidnost bolnika in vrsta drugih nezaželjenjih učinkov,...(18)

### 1.3.3 Sindrom razdražljivega črevesa

Sindrom razdražljivega črevesa (SRČ) ali iritabilni kolon je motnja, pri kateri je trebušna bolečina povezana z iztrebljanjem ali spremembami pri iztrebljanju. Prisotno mora biti oboje: trebušna bolečina in neurejeno odvajanje (driska ali zaprtje). Lahko se pojavi tudi sluz v blatu, spremenjena trdota blata ter občutek napetega trebuha. Marsikdaj se težave pojavijo že v otroštvu in se nadaljujejo vse do odrasle dobe. Zdravnik, ki ima opravka s takim bolnikom, navadno poleg naštetih težav skuša odkriti tudi druge telesne ali duševne bolezni. Diagnostika zajema pregled trebuha, rektalni digitalni pregled, laboratorijske preiskave in pogosto endoskopijo (23). Ker gre za funkcionalno motnjo, so izvidi vseh preiskav normalni. Danes menijo, da je SRČ posledica motenj v delovanju črevesnega živčnega sistema. Pomembno vlogo pri nastanku pa imajo tudi vnetje blage stopnje, spremembe v sestavi črevesne mikrobiote in psihogeni dejavniki.

Zdravljenje je simptomatsko. Uporabljajo se različna zdravila, ki vplivajo na gibljivost črevesa, dietna prehrana in probiotiki.

## 1.4 Celiakija

**Celiakija** ali glutenska enteropatija je bolezen zgornjega dela ozkega črevesa. Motnja je trajna. Zanj je značilna imunsko posredovano vnetje sluznice ozkega črevesa s posledično spremembo v zgradbi ozkega črevesa (prizadeta predvsem resasta površina – pomembna za prebavo in absorpcijo prebavljenih snovi v krvi). In je posledica trajne intolerance za gluten. Vzroki za tovrstno stanje so lahko tudi avtoimunski dejavniki. Stanje se pojavlja pri genetsko disponiranih osebah, ki uživajo prolamine pšenice, rža in ječmena (8). Pojavi se lahko v katerem koli življenjskem obdobju. Vse pogosteje odkrivajo to bolezen pri odraslih in celo pri starostnikih. Vzroki za spremenjeno pojavljanje klinične slike celiakije še niso dokončno pojasnjeni. Možni dejavniki kasnega pojavljanja so lahko kasnejše uvajanje glutena v prehrano otrok in/ali spremembe v količini in kvaliteti glutena, ki ga otrok zaužije. Dojenje je lahko dejavnik za ne pojavljanje celiakije, vendar pa podaljšano obdobje dojenja lahko privede do kasnega pojava bolezni. Celiakija se lahko pojavi v klasični obliki z značilnimi kliničnimi znaki (driske, 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, ... (5) Bolniki s celiakijo morajo takoj po diagnosticiranju bolezni začeti z doživljenjsko brezglutensko dieto. Osnova zdravljenja je popolna odstranitev glutena iz prehrane. Cilj je

obnova okvarjene sluznice črevesa in preprečitev zapletov bolezni. V prihodnosti je pričakovati zdravila in druge metode za zdravljenje celiakije (6). Obstaja nekaj zanimivih alternativnih osnov za novo zdravljenje bolezni. Ena izmed njih je dodajanje encimov, ki bi v prebavilih pospešili razgradnjo glutena, bogatega s prolinom, zlasti njegovih proteolitično stabilnih antigenskih peptidov. Dodatne strategije pa strmijo k zmanjšanju aktivnosti za gluten reaktivnih T celic, skupaj s inhibicijo aktivnosti tkivne transglutaminaze, ki ima do glutenskih peptidov visoko afiniteto. S tem bi bila preprečena vezava gliadinskih peptidov na molekulo HLA-DQ2 ali HLA-DQ8. Druge možnosti zdravljenja pa so citokinske terapije in uporaba selektivnih adhezivnih molekul, ki inhibirajo vnetne reakcije (48). Kljub temu, da so nekatere metode že pripomogle k zdravljenju, trenutno pri tem črevesnem obolenju pomaga edino dosledna in po današnjih rezultatih raziskav za vse življenje spreminjena prehrana. Po prehodu na brezglutensko prehrano se zdravstveno stanje prizadetega zelo hitro izboljša. Gluten ni življenjsko pomembna hranilna snov. Kot oznaka za brezglutensko živilo velja besedna zveza »brez glutena« ali prečrtan pšenični klas (Slika 3) (11).



**Slika 3:** Oznaka za brezglutensko živilo (*prečrtan pšenični klas*).

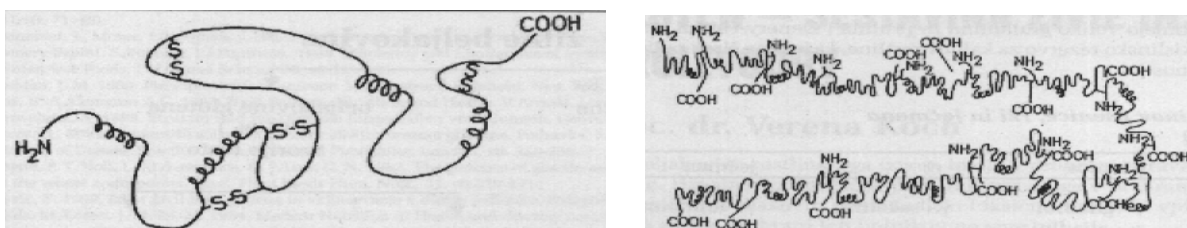
Patogenezo celiakije pojasnjuje biokemijska in imunološka teorija. Biokemijska temelji na predpostavki specifičnega encimskega deficita, medtem ko druga predpostavlja, da je osnovni vzrok imunološka motnja. Poznani so imunski mehanizmi, katerih posledica je poškodba sluznice. Pri razvoju prekomernega imunskega odziva v lamini propriji sluznice je pomemben encim enterocitov – TKIVNA TRANSGLUTAMINAZA. Encim ima visoko afiniteto do glutenskih peptidov, bogatih z glutaminom, in deaminira gliadin ter pomaga pri nastajanju epitopov, ki se uspešno vežejo na molekule DQ2, kjer jih prepoznavajo črevesne T-celice. Prek njihovega odziva se aktivirajo specifične celice B, ki proizvajajo protitelesa proti gliadinu, proteinom v telesnih stikih ter drugim delom tkiva; poleg tega pa vplivajo tudi na tvorbo specifičnih avtoprotiteles proti t-TG. Prične se hiperreaktiven imunski odziv s produkcijo IFN- $\gamma$  ter drugih citokinov in poškodbo sluznice ter apoptozo epitelijskih celic. Pri bolniku, ki ima aktivno obliko celiakije z atrofijo sluznice, se zazna značilen upad aktivnosti

vseh ČREVESNIH DISAHARIDAZ (maltaze, saharaze, laktaze, trehalaze,...). Izjema je blaga oblika bolezni, kjer se zmanjša le aktivnost laktaze, medtem ko sta aktivnosti maltaze in saharaze lahko normalni (5).

Čeprav so pri celiakiji znani osnovni vzroki in procesi pa je na področju etiopatogeneze še veliko nejasnosti. Rešitev odprtih vprašanj je pomembna tudi zaradi iskanja novih terapevtskih možnosti, ki bi lahko nadomestile brezglutensko dieto, ki je za bolnika s celiakijo doživljenjska in obremenjujoča (10).

## 1.5 Toksični peptidi glutena

**Gluten** ali lepek je sestavljena beljakovina, ki se nahaja v zrnju nekaterih žitaric. Je najpomembnejši dejavnik za razvoj celiakije. Gluten je sestavljen iz dveh skupin proteinov glutenina in gliadina (Slika 4). Gliadini vsebujejo določena sorodna aminokislinska zaporedja, ki lahko pri bolniku s celiakijo sprožijo imunski odziv oziroma so odgovorna za glutensko intoleranco. Gliadini kot tudi glutenini so rezervni proteini endosperma pšeničnega zrna. Dolgo je veljalo prepričanje, da glutenini niso vpleteni v patogenezo celiakije. Klasifikacija, ki temelji na primarni struktur proteinov, pa pokaže, da obstajajo podobnosti med gliadinskimi in gluteninskimi proteini z mnogimi ponavljajočimi se aminokislinskimi sekvencami. Dokazano pa je tudi, da gliadinski kot gluteninski proteini pri celiakiji sodelujejo pri imunskem odzivu. Zaradi teh ugotovitev je tradicionalna klasifikacija na gliadine in glutenine nepomembna za ugotavljanje in ocenjevanje toksičnosti proteinov v celiakiji. Pomembna je klasifikacija teh proteinov glede na primarno strukturo ter iskanje tistih delov, ki so odgovorni za pojav oziroma razvoj celiakije (7,22).



**Slika 4:** Struktura gliadina (*slika na levi*) in struktura gluteninov (*slika na desni*).

### 1.5.1 Gliadinski peptidi

In vitro študije toksičnosti peptidov gliadina so pomembne pri proučevanju in razumevanju patogeneze celiakije. Toksični peptidi gliadina imajo vpliv tudi na široko črevo (52). Prav

tako pa so in vitro študije pomembne za testiranje domnevno netoksičnih peptidov glutena, kar bi morebiti pripomoglo tudi pri razvoju novih terapevtskih možnosti.

Dosedanje študije kažejo, da so v proces nastanka celiakije vključeni različni glutenski peptidi, ki lahko sprožijo imunski odgovor, ali delujejo direktno toksično na sluznico ozkega črevesa. Izmed glutenskih peptidov so bolj raziskani gliadini, medtem ko so za glutenine dolgo časa predvidevali, da so neškodljivi. Kasnejše raziskave so odkrile imunostimulatorne peptide tako med  $\alpha$ -gliadini,  $\gamma$ -gliadini kot tudi med nizkomolekulskimi (LMW) in visokomolekulskimi (HMW) glutenini. Pomembno je bilo odkritje 33-mernega peptida  $\alpha$ -gliadina (p57-89), ki vsebuje kar šest epitopov. Med temi je glavni fragment p57-68, ki preko vezave na HLA-DQ2 sproži CD4 T celično prepoznavo pri večini bolnikov s celiakijo. Drug fragment, ki prav tako pripada  $\alpha$ -gliadinu (p31-49), je izkazal toksičen učinek tako in vitro kot in vivo in je verjetno pomemben pri aktivaciji prirojenega imunskega sistema. Toksična pa je tudi krajša sekvenca tega peptida (p31-43). Posebnost, opažena pri glutenskih epitopih, je visoka vsebnost prolinskih (P) in glutaminskih (Q) ostankov. S tem se poveča odpornost na encimsko razgradnjo v gastrointestinalnem traktu; poveča se tudi možnost za vezavo na HLA-DQ. V peptidih glutena se pogosto zasledijo naslednje sekvence: QP, QXP in QXXP, kjer je X katerakoli aminokislina (47, 48, 49, 50,51).

Po identifikaciji vseh 266 aminokislin A-gliadina (frakcija  $\alpha$ -gliadina) se je začelo sintetiziranje številnih gliadinskih peptidov in testiranje njihove toksičnosti (Slika 5). V zadnjih letih pridobivajo čiste gliadinske peptide tudi s pomočjo kombinacije reverzno-fazne tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) in masne spektrometrije. Te peptide testirajo najpogosteje v in vitro sistemih, ki vključujejo različna izolirana tkiva in celice (47).

**31 L-G-Q-Q-Q-P-F-P-P-Q-Q-P-Y-P-Q-P-Q-P-F 49**

**31 L-G-Q-Q-Q-P-F-P-P-Q-Q-P-Y 43**

**44 P-Q-P-Q-P-F-P-S-Q-Q-P-Y 55**

---

Q = GLUTAMIN, L = LEUCIN, P = PROLIN, G = GLICIN, Y = TIROZIN, F = FENILANANIN

**Slika 5:** Primer toksičnih sekvenc gliadinskih peptidov.

## **1.6 In vitro testni modeli**

In vivo študije so omejene le na določena raziskovalna področja, saj se pri teh študijah pojavljajo številne etične dileme. Iz tega stališča predstavljajo in vitro humani in živalski testni modeli pomembno orodje za proučevanje določenih celic, patoloških procesov, vplivov dodanih substanc na celice,...in obenem predstavljajo osnovni pristop k spoznavanju ozadja nastanka oziroma pojava kroničnih vnetnih črevesnih bolezni. V te namene se uporablja ex vivo testne modele.

Celična kultura je homogena ali heterogena populacija celic, ki jih gojimo in vitro pod nadzorovanimi pogoji. Njena uporaba omogoča lažjo dostopnost za opazovanje in eksperimentiranje s celicami. Prednost pred organizmom je lažje zagotavljanje enakih pogojev za vse celice (fizikalno-kemijsko okolje lahko bolje kontroliramo), fiziološki pogoji so relativno konstantni, homogenost vzorca in ekonomičnost (potrebujemo manjše količine reagentov). Pripravimo jo lahko na dva načina. En način je, da prekinemo medcelične povezave v koščku tkiva s pomočjo proteolitičnih encimov (tripsin, kolagenaza). Druga možnost priprave celične kulture pa je, da koščke tkiva nasadimo v gojišče. Ko se koščki tkiva pritrdijo na trdo podlago, začnejo iz njih izraščati celice. V nadaljevanju se koščke tkiva odstrani in tako dobimo celično kulturo. Celice lahko preživijo in se razmnožujejo le v gojišču, ki vsebuje hranilne snovi in ima pravi pH in temperaturo. Kultiviranje mora potekati v sterilnem okolju in ustrezni atmosferi (zrak, v katerem je 5% CO<sub>2</sub>) (24,25).

Raziskovanja potekajo tudi na primarnih suspenzijskih kulturah (45). Kultivacija je zahteven proces, saj celice potrebujejo primerne rastne dejavnike za diferenciacijo, kot tudi ustrezno medcelično komunikacijo. Do sedaj razvite metode za kultiviranje črevesnih celic v primarnih kulturah omogočajo samo kratkotrajno kultiviranje izoliranih črevesnih celic. Primarno kulturo lahko pripravimo s eksplantacijo tkiva, s seciranjem, potem s uporabo neencimskih metod ali s encimsko razgradnjo. Glavna prednost encimske razgradnje je ohranitev medceličnih interakcij. Načrtovanje optimalnih pogojev za rast intestinalnih celic pa je omejevalni element priprave primarne kulture. Osnovnim medijem dodajamo različne kombinacije rastnih faktorjev, hormonov, nosilnih proteinov, včasih tudi spodbujevalce diferenciacije,... V praksi je razvoj kultivacijskega medija dolgotrajen in zahteven. Primarne kulture kultivirajo v vlažnih inkubatorjih pod fiziološko-kemičnimi pogoji, ki predstavljajo dobro povprečje za sesalčje telesne razmere: 37 °C ( $\pm 1$  ° C) in 5-10 % CO<sub>2</sub> pri atmosferi z visoko vlažnostjo, ki preprečuje izhlapevanje medija ( 46).

## **1.7 Kultiviranje epitelijskih celic črevesa**

Začetki kultiviranja tkiva ozkega črevesa segajo že v leto 1969, ko sta Browning in Trier prva uspešno kultivirala biopte človeškega ozkega črevesa. Organsko kulturo sta uspela ohraniti v in vitro pogojih 24 ur. Epitelijske celice so skozi celoten čas kultiviranja ohranile svojo morfologijo in funkcijo ter se normalno proliferirale (34). Ohranjanje ozkega črevesa v in vitro pogojih je omogočilo študije etiopatogeneze nekaterih črevesnih bolezni (celiakije, kronične vnetne črevesne bolezni,...). Trier in Browning sta leta 1970 tudi prva uporabila svojo metodo za kultiviranje sluznice ozkega črevesa bolnikov s celiakijo in ugotovila, da se sluznica v kulturi brez glutena normalizira že po 24 urah kultiviranja (35).

Browning-Trierjeva metoda je bila uspešno uporabljena tudi za kultiviranje tkiva ozkega črevesa različnih živalskih vrst, kjer je bilo potrebno za posamezno vrsto nekoliko prilagoditi pogoje. Leta 1987 so Lukač Bajalo in sod. uspešno kultivirali podganje ozko črevo z modificirano Browning-Trierjevo metodo (25, 36). Tkivo ozkega črevesa je skozi celoten čas kultiviranja (48 ur) ohranilo svojo integriteto in funkcijo. Kultiviranje je uspelo predvsem na račun boljše oksigenacije tkiva med kultiviranjem. Na uspešnost kultiviranja so poleg oksigenacije tkiva vplivali še velikost in oblika kultiviranega tkiva (ker se nekroza pojavlja najprej v sredini kultiviranega delca), ravnanje s tkivom takoj po izolaciji iz organizma ter sestava kultivacijskega medija (tkivo ozkega črevesa se uspešneje kultivira v medijih z več glukoze in z dodatki antibiotikov zaradi prisotnosti bakterij v ozkem črevesu).

Poleg intestinalnih organskih in tkivnih kultur so se v nadaljevanju razvile še kulture epitelijskih celic ozkega črevesa. Leta 1976 je Hudson prvi opisal nekatere direktne citotoksične efekte gliadina na humanih celičnih linijah (kulture humanih intestinalnih celic, celic pljuč in ledvic ter Hep-2 celic) (44). Za tem so nato še nastale dolgoživeče črevesne epitelne celične linije – tako netransformirane (IEC-6,...) kot transformirane (Caco-2, HT29,...). Od teh se največ uporabljajo Caco-2 celice. Le-te se, ko dosežejo konflueno, spontano diferencirajo in odražajo lastnosti diferenciranih enterocitov. Caco-2 celična linija je izpeljana iz humanega adenokarcinoma kolona in ima izredno morfološko in biokemijsko podobnost z epitelijem ozkega črevesa. Kljub temu se v nekaterih pogledih od njega razlikuje – predvsem v tem, da so Caco-2 celice maligno transformirane. Ker je za in vitro študije patoloških stanj pri vnetnih črevesnih boleznih potreben celični model, ki kar se da popolno ponazarja fiziološke pogoje, obstaja vprašanje, ali je Caco-2 celični model primeren za ponazarjanje in vivo razmer (37, 38, 39, 40,41).

Kljub številnim intestinalnim celičnim linijam je še vedno pomanjkanje primernih in vitro modelov, kjer bi bile prisotne popolnoma diferencirane in normalne (netransformirane) epiteljske celice (42). V celičnih linijah diferenciacija ponavadi ni popolna, zato so lahko te celice brez določenih specifičnih funkcij oz. lastnosti. Popolno diferencirane in normalne enterocite lahko vzdržujemo in vitro le v primarnih kulturah. Le-te so pomembne za številne študije, kamor spadajo tudi raziskave na področju etiopatogeneze celiakije in drugih črevesnih bolezni. Primarne kulture epiteljskih celic ozkega črevesa so tudi primernejše za proučevanje toksičnosti glutenskih peptidov, saj so zaradi spremenjenih lastnosti nekatere celične linije bolj občutljive na gluten (43). Za številne študije in vitro, so se tako razvile tudi metode pridobivanja in kultiviranja intestinalnih epiteljskih celic številnih živalskih vrst. Najpogosteje pa se za izolacijo celic uporabijo miši ali podgane, predvsem zaradi lažjega dostopa in velikega reprodukcijskega potenciala (53, 54, 55, 56).

V namene raziskav vnetnih bolezni širokega črevesa in raka so razviti tudi številni modeli za kultiviranje epiteljskih celic kolona. Epiteljske celice kolona podgan je v različnih pogojih kultiviranja uspelo različno dolgo kultivirati; od štiri dni do štiri mesece (59,60). Kultiviranje humanih epiteljskih celic kolona je omejeno na nekaj dni, zaradi majhnega števila celic pridobljenih iz biopta, večje število pa je možno pridobiti le z resekcijo kolona (57,58).



## 2. NAMEN DELA

Primarna kultura epitelijskih celic širokega črevesa (kolonocitov) predstavlja primeren model za testiranje učinkov glutenskih (gliadinskih) peptidov pri proučevanju dejavnikov tveganja, sprožilcev in poteka kroničnih vnetnih črevesnih bolezni. Različne sekvence aminokislin v glutenskih peptidih imajo lahko različne vplive na epitelijske celice ozkega in širokega črevesja.

Namen dela je proučevanje vpliva gliadinskega pentapeptida p39-43 (-PQQPY-) na kultivirane podganje kolonocite ter vpliva toksičnega peptida p31-43 (-LGQQQPFPPQQPY-) na kultivirane podganje in humane »zdrave« kolonocite in kolonocite bolnika s Crohnovo boleznijo.

Učinke peptidov v kulturah podganjih in humanih kolonocitov bomo spremljali preko števila celic, živosti in aktivnosti tkivne transglutaminaze ter aktivnosti dveh membranskih encimov – maltaze in saharaze.

Eksperimentalno delo bo zajemalo:

- 48-urno kultiviranje odmrznjenih predhodno izoliranih podganjih in humanih kolonocitov s proučevanimi peptidi in brez peptidov,
- štetje celic in spremljanje viabilnosti (z aparaturo Countess automated cell counter invitrogen – C10228) ob času 0 (začetek kultiviranja), po 24 urah in po 48 urah,
- merjenje aktivnosti tkivne transglutaminaze ter aktivnosti maltaze in saharaze po Dahlqvistovi metodi v celičnem lizatu (časi:0,24,48). Ker se aktivnosti izražajo na gram proteinov, bomo v lizatih merili tudi koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi.

Na osnovi rezultatov spremljanih parametrov bomo ocenili, ali imajo proučevani peptidi kakšen vpliv na kulture kolonocitov, ali so vplivi različnih peptidov različni in ali so vplivi na humane »zdrave« in »Crohnove« kolonocite različni.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1 Materiali

##### 3.1.1 Biološki vzorci

- ◆ ozko in široko črevo podgan
- ◆ biopti humanega ozkega in širokega črevesa

##### 3.1.2 Laboratorijski pribor

- ◆ polnilna pipeta (Midi Plus; Biohit, Helsinki, Finska)
- ◆ pipete: 0,5-10  $\mu$ L, 10-100  $\mu$ L, 100-1000  $\mu$ L (Eppendorf, Biohit, Helsinki, Finska)
- ◆ multikanalna pipeta – 8 nastavkov: 10-100  $\mu$ L (Eppendorf Research pro, Nemčija)
- ◆ plastični nastavki za pipete (Sarstedt, Nemčija)
- ◆ plastične epruvete z zamaškom: 1,5 mL in 2,0 mL (Sarstedt, Nemčija)
- ◆ centrifugirke: 15 mL (TPP 91015, Švica); 50 mL (CELLSTAR, Cat. No. 227261, greiner bio-one, Frickenhanseu, Nemčija)
- ◆ mikrotitrne ploščice s 6, 12, 24 in 96 vdolbinicami (TPP 92006, 92012, 92024 ter 92096, Trasadingen, Švica)
- ◆ plinski gorilnik
- ◆ stojala za epruvete in centrifugirke
- ◆ steklovina: čaše (100mL), merilne bučke (100 mL, 250 mL), merilne pipete (10 mL, 50 mL : CELSTAR 768180, GREINEWR BIO-ONE, Frickenhanseu, Nemčija)
- ◆ rokavice za enkratno uporabo ter papirnate brisače
- ◆ igle za brizge (FINE-JECT, 4710008040 HENKE SASS WOLF, Tuttlingen, Nemčija)
- ◆ 70 % etanol v pršilniku
- ◆ krioampule 1,2 mL (TPP 89012, Švica)

##### 3.1.3 Aparature

- ◆ inkubator (Heraeus, Nemčija)

- ◆ centrifuga (Tehtnica, Slovenija)
- ◆ centrifuga (neo Lab (Labor- Spezial produkte), Korea)
- ◆ laminarij (Variolab Waldner, Nemčija)
- ◆ mikrotitrski čitalec Safire<sup>2</sup> ( Tecan, Avstrija)
- ◆ mikrotitrski čitalec Sunrise (Tecan, Avstrija)
- ◆ vibracijsko mešalo Bio Vortex V1 (Biosan, Riga, Latvija)
- ◆ analitska tehtnica (Acculab-Atilon, Brooklyn, NY, ZDA)
- ◆ tehtnica (Tehtnica, Slovenija)
- ◆ pH meter (Seven Easy METTLER TOLEDO, Kitajska)
- ◆ aparat Countess automated cell counter (Invitrogen – C 10227, Koreja)
- ◆ Dewarjeva posoda s tekočim dušikom
- ◆ aparat za pripravo ultračiste vode (PURELAB classic UF, ELGA)
- ◆ vodna kopel (Sutjeska)
- ◆ digitalni fotoaparat (Olympus C-7070, Japonska)
- ◆ stresalnik Environmental Shaker – Incubator ES-20 (Biosan, Latvija)

### 3.2 Reagenti in kemikalije ter priprava delovnih reagentov

#### Priprava 250 ml KOMPLETIRANEG RPMI 1640

- ◆ 220 ml RPMI 1640 s HEPES-om (Sigma R5886, Nemčija) (37 °C )
- ◆ 25 ml FBS (Sigma, F4135, ZDA)
- ◆ 5 ml raztopine antibiotik/antimikotik; ki vsebuje 10000 U/ml penicilina, 10 mg/ml streptomocina in 25 µg/ml amfotericina B (Sigma A5955, Nemčija) + 0,25 mL, 4 mg/mL raztopine gentamicina (
  - ◆ 2,5 ml 200 mM raztopine L-glutamina (Sigma G7513, Nemčija)
  - ◆ 11 µL; 14,3 M 2-merkaptoetanol / 250 mL medija (Sigma M6250-100 mL, Francija)
  - ◆ 250 mg glukoze (Zorka-Šabac, Zagreb, Hrvaška)

Pripravljen kompletiran RPMI medij je potrebno hraniti v hladilniku.

#### Priprava fiziološke raztopine (0,9% NaCl)

- ◆ 9 g NaCl smo raztopili v 1L deionizirane vode.

Pred uporabo je pripravljeno fiziološko raztopino potrebno avtoklavirati.

## **Priprava raztopin A in B za zmrzovanje**

### Reagenti in kemikalije:

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

Raztopina A: 80% RPMI (V=2,4 mL), 20% FBS (V=600  $\mu$ L).

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

## **3.3 Metode**

### **3.3.1 Živalski model**

Podganje enterocite in kolonocite so izolirali iz 6 nesorodnih podgan (WISTAR) moškega spola, ki so bili stari 12 tednov oziroma 3 mesece, s povprečno težo 276,4 g. Podgane so bile vzrejene v naravnem ciklu svetloba/tema, na sobni temperaturi 22-23 °C in na 55±10 % vlagi ter hranjene »ad libitum«. Podgane so bile evtanazirane s vdihavanjem plina CO<sub>2</sub>. Neposredno po usmrtitvi jim je bilo odvzeta sluz, ozko črevo v celoti in široko črevo. Ta del eksperimenta je bil opravljen v Medicinskem eksperimentalnem centru (MEC) Inštituta za patologijo MF UL s strani usposobljenega osebja MEC. Evtanazija poskusnih živali za izvajanje znanstveno-raziskovalnega dela na tkivu predhodno usmrčenih poskusnih živali je bila odobrena s strani Veterinarske uprave RS dne 03. 02. 2009, pod številko 34401-72/2008/4 (31).

### **3.3.2 Statistična metoda za analizo rezultatov**

Za obdelavo rezultatov smo uporabili statistične funkcije programa Microsoft Office Excel 2003 in sicer dvostranski parni t-test (Paired Two Sample for Means) ob 5,0% tveganju.

### **3.3.3 Izolacija in shranjevanje humanih enterocitov in kolonocitov**

#### Postopek izolacije humanih enterocitov in kolonocitov

Humane biopte ozkega črevesa smo označevali po zaporednih biopsijah HT1, HT2,... itd. in širokega črevesa HD1, HD2,...itd..

(a) Takoj po biopsiji smo dali biopt v 1 mL kompletirani RPMI medij in na 37 °C.

(b) Biopte v epicah smo nato v 30 minutah prenesli v celični laboratorij. Potrebno je tehtanje bioptov, in sicer smo že predhodno pripravili epice z 1mL medija in le-to posebej stehali. Potem pa smo dobljene biopte s pinceto, ki smo jo preje prežarili nad plamenom, prenesli v že stehane epice in to še enkrat vse skupaj stehali. Masi smo nato med seboj odšteli in tako dobili dejansko samo težo naših bioptov. Pri prenosu bioptov iz ene epice v drugo je potrebno spiranje biopta. Epice z bioptom in 1 mL medija (tiste v katerih smo prinesli biopt v laboratorij) spiramo tako ,da večkrat po nekaj sekund epice obračamo in mešamo na mešalniku. Medij smo nato previdno odpipetirali in zavrgli. Celoten postopek spiranja smo ponovili dvakrat.

(c) Po spiranju damo na izpran biopt 1mL kolagenaze XI (15 mg kolagenaze XI na 10 mL Hanksove raztopine brez Ab/Am, prehodno segrete na 37 °C). Raztopino kolagenaze XI se pripravlja sproti.

(d) Potrem je sledilo inkubiranje bioptov 30-60 minut na 37 °C, vmes smo malo vsebine v epicah premešali, vsaj vsakih 5 minut. Epice smo premešali na mešalniku. Ta del je pomemben zaradi tega, da se iz tkiva »izlužijo« celice. Da je prišlo do tega pojava , se vidi po motnem mediju.

(e) Ko smo opazili, da je medij postal po določenem času moten, smo ga odpipetirali v centrifugirke (falkonke) in dodali 2 mL svežega kompletiranega RPMI medija. V motnem supernatantu so prisotne celice, tkivo ter koagulaza XI, ki jo je potrebno ločiti, sicer povzroči razgradnjo celic. Po centrifugiranju se celice in tkivo usedejo na dno centrifugirke, koagulaza XI pa ostane v supernatantu.

(f) Centrifugirko skupaj s motnim supernatantom in medijem smo dali centrifugirati 5 minuti pri 1200 vrt./min.

(g) Bister supernatant smo odlili in zavrgli, sediment (peletko) pa smo resuspendirali v 2 mL svežega komp. RPMI medija in centrifugirali 5 minuti pri 1200 vrt./min. Peletko je potrebno dobro resuspendirati.

(h) Postopek opisan pod točko (g) smo še enkrat ponovili, se pravi da smo celice skupaj 2 x spirali v kompletiranem RPMI mediju !!!

(i) Po zadnjem spiranju smo medij odstranili in peletko obdelali po postopku za zmrzovanje.

## **Shranjevanje humanih enterocitov in kolonocitov**

### **Postopek zamrzovanja celic**

Celoten postopek zamrzovanja celic izvajamo na ledu. Celično kulturo smo prenesli v centrifugirko in centrifugirali 10 minut pri 1200 vrt/min. Supernatant smo odlili, sedimentu celic pa dodali 0,5 mL raztopine A. Vsebinsko smo premešali, prenesli v krioampulo in dodali še 0,5 mL raztopine B, v katero je bil dodan DMSO, ki prepreči negativne posledice zamrzovanja celic.

### **Postopek odmrzovanja celic**

- 1) Krioampule smo vzeli iz tekočega dušika in v vsako dodali 1,0 mL svežega kompletiranega RPMI medija (segretega na 37°C).
- 2) Ob rahlem stresanju smo inkubirali krioampule na 37°C, da se je njihova vsebina stalila.
- 3) Ko so bile celične kulture odtaljene, smo jih iz krioampul hitro (zaradi prisotnosti citotoksičnega DMSO) prenesli v centrifugirke. Krioampule smo sprali še z 1,0 mL svežega kompletiranega RPMI medija (segretega na 37°C), da smo kvantitativno prenesli celično kulturo in v centrifugirko dodali še 8,0 mL svežega kompletiranega RPMI medija (segretega na 37°C), da smo razredčili citotoksični DMSO.
- 4) Centrifugirke smo centrifugirali 5 min. pri 1200 obratih/min.
- 5) Odlili in zavrgli smo supernatant. Sediment celic pa smo ponovno centrifugirali 5 min. pri 1200 obratih/min. (sediment celic je bil slabo vidn)
- 6) Supernatant smo poskušali čim bolj odstraniti in nato sedimentu celic dodali 0,6 mL svežega kompletiranega RPMI medija (segret na 37°C), ga resuspendirali in homogeno suspenzijo prenesli na mikrotitersko ploščico. Celično kulturo smo razdelili po 0,3 mL v dve vdolbinice (na mikrotiterski ploščici).
- 7) Pri humanih in podganjih vzorcih iz drugega sklopa preiskav je postopek odmrzovanja celic od točke 1) pa do 5) enak.
- 8) Pri humanih vzorcih smo sedimentu celic dodali 0,7 mL svežega kompletiranega RPMI medija (segret na 37°C), ga resuspendirali in homogeno suspenzijo prenesli na mikrotitersko ploščico. Celično kulturo smo razdelili po 0,35 mL v dve vdolbinice (na mikrotiterski ploščici).

Pri podganjih vzorcih pa smo sedimentu celic dodali 2,5 mL svežega kompletiranega RPMI medija (segret na 37°C), ga resuspendirali in homogeno suspenzijo prenesli na mikrotitersko

ploščico. Celično kulturo smo razdelili po 1,25 mL v dve vdolbinice (na mikrotiterski ploščici).

Podganji vzorci PD1-PD6 so bili izolirani in shranjeni že v predhodnih poiskusih (31, 32), za izvedbo poiskusov smo jih vzeli iz tekočega dušika in jih odmrznili.

### 3.3.4 Kultiviranje podganjih in humanih kolonocitov

Izolirane podganje in humane kolonocite smo kultivirali po modificirani metodi Lukač Bajalo in sod., ki je bila razvita za kultiviranje tkiva ozkega črevesa (25) in v predhodnih poskusih prilagojena za kultiviranje iz tkiva izoliranih enterocitov, kot tudi kolonocitov (30, 32).

Medij, ki smo ga uporabili za kultiviranje podganjih in humanih kolonocitov, je kompletiran RPMI 1640. Svež medij je rdeče barve, ko pa se izrabi (pH medija pade), se barva medija spremeni v čebulno oziroma rumenkasto. Taka sprememba je dober pokazatelj, kdaj je celicam potrebno zamenjati medij, narediti pasažo ali pa le dodati nekaj svežega medija. Za uspešno rast izoliranih enterocitov in kolonocitov je pomembna gostota celic v kulturi. Ta ne sme biti prevelika (več kot  $10^6$  celic/mL) in prav tako ne premajhna. Če je število celic preveliko, lahko dodamo nekaj svežega medija ali pa kulturo razdelimo v dve petrijevki in nato v vsako dodamo svež medij. Če pa je gostota celic premajhna, pa celice odcentrifugiramo, odlijemo medij in usedlino resuspendiramo v ustrezno manjšem volumnu medija, ter nasadimo kulturo v manjšo petrijevko.

#### Dodatek gliadinskega pentapeptida p39-43:

Po izolaciji podganjih kolonocitov smo celotno kulturo (0,6 mL) razdelili (po 0,3 mL kulture) v nove mikrotiterske ploščice s 6 vdolbinicami. Nato smo začeli celice inkubirati z gliadinskim pentapeptidom (P1) koncentracije 200  $\mu\text{g/mL}$ . Ta čas smo označili s  $t=0\text{h}$ . Del kulture (0,3 mL) pa smo kultivirali brez dodatka gliadinskega pentapeptida. Poizkus smo načrtovali z uporabo dveh različnih gliadinskih pentapeptidov v dveh različnih koncentracijah:  $c_1=200 \mu\text{g/mL}$  in  $c_2=100 \mu\text{g/mL}$ . Vendar smo imeli premalo vzorca za izvedbo načrtovanega.

#### Uporabili smo sintetični gliadinski pentapeptid:

- ♦ **pentapeptid (P1):** p39-43 ( $\text{H} - \text{PQQPY} - \text{OH} \cdot \text{HCl}$ ) (jpt-Innovative Peptide Solutions, Batch.No: 290409V-27, 10mg, Nemčija)

**Preglednica 1:** Shema kultiviranja podganjih kolonocitov na mikrotitrskih ploščicah.

kultura PD1 brez peptida <i>0h,24h,48h</i>	kultura PD2 brez peptida <i>0h,24h,48h</i>	kultura PD3 brez peptida <i>0h,24h,48h</i>
kultura PD1 s peptidom P1 <i>0h,24h,48h</i>	kultura PD2 s peptidom P1 <i>0h,24h,48h</i>	kultura PD3 s peptidom P1 <i>0h,24h,48h</i>

**Dodatek toksičnega peptida p31-43:**

Ker smo proučevali tudi vpliv toksičnega peptida (TP) na podganje in »zdrave« humane kolonocite ter kolonocite bolnika s Crohnovo boleznijo, smo po izolaciji (ta čas smo označili kot čas nič) 2,5 mL osnovne kulture (podganji vzorci) razdelili 2 x po 1,25 mL v nove mikrotitrne ploščice s 6 vdolbinicami. Podobno smo postopali tudi pri humanih vzorcih, in sicer smo 0,7mL osnovne kulture razdelili 2 x po 0,35 mL v nove mikrotitrne ploščice s 6 vdolbinicami. Nato smo dodali v en del osnovne kulture toksični peptida (TP), en del kulture smo kultivirali brez peptida. Te kulture smo nato spremljali tekom 48 urnega kultiviranja.

Uporabili smo toksični peptid:

- ◆ **toksični peptid (TP):** p31-43 (H-LGQQQPFPPQOPY-OH\*HCl) (jpt-Innovative Peptide Solutions, Batch.No: 081209Z-23, 30mg, Nemčija)

**Preglednica 2:** Shema kultiviranja podganjih kolonocitov na mikrotitrskih ploščicah.

kultura PD4 brez TP <i>0h,24h,48h</i>	kultura PD5 brez TP <i>0h,24h,48h</i>	kultura PD6 brez TP <i>0h,24h,48h</i>
kultura PD4 s TP <i>0h,24h,48h</i>	kultura PD5 s TP <i>0h,24h,48h</i>	kultura PD6 s TP <i>0h,24h,48h</i>



**Preglednica 3:** Shema kultiviranja humanih »zdravih« kolonocitov in kolonocitov bolnika s Crohnovo boleznijo (kultura 4) na mikrotitrskih ploščicah.

kultura HD6 brez TP <i>0h,,48h</i>	kultura HD17 brez TP <i>0h,48h</i>	kultura HD20 brez TP <i>0h,48h</i>	kultura HD9 brez TP <i>0h,48h</i>
kultura HD6 s TP <i>0h,48h</i>	kultura HD17 s TP <i>0h,48h</i>	kultura HD20 s TP <i>0h,48h</i>	kultura HD9 s TP <i>0h,48h</i>

### 3.3.5 Štetje celic in spremljanje živosti

Število celic in njihovo živost smo določali z avtomatskim števcem celic - napravo Countess automated cell counter invitrogen – C10228.

Metoda temelji na standardni tehniki barvanja s tripanskim modrilom. Aparat vsebuje majhen mikroskop, digitalno kamero in računalnik, ki omogoča hitro štetje in določanje viabilnosti celic, prav tako pa uporabnik lahko vidi sliko svojega vzorca. Med sabo so primerjali pretočni citometer in napravo Countess. Ugotovili so, da pri obeh dobimo zanesljive in ponovljive rezultate meritev. Vendar je Countess cenejši, priprava vzorca je enostavnejša, ni potrebnih kontrolnih vzorcev za interpretacijo, hitro dobimo želene podatke,...

Countess je najsodobnejša avtomatska naprava, ki omogoča optično in slikovno analizo. Z njim lahko s standardno tehniko barvanja s tripanskim modrilom natančno in točno določimo število živih, mrtvih in vseh celic. Z uporabo enake količine vzorca kot pri hemocitometru, lahko v manj kot eni minuti določimo število različnih evkariontskih celic na podlagi podatkov o njihovi velikosti.

Preiskovan vzorec naneseemo v enega izmed dveh zaprtih prostorov na ploščici za enkratno uporabo. Aparat šteje celice v osrednjem mestu nanešenega vzorca. Volumen, v katerem so preštete celice je enak 0,4μl, kar je enako štirim kvadratkom s površino 1mm<sup>2</sup> kot pri standardnem hemocitometru.

Aparat nam za vsak vzorec da naslednje podatke:

- ◆ število živih in mrtvih celic/ml
- ◆ skupno število celic/ml

- ◆ živost ( % živih celic glede na skupno število vseh celic)
- ◆ povprečni premer
- ◆ sliko celic
- ◆ grafični prikaz podatkov

#### Najpomembnejše značilnosti naprave Countess so:

- ◆ Uporabniku prijazen; preprosto, hitro, avtomatsko določanje živosti in števila celic v manj kot eni minuti
- ◆ Daje nam podatke o velikosti celic in združljiv z širokim območjem evariontski celic, brez potrebe po posebnih spremembah med velikimi in malimi celicami.
- ◆ Aparat meri število celic v območju med  $1 \cdot 10^4$  do  $1 \cdot 10^7$  celic/ml, velikost celic pa od  $5 \mu\text{m}$  do  $60 \mu\text{m}$ . Najbolj točne meritve pa so med koncentracijama  $1 \cdot 10^5$  celic/ml in  $4 \cdot 10^6$  celic/ml.
- ◆ Ker uporabljamo ploščice samo enkrat ni potrebno spirati prav tako ne more priti do navzkrižne kontaminacije med vzorci.
- ◆ Dobljene podatke lahko shranimo na USB ključ.
- ◆ Dobimo tudi celovit grafičen prikaz podatkov.

#### Reagenti in kemikalije:

- ◆ Trypan Blue stain 0,4 % (T10282, ZDA)

#### Postopek dela

1) Ko aparatus vklopimo se nam na ekranu pokaže zavihek Settings, ki nam omogoča:

- ◆ kalibracijo instrumenta (Calibration)
- ◆ namestiti nove pogoje meritve (Update)
- ◆ nastaviti čas in datum ( Date and Time)
- ◆ način štetja
- ◆ nastavitve naslednjih parametrov: občutljivost (nanaša se na kontrast predmeta iz ozadja; višje občutljivost nastavimo pri celicah, ki se ne barvajo dobro z tripanskim modrilom; občutljivost znižamo pri vzorcih, kjer imamo veliko ozadje), minimalna velikost celic (določa najmanjšo velikost celic, ki bo upoštevana pri meritvah), maksimalna velikost celic

(z njo določimo najvišjo velikost celic, ki jih bo aparat upošteval pri svojih meritvah), okrožnost (z njo določimo glede na okroglost celic, katere oblike so vključene pri meritvah; ta parameter spreminjamo predvsem pri nenavadnih oblikah celic)

- 2) 10 $\mu$ l vzorca dobro zmešamo s 10  $\mu$ l tripanskega modrila.
- 3) 10 $\mu$ l te mešanice naneseemo na ploščico (za enkratno uporabo) v prostor A ali B in jo vstavimo v režo na aparatu.
- 4) Z gumbom za zum uravnamo sliko tako, da imajo žive celice svetel center in temne robove, mrtve celice pa enotno modro barvo po vsej površini brez svetlega centra. V navodilih je napisano, da se pravilna slika uravna samo pred začetkom prve meritve, vendar pa je priporočljivo, da za vsaki novi vzorec uravnamo sliko (boljši rezultati).
- 5) S pritiskom na zavihek Count Celss nam aparat v približno 30 sekundah poda podatke o viabilnosti in številu celic. Podatke lahko shranimo na USB ključ s dotikom na funkcijo Save.
- 6) Če hočemo videti grafično predstavitev podatkov pritisnemo na gumb More Data.
- 7) Po končanih meritvah ploščico vzamemo iz reže in v prazen prostor A ali B naneseemo novo mešanico vzorca z tripanskim modrilom.
- 8) Ploščico spet vstavimo v režo, pritisnemo Next Sample in nato Count Cells.
- 9) Po končanem delu aparat izklopimo.

Po branju kataloga Countess Automated Cell Counter se nam je zdelo, da bo naše določanje viabilnosti in števila celic veliko lažje od predhodnega, kjer so te parametre določali s štetjem celic v Neubarjevi komorici pod mikroskopom. Tu je bila predvsem slabost da je vsak posameznik po svoje presojal, katere celice so žive in katere mrtve. Ta aparat izniči subjektivnost posameznika (33).

### **Spremljanje števila in živost celic pri podganjih epiteljskih celicah širokega črevesa:**

Živost in število celic pri podganjih epiteljski celic širokega črevesa smo spremljali ob času 0h, 24h ter 48h pri prvi in drugi seriji vzorcev. Pred meritvijo smo vedno počakali 1-2 min, da je tripansko modrilo prodrlo v celice, šele nato smo pritisnili Count cells. Medtem smo uravnali sliko. Velikost celic, ki jih je aparat vključil v svoje meritve, smo omejili na 5 $\mu$ m-30 $\mu$ m. Bakterije so namreč manjše od 5  $\mu$ m in na takšen način smo izključili možnost lažno povišanega števila celic na račun morebitno prisotnih bakterij.

### **Spremljanje živosti in števila celic pri humanih epitelijskih celic širokega črevesa:**

Pri vzorcih humanih epitelijskih celic širokega črevesa pa smo imeli težave zaradi zelo nizke gostote celic. Včasih je bila koncentracija celic celo pod mejo, kjer nam aparat še daje točne rezultate. Ugotovili smo, da so najbolj pravilni rezultati bili pri občutljivosti 4 oz. 5. Pred vsako meritvijo je bilo seveda potrebno uravnati pravilno sliko. Lahko tudi sami sproti preštujemo število živih in mrtvih celic ter iz tega izračunamo viabilnost. Kot rezultate živosti pri humanih celicah smo večinoma podajali naše izračune.

### **3.3.6 Merjenje aktivnosti tkivne transglutaminaze in aktivnosti maltaze in saharaze v celičnem lizatu**

Aktivnost tkivne transglutaminaze, kot aktivnost maltaze in saharaze smo merili ob času 0<sup>h</sup> (takoj po dodatku toksičnega peptida), po 24<sup>h</sup> in 48<sup>h</sup> v celičnem lizatu. Ker se aktivnost encimov izraža na g proteinov, je bilo potrebno v lizatih izmeriti tudi koncentracijo proteinov.

Delo je potekalo v treh korakih:

- ◆ priprava celičnega lizata,
- ◆ merjenje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi in
- ◆ merjenje aktivnosti tkivne transglutaminaze, aktivnost maltaze in saharaze

#### **Priprava celičnega lizata**

Reagenti in kemikalije:

- ◆ NaCl (Sigma S3014-1kg, ZDA)
- ◆ destilirana voda

Priprava delovnih reagentov:

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

#### **Postopek priprave celičnega lizata**

- 1) Vzorec v plastični epruveti z zamaškom (V=1,5 mL) smo malo premešali in centrifugirali 1-2 minut pri 2000 vrt/min.
- 2) 60 µL supernatanta smo odpipetirali (za morebitne kasnejše preiskave), sediment pa resuspendirali v 1 mL fiziološke raztopine in ponovno centrifugirali 1-2 minut pri 2000 vrt/min; ta korak smo še enkrat ponovili, da smo dobili bister, brezbarven supernatant,

- 3) supernatant smo previdno odlili, preostanek fiziološke raztopine nad sedimentom pa odpipetirali,
- 4) sedimentu (celicam) smo dodali 100  $\mu$ L destilirane vode in ga resuspendirali, nato pa smo vsebino v plastični epruveti z zamaškom ( $V=1,5$  mL) dali za 30 minut na  $-20^{\circ}\text{C}$  in nato za 5 minut na  $37^{\circ}\text{C}$ ; ta korak smo še enkrat ponovili.
- 5) Pri humanih vzorcih je postopek priprave celičnega lizata enak.
- 6) Pri podganjih vzorcih iz drugega sklopa preiskav pa smo postopali malo drugače, ker je bilo vzorca (celic) količinsko več, kot pri prvem sklopu preiskav. Temu smo prilagodili čas centrifugiranja (10 min.) in število vrtljajov na minuto (1200 vrt./min.) ter volumne fiziološke raztopine (10mL) in volumen destilirane vode (250  $\mu$ L).

Vsebine v plastičnih epruvetah z zamaškom ( $V=1,5$  mL) morajo biti jasno, ustrezno označene.

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

### **Merjenje aktivnosti tkivne transglutaminaze**

Tkivna transglutaminaza je od kalcija odvisen znotrajcelični encim, ki katalizira kovalentno križno povezavo med glutaminskim ostankom enega in lizinskim ostankom drugega proteina. Test temelji na katalitični aktivnosti transglutaminaze pri tvorbi kovalentne vezi med prosto amsko skupino kadaverina (ta je kovalentno vezan na površino mikrotitrne ploščice, ki je priložena setu) in  $\gamma$ -karboksamidno skupino biotin-TVQQEL-OH substrata, ki pa se nahaja v reakcijskem pufu. Pri reakciji pride do vezave biotina na površino mikrotitrne ploščice. Nevezani biotin odstranimo tako, da vdolbinice na ploščici 3x speremo z ultračisto vodo. Količina vezanega biotina je proporcionalna količini aktivne transglutaminaze v vzorcu. V naslednjem koraku določimo količino vezanega biotina z uporabo konjugata streptavidin – peroksidaza in TMB substrata. Streptavidin ima veliko afiniteto do biotina in zato z biotinom tvori zelo močno nekovalentno vez. Odvečni (nevezani) streptavidin odstranimo tako, da vdolbinice na ploščici največ trikrat speremo s fosfatnim pufom (PBS-T). Količino vezanega streptavidina določimo tako, da dodamo TMB, ki je substrat za peroksidazo. Pri reakciji nastaja modro obarvan produkt (oksidiran TMB), po 1-3 minutah pa razvoj barve prekinemo tako, da dodamo raztopino za prekinitev reakcije. Raztopina postane rumene barve in ji pomerimo absorbanco pri 450 nm. Izmerjena absorbanca je proporcionalna količini vezanega biotina in s tem tudi količini aktivne transglutaminaze v vzorcu (27).

Reagenti in kemikalije:

- ◆ Transglutaminase Assay Kit (Sigma CS1070, ZDA):
  - reakcijski pufer (Sigma A5731, ZDA)
  - mikrotitrne ploščice prekrite s kadaverinom – 96 vdolbinic (Sigma C5618, ZDA)
  - DTT, 1M (Sigma D7059, ZDA)
  - transglutaminaza, 1 U/vialo (Sigma T5398, ZDA)
  - 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) tekoči substrat (Sigma T8665, ZDA)
  - raztopina za prekinitve reakcije (Sigma S6697, ZDA)
  - streptavidin – peroksidaza iz *Streptomyces avidinii* (Sigma S5512, ZDA)
    - ◆ ultračista voda oziroma deionizirana voda
    - ◆ PBS = fosfatni pufer z 0,005 % TWEEN 20 (Sigma P3563, ZDA)
    - ◆ EDTA 0,5M (Sigma E7889, ZDA)

Priprava delovnih reagentov:

- ◆ osnovna raztopina transglutaminaze:

Pripravimo raztopino, ki je 10 mM DTT in 1 mM EDTA (5  $\mu$ L 1M DTT + 1  $\mu$ L 0,5 M EDTA + 494  $\mu$ L ultračiste vode). V 0,5 mL pripravljene raztopine smo raztopili vsebino ene vialo transglutaminaze. Encim je v raztopini stabilen 2 tedna, če ga shranjujemo pri 2-8°C. Osnovno raztopino transglutaminaze se ne sme alikvotirati in zamrzniti.

- ◆ osnovna raztopina streptavidin – peroksidaza:

Vsebinsko ene vialo Streptavidin – peroksidaza smo raztopili v 100  $\mu$ L ultračiste vode. Raztopino lahko alikvotiramo in zamrznemo pri -20°C. Zamrznjena raztopina je stabilna 1 leto. Izogibamo se večkratnemu odmrzovanju in zamrzovanju.

- ◆ raztopina za pozitivno kontrolo:

Raztopino si pripravimo šele tik pred izvedbo testa. 1  $\mu$ L osnovne raztopine transglutaminaze smo raztopili v 1 mL ultračiste vode. Končna koncentracija encima je 2 mU/mL.

- ◆ reakcijska mešanica:

Raztopino si pripravimo šele tik pred izvedbo testa. Za en vzorec smo zmešali 10  $\mu$ L reakcijskega pufera, 1  $\mu$ L 1M DTT in dodali 40  $\mu$ L ultračiste vode. Za več vzorcev si moramo preračunati kolikšen volumen reakcijske mešanice potrebujemo.

**Postopek dela**

1. ploščico s kadaverinom smo vzeli iz vrečke in pustili, da se je segrela na sobno T (vzamemo toliko stripov kot jih bomo potrebovali, neporabljene stripe pa hranimo pri  $-20^{\circ}\text{C}$  v dobro zaprti vrečki skupaj z razvlaževalcem),
2. v vdolbinico za slepi vzorec smo dodali 25  $\mu\text{L}$  vode,
3. v vdolbinico za pozitivno kontrolo smo dodali 25  $\mu\text{L}$  raztopine pozitivne kontrole,
4. v testno vdolbinico pa smo dodali 1-50  $\mu\text{L}$  vzorca (ta naj vsebuje 1-10  $\mu\text{g}$  proteinov) in z vodo dopolnimo vdolbinico do 50  $\mu\text{L}$ ,
5. v vsako vdolbinico smo dodali 25  $\mu\text{L}$  reakcijske mešanice. Premešali smo tako, da smo s prsti rahlo potolkli po ploščici. Inkubacija je potekala 1-2 uri na ledu ali pa 15-30 minut na sobni temperaturi,
6. med inkubacijo smo si pripravili konjugat streptavidin – peroksidaza. Za en vzorec smo zmešali 0,1  $\mu\text{L}$  osnovne raztopine streptavidin – peroksidaza in 100  $\mu\text{L}$  PBS-T. Za več vzorcev si moramo preračunati kolikšen volumen konjugata streptavidin – peroksidaza potrebujemo,
7. vse vdolbinice smo 3x sprali z ultračisto vodo,
8. v vsako vdolbinico smo dodali 100  $\mu\text{L}$  konjugata streptavidin – peroksidaza (korak 6) in inkubirali 20 minut pri sobni T,
9. vsako vdolbinico smo sprali (ne inkubiramo!) z 200  $\mu\text{L}$  PBS-T največ 3x,
10. v vsako vdolbinico smo dodali 200  $\mu\text{L}$  TMB tekočega substrata in inkubirali 1-3 minute pri sobni T,
11. razvoj barve smo prekinili tako, da smo v vsako vdolbinico dodali 100  $\mu\text{L}$  raztopine za prekinitev reakcije (Stop Solution),
12. absorbanco smo izmerili pri 450 nm.

Postopek dela in nanašanja na mikrotitrsko ploščo nam prikazuje preglednica 4, končni izračun aktivnosti transglutaminaze pa nam podaja enačba 1.

**Preglednica 4:** Reakcijska shema za merjenje aktivnosti transglutaminaze. (podgANJI vzorci iz prvega in drugega sklopa preiskav ter humani vzorci)

	encim	ultračista voda	reakcijska mešanica
reagenčna slepa	/	25 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$
vzorec	x $\mu\text{L}$	25 – x $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$
pozitivna kontrola	25 $\mu\text{L}$ raztopine pozitivne kontrole	/	25 $\mu\text{L}$

**Enačba 1:** Izračun specifične aktivnosti transglutaminaze v vzorcu.

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

$A_{vz}$  = absorbanca vzorca

$A_{sl}$  = absorbanca reagenčne slepe

$A_{pk}$  = absorbanca pozitivne kontrole

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

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

Aktivnosti t-TG so izražene kot specifične aktivnosti IU/g proteina, kjer je IU katalitična aktivnost encima t-TG, ki v 1 minuti razgradi 1  $\mu$ mol substrata pri standardnih pogojih (37°C, pH 6,0 in pri 0,1M koncentraciji substrata).

### Merjenje aktivnosti maltaze in saharaze

Disaharidaze hidrolizirajo disaharide v dva monosaharida, od katerih je vsaj eden glukoza. Tako maltaza hidrolizira maltozo v dve molekuli glukoze, medtem ko saharaza hidrolizira saharozo v glukozo in fruktozo (reakcija 1 in 2).

1. maltoza  $\xrightarrow{\text{maltaza}}$  glukoza + glukoza
2. saharoza  $\xrightarrow{\text{saharaza}}$  glukoza + fruktoza

Specifično aktivnost maltaze in saharaze v celičnem lizatu smo določali po Dahlqvistovi metodi (28) na osnovi hitrosti nastajanja produkta – glukoze iz dodanega specifičnega substrata (maltoze oz. saharoze). Po določenem času smo ustavili delovanje encima s Tris-HCl pufrom, ki ga je v našem primeru vseboval TGO reagent (Tris Glukoza-Oksidazni reagent). V nadaljevanju smo določili količino sproščene glukoze z glukoza-oksidadno metodo, ki poteče v dveh stopnjah. V prvi stopnji (reakcija 1) encim glukozaoksidaza oksidira glukozo v glukonsko kislino, pri čemer nastane tudi vodikov peroksid, le-ta pa sodeluje v naslednji stopnji (reakcija 2), kjer se s pomočjo peroksidaze in ustreznega reagenta tvori obarvan produkt.

1. glukoza + O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O  $\xrightarrow{\text{GOD}}$  glukonska kislina + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
2. 2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + fenol + 4-aminofenazon + fenol  $\xrightarrow{\text{POD}}$  kinonimin + 4 H<sub>2</sub>O



Obarvan produkt (kinonimin) smo določili spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri dveh valovnih dolžinah (620 nm in 450 nm). Vrednosti, ki jih je spektrofotometer izpisal, so bile že izračunane razlike med absorbancama obeh filtrov ( $A_{450} - A_{620}$ ).

#### 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, ZDA)
- ◆ Tris-baza (Sigma 93362, Nemčija)
- ◆ standardna raztopina glukoze (Glucose GOD/PAP, Randox GL2614, Velika Britanija)
- ◆ glukoza-oksidazni reagent (Glucose GOD/PAP, bio Me'rieux REF 61270, Francija):
  - fosfatni pufer (225 mmol/L, pH 6,6)
  - EDTA (5 mmol/L)
  - fenol (8,5 mmol/L)
  - 4-aminoantipirin (0,30 mmol/L)
  - glukoza-oksidaza ( $\geq 10000$  U/L)
  - peroksidaza ( $\geq 300$  U/L)
- ◆ deionizirana voda

#### Priprava delovnih reagentov:

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

1,16 g maleinske kisline smo raztopili v 15,3 mL 1M NaOH in dodali približno 50 mL vode, nato smo redčili do 100 mL in uravnali pH na 6,0.
- ◆ raztopina substrata (0,0056M):

(a) raztopina maltoze: 20,16 mg maltoze smo raztopili v 1 mL maleatnega pufera

(b) raztopina saharoze: 19,15 mg saharoze smo raztopili v 1 mL maleatnega pufera
- ◆ standardna raztopina glukoze (0,556 mmol/L):

V setu je bil glukozni standard s koncentracijo 5,56 mmol/L oz. 1 mg/mL. Pripravili smo 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 smo raztopili v 110 mL 1M HCl in z destilirano vodo redčili na 250 mL, pH vrednost smo uravnali na 7,0.

- ◆ TGO reagent (Tris Glukoza-Oksidazni reagent):

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

### **Postopek dela**

Postopek dela in nanašanja na mikrotitrsko ploščo nam prikazuje preglednica 5 za humane vzorce in preglednica 6 za podganje vzorce iz drugega sklopa preiskav. Končni izračun specifične aktivnosti maltaze in saharaze pa nam podaja enačba 2.

**Preglednica 5:** Postopek dela za merjenje aktivnosti maltaze in saharaze v celičnem lizatu. (humani vzorci)

	<b>Reagenčna slepa</b>	<b>Standard</b>	<b>Slepa vzorca</b>	<b>Vzorec (maltaza)</b>	<b>Vzorec (saharaza)</b>
H <sub>2</sub> O (μL)	20	10	10	-	-
Vzorec (μL)	-	-	10	10	10
Ekvilibracija 10 minut na 37°C.					
Glukozni standard (μL)	-	10	-	-	-
Substrat (μL) (maltoza ali saharoza)	-	-	-	10 (maltoza)	10 (saharaza)
Previdno premešamo in inkubiramo točno 60 minut na 37°C.					
TGO reagent (μL)	100	100	100	100	100
Premešamo in inkubiramo 60 minut na 37°C. Izmerimo absorbanco vzorcev.					

V preglednici je kot primer prikazana le ena paralelka; eksperimentalno pa se test izvaja v treh paralelkah.

**Preglednica 6:** Postopek dela za merjenje aktivnosti maltaze in saharaze v celičnem lizatu. (podgANJI vzorci iz drugega sklopa preiskav)

	Reagenčna slepa	Standard	Slepa vzorca	Vzorec (maltaza)	Vzorec (saharaza)
H <sub>2</sub> O (μL)	30	10	10	-	-
Vzorec (μL)	-	-	20	20	20
Ekvilibracija 10 minut na 37°C.					
Glukozni standard (μL)	-	20	-	-	-
Substrat (μL) (maltoza ali saharoza)	-	-	-	10 (maltoza)	10 (saharaza)
Previdno premešamo in inkubiramo točno 60 minut na 37°C.					
TGO reagent (μL)	100	100	100	100	100
Premešamo in inkubiramo 60 minut na 37°C. Izmerimo absorbanco vzorcev.					

V preglednici je kot primer prikazana le ena paralelka; eksperimentalno pa se test izvaja v treh paralelkah.

**Enačba 2:** Izračun specifične aktivnosti maltaze oz. saharaze.

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

$A_{vz}$  = absorbanca vzorca

$A_{vz.sl}$  = absorbanca vzorčne slepe

$A_{st}$  = absorbanca standarda

$A_{sl}$  = absorbanca reagenčne slepe

d = redčitev homogenata (=1)

t = čas prve inkubacije v minutah (=60)

p = koncentracija proteinov v homogenatu (g/L)

M = molekulska masa glukoze (=180)

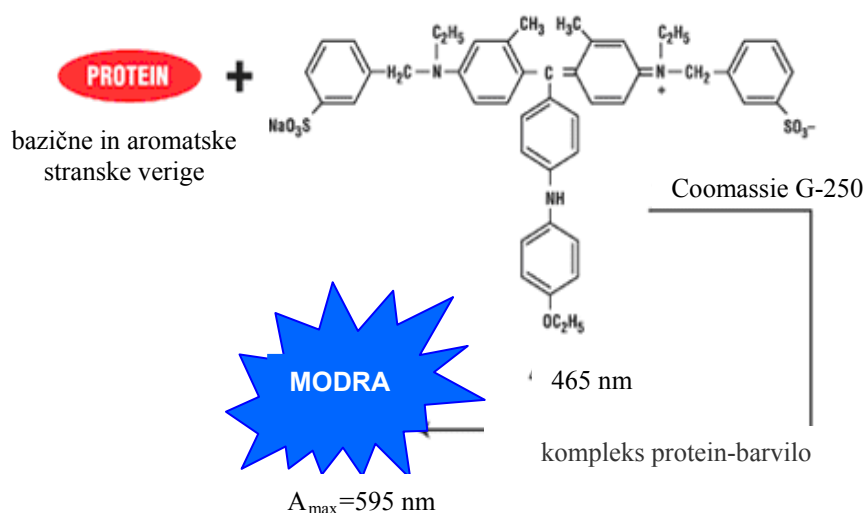
g = št. molekul glukoze, ki nastanejo pri hidrolizi substrata (pri maltazi 2, pri saharazi 1)

$10^5$  = faktor pretvorbe mg v g proteinov, mmol v μmol in razredčitev standarda

Aktivnosti maltaze in saharaze so izražene kot specifične aktivnosti IU/g proteina, kjer je IU katalitična aktivnost maltaze, ki v 1 minuti razgradi 1 μmol substrata pri danih pogojih (37°C, pH 6,0 in pri 0,1M koncentraciji substrata).

### Merjenje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi

Bradfordova metoda (26) temelji na spremembi barve barvila Coomassie Brilliant Blue G – 250 v kislem v odvisnosti od koncentracije proteinov. Barvilo nastopa v dveh barvnih odtenkih: v kislem je najbolj obstojen v protonirani rdeči obliki, ob vezavi na proteine pa preide v neprotonirano obliko in se barva reagenta spremeni v modro oziroma zeleno, odvisno od koncentracije proteinov. Ko se barvilo veže na proteine, to povzroči premik absorpcijskega maksimuma iz 465 nm na 595 nm. Intenzivnost obarvanosti raztopine po nastanku kompleksa oziroma absorpcija pri 595 nm je proporcionalna koncentraciji proteinov v vzorcu (Slika 6). Vezava barvila na proteine poteče zelo hitro (približno dve minuti), kompleks pa je obstojen približno eno uro.



**Slika 6:** Reakcijska shema določanja koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi.

#### Reagenti in kemikalije:

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

Priprava delovnih reagentov:

- ◆ raztopine standarda (humani albumin):

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

- ◆ barvni reagent:

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

Preglednica 7 nam prikazuje postopek dela in nanašanja na mikrotitrsko ploščo. Končni izračun koncentracije proteinov pa nam podaja enačba 3.

**Preglednica 7:** Postopek dela za merjenje koncentracije proteinov. (podganji vzorci iz prvega in drugega sklopa preiskav ter humani vzorci)

	reagenčna slepa		standard			vzorec	
št. luknje na plošči	1	2	3	4	5	6	7
0,9% NaCl (v $\mu\text{L}$ )	20	20	-	-		-	-
standard (v $\mu\text{L}$ )	-	-	20	20	20	-	-
vzorec (v $\mu\text{L}$ )	-	-	-	-		20	20
barvni reagent (v $\mu\text{L}$ )	100	100	100	100	100	100	100
Inkubiramo približno 2 minuti pri sobni T. Nato izmerimo absorbanco pri 595 nm.							

**Enačba 3:** Izračun koncentracije proteinov v vzorcu.

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

---

$A_{vz}$  = absorbanca vzorca

$A_{st}$  = absorbanca standarda

$A_{sl}$  = absorbanca reagenčne slepe

$C_{st}$  = koncentracija standarda

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Pri študijah, kjer potrebujemo biološki material, izoliran iz človeškega organizma, nam je leta največkrat nedostopen. Invazivni postopki izolacije biološkega materiala pri zdravih osebah so namreč v nasprotju z etičnimi načeli. Zato se namesto humanega modela uporablja živalski model, katerega prednosti sta lažja dostopnost in enostavnost samega postopka pridobivanja biološkega materiala. Za večino preiskav smo uporabili živalski model, nekaj preiskav pa smo naredili tudi na humanih vzorcih.

Podgane so primeren model za izolacijo enterocitov iz ozkega črevesa kot tudi kolonocitov iz širokega črevesa in kultiviranje v ustreznem mediju (RPMI). S tem nam je omogočeno, da lahko poskuse izvajamo in ponavljamo na istem vzorcu. Alikvote vzorca kulture lahko v vsakem trenutku shranimo v tekoči dušik in jih tako ohranimo za nadaljnja raziskovanja.

### ***4.1 Kultiviranje primarnih kultur podganjih in humanih epitelijskih celic širokega črevesa z gliadinskimi peptidi***

Epitelijske celice širokega črevesa podgan so bile že izolirane v predhodnih diplomskih nalogah in zamrznjene v tekočem dušiku. Za naše poizkuse smo jih odmrznili in kultivirali po postopkih opisanih pod Materiali in metode. Glede na zaporedje izolacije črevesa so pridobljene kulture označili po vrstnem redu in sicer PD1 za prvo podgano, PD2 za drugo in tako naprej do šeste. Izolirali so epitelijske celice širokega črevesa, kot tudi epitelijske celice ozkega. Preostanek vzorca kulture so nato shranili v tekoči dušik in jih ohranili za nadaljnja preiskave. Medtem ko pa smo humane epitelijske celice širokega in ozkega črevesa izolirali sami in jih prav tako shranili v tekoči dušik pred kultiviranjem oziroma pred predvidenimi raziskavami. Pridobljene kulture smo označili s veliko črko HD1, HD2,... in zraven pripisali številko biopta.

### ***4.2 Spremljanje vpliva gliadinskega pentapeptida p39-43 (P1) na podganje kolonocite***

#### **4.2.1 Vpliv gliadinskega pentapeptida na število in živost podganjih epitelijskih celic širokega črevesa**

Število in živost celic v kulturah smo merili ob času nič – takoj po dodatku pentapeptida P1 ter po 24 in 48 urah inkubiranja s peptidom. Merili smo na aparatu Countess automated cell

counter invitrogen – C 10228. Živost je v kulturah z dodanim pentapeptidom P1 večinoma padla tekom 48 urnega kultiviranja (Preglednica 8). Pri kulturi PD1 je bil opaziti minimalen padec živosti v primerjavi s kontrolo, kjer ni bilo dodanega peptida. V kulturi PD2 je bil trend padca živosti podoben kot pri kulturi PD1, le-da je bil tudi po 48 urah padec živosti manjši kot v kontroli brez pentapeptida. Pri kulturi PD3 pa je živost celic narastla, in sicer je bilo opaziti velik porast v primerjavi s kontrolo, kjer ni bilo dodanega peptida. Na dvig živosti v kulturi PD3 v času 48 urnem kultiviranju bi lahko vplivalo več dejavnikov, bodisi zajetje večjega števila delečih se celic ali pa kak drug dejavnik.

Če pregledamo vrednosti živosti v kontrolah, se je po 48 urah zmanjšala v povprečju za 58 %. V kulturah s pentapeptidom P1 pa se je zmanjšala za 55 %. Že po teh rezultatih bi lahko sklepali, da peptid P1 nima vpliva na živost celic, ker v obeh kulturah, s peptidom in brez njega, živost hitro pada. Po statistični obdelavi podatkov, smo ugotovili, da živost v kulturah s P1 v primerjavi s kontrolnimi kulturami ni bila statistično značilno različna ( $p > 0,05$ ). Iz teh rezultatov lahko zaključimo, da pentapeptid P1 nima vpliva na živost zdravih podganjih epiteljskih celic.

**Preglednica 8:** Živost podganjih epiteljskih celic širokega črevesa tokom 48 urnega kultiviranja s pentapeptidom P1 in brez peptida.

KULTURE	živost (%)	
	Brez peptida (kontrola)	P1
	t=0h	t=0h
PD1	60	43
PD2	59	43
PD3	60	56
$\bar{X} \pm SD$	<b>59,7±0,58</b>	<b>47,3±7,5</b>
	T=24h	t=24h
PD1	65	33
PD2	54	46
PD3	57	54
$\bar{X} \pm SD$	<b>58,7±5,7</b>	<b>44,3±10,6</b>
	T=48h	t=48h
PD1	64	59
PD2	58	43
PD3	53	63
$\bar{X} \pm SD$	<b>58,3 ± 5,5</b>	<b>55± 10,6</b>

Živost je definirana kot delež vseh živih celic na število vseh celic (živih in mrtvih celic).

## 4.2.2 Vpliv gliadinskega pentapeptida na aktivnost tkivne transglutaminaze podganjih kolonocitov

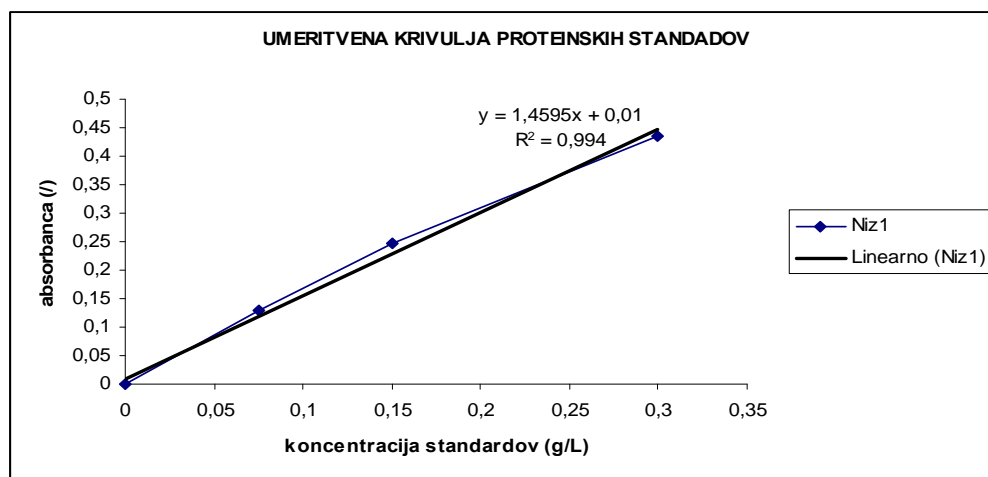
Že izolirane podganje kolonocite smo kultivirali s pentapeptidom p39-43 (P1) in ob tem spremljali, kako pentapeptid vpliva na aktivnost tkivne transglutaminaze v vzorcu.

Specifične aktivnosti tkivne transglutaminaze smo izražali v IU/g proteinov ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  proteinov), zato je bilo potrebno določiti tudi koncentracijo proteinov v vzorcu. Za določanje smo uporabili Bradfordovo metodo, koncentracije proteinov v vzorcu pa smo izračunali iz umeritvene premice (Preglednica 9, Graf 1).

**Preglednica 9:** Absorbance proteinskih standardov (humani albumin).

koncentracija standarda – humani albumin (g/L)	A
0	0
0,075	0,12925
0,15	0,24625
0,3	0,43675

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



Enačba dobljene umeritvene premice:  $A = 1,4595 * c + 0,01$  ( $R^2 = 0,9940$ )

Koncentracije proteinov in specifične aktivnosti t-TG v posameznih kulturah smo merili ob začetku kultiviranja z gliadinskim pentapeptidom ( $t=0\text{h}$ ), ter po času 24 in 48 ur ( $t=24\text{h}$ ,  $t=48\text{h}$ ). Izmerjene vrednosti specifične aktivnosti t-TG za vse tri kulture podganjih



kolonocitov med kultiviranjem s pentapeptidom P1 in brez peptida nam prikazuje Preglednica 10.

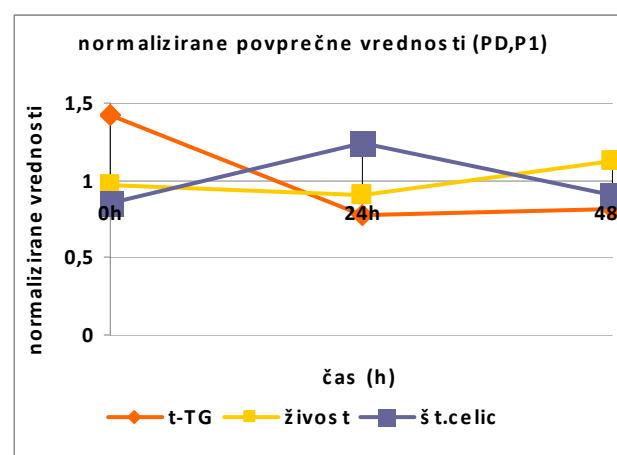
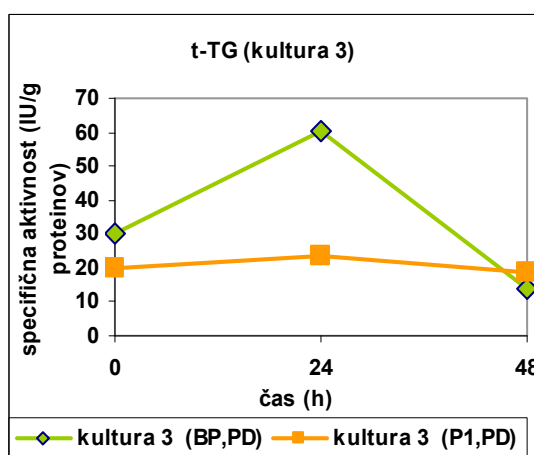
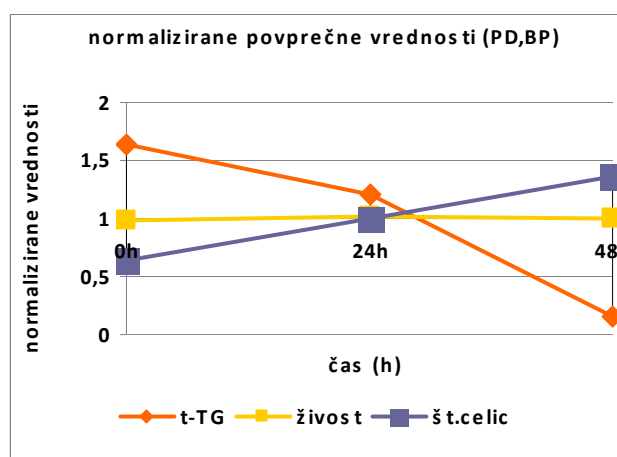
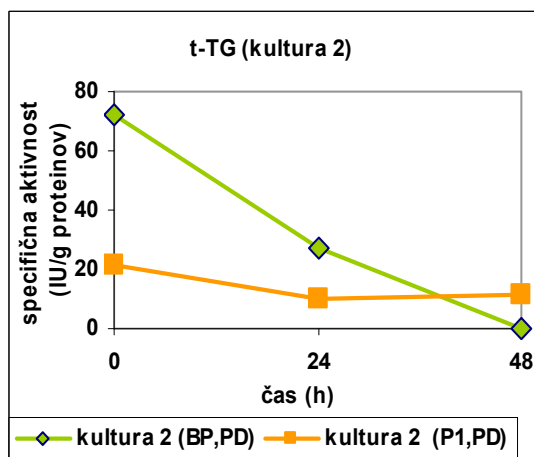
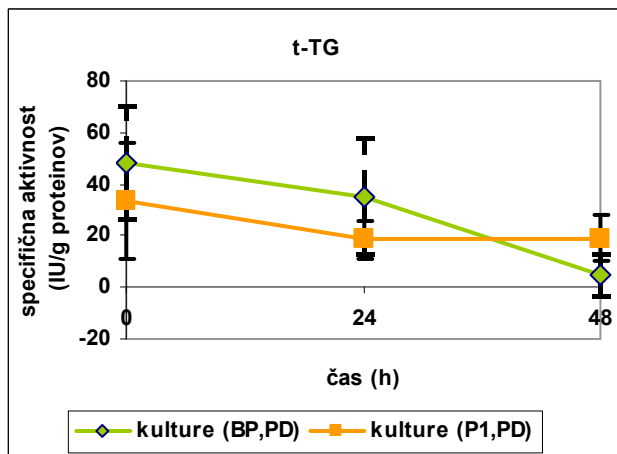
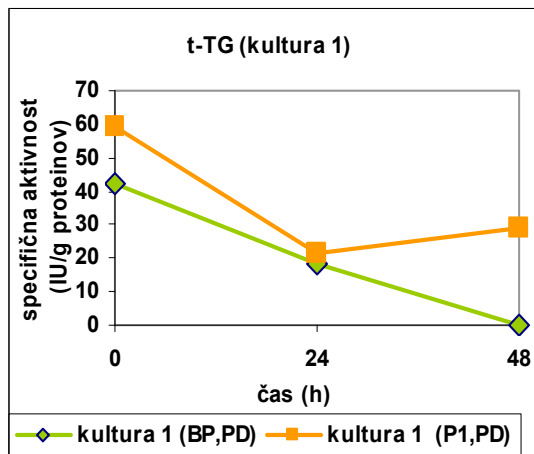
Spreminjanje aktivnosti t-TG v posameznih kulturah podganjih kolonocitov med kultiviranjem s peptidom P1 in brez njega je prikazano tudi grafično v Grafu 2.

Če rezultate spreminjanja aktivnosti t-TG v posameznih kulturah podganjih kolonocitov (PD1-PD3) združimo, dobimo povprečno spreminjanje aktivnosti t-TG med kultiviranjem s P1 in brez njega (Graf 3).

**Preglednica 10:** Specifične aktivnosti t-TG v kulturah podganjih kolonocitov med kultiviranjem brez peptida in s pentapeptidom P1 ob času  $t=0h$ ,  $t=24h$  in  $t=48h$ .

KULTURE	aktivnost t-TG (IU/g proteinov)	
	Brez peptida (kontrola)	P1
	T=0h	t=0h
PD1	42,14	59,57
PD2	72,02	21,43
PD3	29,99	19,77
$\bar{X} \pm SD$	<b>48,05 ± 21,63</b>	<b>33,59 ± 22,51</b>
	T=24h	t=24h
PD1	18,09	21,74
PD2	26,95	10,16
PD3	60,12	23,39
$\bar{X} \pm SD$	<b>35,05 ± 22,16</b>	<b>18,43 ± 7,21</b>
	T=48h	t=48h
PD1	0,00	29,04
PD2	0,00	11,64
PD3	13,93	18,72
$\bar{X} \pm SD$	<b>4,64 ± 8,04</b>	<b>19,08 ± 8,75</b>

**Graf 2:** Spreminjanje aktivnosti t-TG v posameznih kulturah podganih kolonocitov (kulture 1,2,3 so PD1, PD2, PD3) med kultiviranjem s P1 in brez peptida.



Iz grafov 2, je razvidno, da se izmerjene aktivnosti t-TG med posameznimi kulturami podganih kolonocitov razlikujejo, verjetno zaradi individualne biološke variabilnosti med posameznimi kulturami celic. Encimska aktivnost je ob času  $t=0h$  pri vseh treh kulturah s P1

maksimalna, po 24 urah aktivnost rahlo naraste (*kultura 3*) oziroma pade (*kultura 1 in 2*) in po 48 urah se zopet encimska aktivnost rahlo dvigne, razen pri kulturi 3, kje se je znižala. Pri kontrolah, kjer nismo dodali peptida; pa trend spreminjanja aktivnosti transglutaminaze ni v vseh kulturah enak. Po 24 urah encimska aktivnost t-TG v kulturi 1 in 2 pade, medtem ko pa se v *kultura 3* močno poveča, 2x večja v primerjavi s aktivnostjo pri času nič pri isti kulturi. Po 48 urah pa aktivnost t-TG v vseh kulturah brez peptida pade na minimalno vrednost. Razlike bi lahko pripisali različnemu številu zajetih celic, ki so nosilke t-TG.

Tak trend nam prav tako prikazuje graf povprečnih vrednosti spreminjanja aktivnosti t-TG med kultiviranjem s P1 (Graf 3). Tu ob času  $t=0h$  dobimo najvišjo vrednost encimske aktivnosti, (33,59 IU/g proteinov), nato je po času 24 ur vrednost približno še enkrat nižja kot pri času nič (18,43 IU/g proteinov) in po času 48 ur le nekoliko blago naraste (19,08 IU/g proteinov).

Podatke smo nato statistično obdelali (parni t-test). Ugotavljali smo, če encimska aktivnost v kulturah podganjih kolonocitov s peptidom v 24 oziroma 48 urah statistično značilno naraste ( $p<0,05$ ) oziroma, ali peptid značilno poveča encimsko aktivnost v primerjavi s kontrolo ( $p<0,05$ ). Po obdelavi podatkov smo po 24 urah dobili vrednost  $p=0,8587$  ter po 48 urah  $p=0,6869$ . Zato lahko rečemo, da je encimska aktivnost tako po 24 urah kot tudi po 48 urah kultiviranja ni statistično značilno narasla. Primerjali pa smo še encimsko aktivnost pri posameznih časih med kulturami z pentapeptidom, z kulturami brez peptida (kontrola) pri istem času kultiviranja. Ugotovili smo, da ni prišlo do statistično značilne razlike ( $p>0,05$ ), zato lahko sklepamo, da pentapeptid P1 nima vpliva na encimsko aktivnost t-TG.

Vpliv gliadinskega pentapeptida p39-43 (P1) smo želeli spremljati tudi preko aktivnosti dveh membranskih encimov podganjih kolonocitov (maltaze in saharaze), vendar smo imeli količinsko premalo vzorca, da bi lahko izvedli ta test.

### **4.3 Spremljanje vpliva toksičnega peptida p31-43 (TP) na podganje in »zdrave« humane kolonocite ter kolonocite bolnika s Crohnovo boleznijo**

Že izolirane podganje kolonocite ter po izolaciji »zdravih« humanih kolonocitov ter kolonocitov bolnika s Crohnovo boleznijo smo celice začeli kultivirati z toksičnim peptidom (TP) in ob tem prav tako, kot pri gliadinskem pentapeptidu, spremljali kako peptid vpliva na

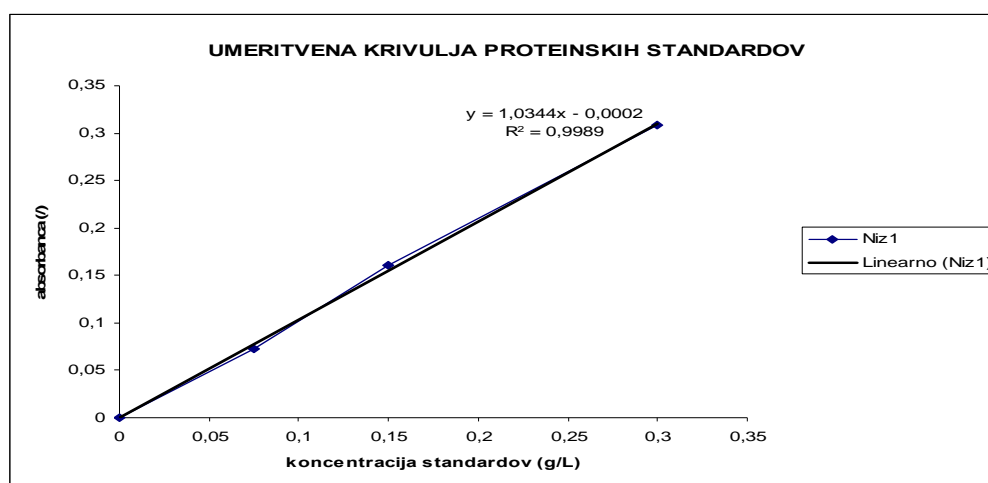
število in živost epitelijskih celic, na aktivnost tkivne transglutaminaze in na aktivnost maltaze in saharaze.

Specifične aktivnosti t-TG kot tudi aktivnost disaharidaz smo izražali v IU/g proteinov ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  proteinov), zato je bilo potrebno določiti tudi koncentracijo proteinov v vzorcu. Za določanje smo uporabili Bradfordovo metodo, koncentracije proteinov v vzorcu pa smo izračunali iz umeritvene premice (Preglednica 11, Graf 4).

**Preglednica 11:** Absorbance proteinskih standardov (humani albumin).

koncentracija standarda – humani albumin (g/L)	A
0	0
0,075	0,0730
0,15	0,1609
0,3	0,30815

**Graf 4:** Umeritvena premica iz proteinskih standardov (humani albumin).



Enačba dobljene umeritvene premice:  $A = 1,0344 * c - 0,0002$  ( $R^2 = 0,9989$ ).

#### 4.3.1 Vpliv toksičnega peptida p31-43 (TP) na podganje kolonocite

**Vpliv toksičnega peptida na število in živost podganih epitelijskih celic širokega črevesa**

Vpliv toksičnega peptida na število in živost podganih celic smo spremljali podobno kot pri gliadinskem pentapeptidu. Živost celic v kulturi smo merili ob času nič – takoj po dodatku peptida TP ter po 24 in 48 urah inkubiranja s peptidom na aparatu Countess automated cell

counter invitrogen – C 10228. Živost je v kulturah z dodanim peptidom TP večinoma padla tekom 48 urnega kultiviranja (Preglednica 12). Pri kulturi 1 je sicer viabilnost, živost celic narastla in sicer je bilo opaziti velik porast viabilnosti v primerjavi s kontrolo, kjer ni bilo dodanega peptida tekom celotnega kultiviranja. V kulturi 2 je bil padec živosti manjši kot v kontroli. Porast živosti je bilo sicer opaziti na začetku kultiviranja (Preglednica 12). V kulturi 3 je bil trend padca živosti podoben kot pri kulturi 2, le da je po 24 urah živost celic minimalno narasla v primerjavi s kontrolo. Če povzamemo; v kulturah brez peptida je v povprečju živost celic po 48 urah kultiviranja okoli 54 % (padec živosti je za 6,3%), v kulturah s peptidom pa je okoli 53 % (padec živosti za 10,3%). Če bi imel peptid kakršenkoli vpliv, bi bile razlike v živosti verjetno izrazitejše. Po statistični obdelavi podatkov, smo ugotovili, da živost v kulturah s TP v primerjavi s kontrolnimi kulturami ni bila statistično značilno različna ( $p > 0,05$ ). Iz teh rezultatov lahko zaključimo, da peptid TP nima vpliva na živost zdravih podganjih epitelijskih celic.

**Preglednica 12:** Živost podganjih epitelijskih celic tokom 48 urnega kultiviranja s peptidom TP in brez peptida.

KULTURE	Živost (%)	
	Brez peptida (kontrola)	P1
	t=0h	t=0h
PD4	67	75
PD5	46	60
PD6	67	54
$\bar{X} \pm SD$	<b>60±12,1</b>	<b>63±10,8</b>
	T=24h	t=24h
PD4	58	66
PD5	63	55
PD6	65	68
$\bar{X} \pm SD$	<b>62±3,6</b>	<b>63±7</b>
	T=48h	t=48h
PD4	49	66
PD5	59	44
PD6	53	48
$\bar{X} \pm SD$	<b>53,7 ± 5,0</b>	<b>52,7± 11,7</b>

Živost je definirana kot delež vseh živih celic na število vseh celic (živih in mrtvih celic).

### Vpliv toksičnega peptida na aktivnost tkivne transglutaminaze podganjih kolonocitov

Koncentracije proteinov in specifične aktivnosti tkivne transglutaminaze v posameznih kulturah podganjih celic širokega črevesa smo merili ob začetku kultiviranja z toksičnim peptidom (t=0h), ter po času 24 in 48 ur (t=24h, t=48h). Izmerjene vrednosti specifične aktivnosti t-TG za vse tri kulture podganjih kolonocitov med kultiviranjem s peptidom TP in brez nam prikazuje Preglednica 13.

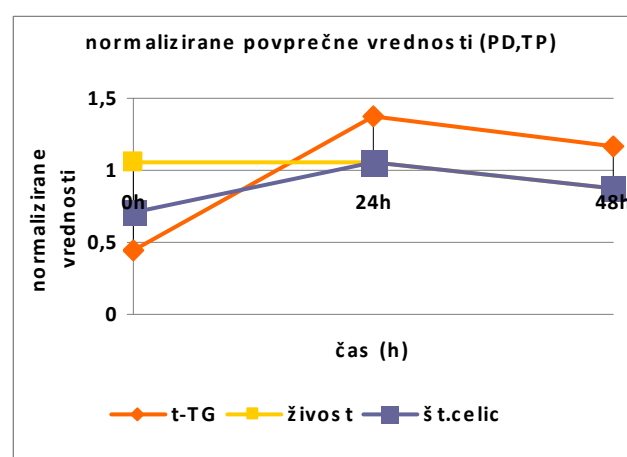
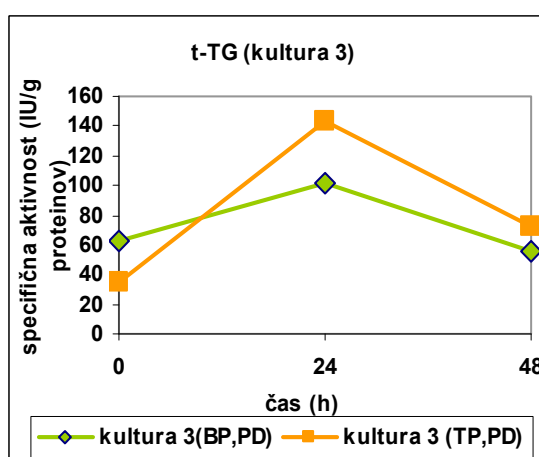
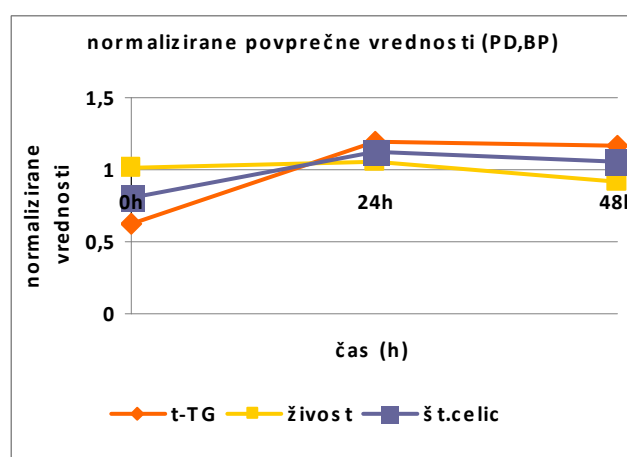
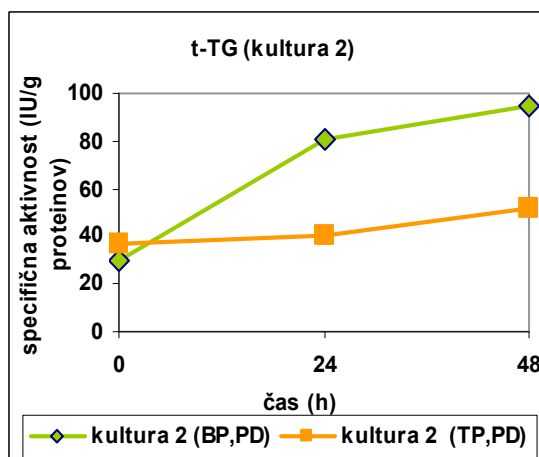
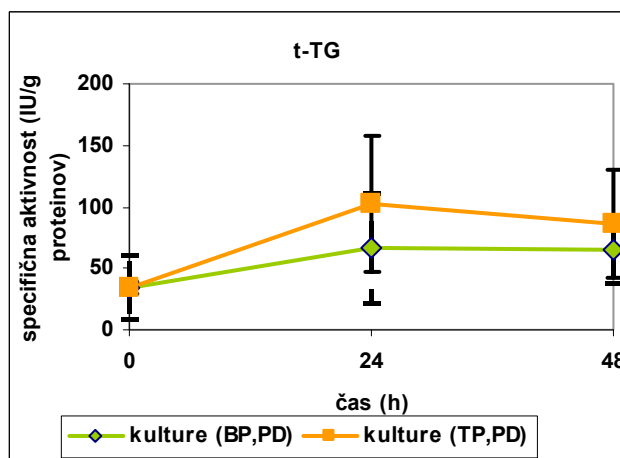
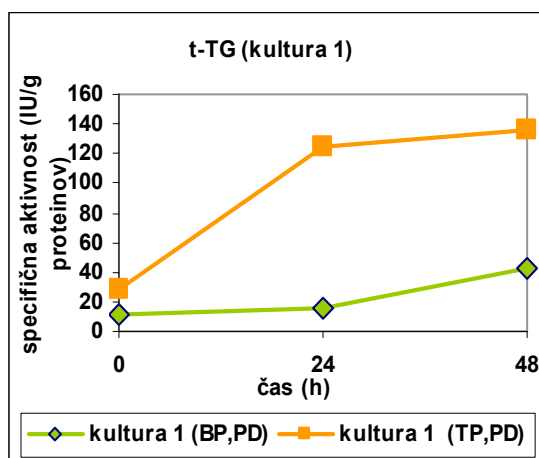
Spreminjanje aktivnosti t-TG v posameznih kulturah podganjih kolonocitov med kultiviranjem s peptidom TP in brez njega je prikazano grafično v Grafu 5.

Če rezultate spreminjanja aktivnosti tkivne transglutaminaze v posameznih kulturah podganjih kolonocitov (PD4-PD6) združimo, dobimo povprečno spreminjanje aktivnosti t-TG med kultiviranjem s peptidom TP in brez njega (Graf 6).

**Preglednica 13:** Specifične aktivnosti t-TG v kulturah podganjih kolonocitov med kultiviranjem brez peptida in s peptidom TP ob času t=0h, t=24h in t=48h.

KULTURE	aktivnost t-TG (IU/g proteinov)	
	brez peptida (kontrola)	TP
	t=0h	t=0h
PD4	11,08	28,13
PD5	30,18	36,99
PD6	62,52	35,31
$\bar{X} \pm SD$	<b>34,59 ± 26,00</b>	<b>33,70 ± 4,85</b>
	t=24h	t=24h
PD4	16,09	123,90
PD5	80,41	39,97
PD6	101,30	143,46
$\bar{X} \pm SD$	<b>65,93 ± 44,11</b>	<b>102,44 ± 54,98</b>
	t=48h	t=48h
PD4	43,14	135,57
PD5	94,72	51,94
PD6	55,01	72,33
$\bar{X} \pm SD$	<b>64,29 ± 27,01</b>	<b>86,61 ± 43,61</b>

**Graf 5:** Spreminjanje aktivnosti t-TG v posameznih kulturah podganjih kolonocitov (kulture 1,2,3 so PD4, PD5, PD6) med kultiviranjem s TP in brez peptida.



V Grafu 5 prikazujemo spreminjanje aktivnosti t-TG v posameznih kulturah (PD4-PD6) med kultiviranjem s TP. Na vsakem posameznem grafu pa je narisana še ustrezna, pripadajoča krivulja; ki prikazuje spremljanje aktivnosti t-TG med kultiviranjem brez peptida. Iz grafov

je razvidno, da se aktivnosti t-TG med posameznimi kulturami brez peptida prav tako razlikujejo, kot pri kultiviranju s gliadinskim peptidom. Verjetno zopet zaradi individualne biološke variabilnosti med posameznimi kulturami celic. Trend spreminjanja aktivnosti t-TG pri kulturah s TP je približno enak. Encimska aktivnost je ob času  $t=0h$  minimalna, po 24 urah aktivnost močno naraste (kultura 1 in 3), pri kulturi 2 je le rahlo narastla in po 48 urah dodatno delno naraste. Le pri kulturi 3 je aktivnost po 48 urah padla, vendar je še vedno višja od aktivnosti pri času nič.

Graf 6 prikazuje povprečne vrednosti t-TG ob času  $t=0h$  z minimalno encimsko aktivnostjo (33,70 IU/g proteinov), ki po 24 urah močno naraste (102,44 IU/g proteinov) in nato po 48 urah pade (86,61 IU/g proteinov).

Podatke smo nato statistično obdelali (parni t-test). Ugotavljali smo, če encimska aktivnost v kulturah s TP v 24 oziroma 48 urah statistično značilno naraste ( $p < 0,05$ ) oziroma ali peptid značilno vpliva na encimsko aktivnost v primerjavi s kontrolo ( $p < 0,05$ ). Po obdelavi podatkov smo po 24 urah dobili vrednost  $p = 0,2862$  ter po 48 urah  $p = 0,03095$ . Do statistično značilne razlike (zvišanja) je sicer prišlo po 48 urah, vendar je prišlo do zvišanja tudi v kulturi brez peptida in pri statistični obdelavi primerjave s kontrolnimi kulturami ni bilo statistično značilne razlike ( $p > 0,05$ ). Iz teh rezultatov lahko zaključimo, da peptid TP nima značilnega vpliva na aktivnost t-TG zdravih podganjih kolonocitov.

### **Vpliv toksičnega peptida na aktivnost maltaze in saharaze podganjih kolonocitov**

Specifične aktivnosti maltaze in saharaze v posameznih kulturah podganjih celic širokega črevesa so grafično prikazane (maltaza: Graf 7, saharaza: Graf 9). Predstavljeni sta dve krivulji na posameznem grafu, ena predstavlja spreminjanje aktivnosti v kulturah brez peptida (v kontrolah), druga pa v kulturah s dodatnim TP. Izmerjene vrednosti specifične aktivnosti maltaze za vse tri kulture podganjih kolonocitov med kultiviranjem s peptidom TP in brez so zbrane v Preglednici 14 ter Preglednici 15 za saharazo.

Če rezultate spreminjanja aktivnosti maltaze ali saharaze v posameznih kulturah podganjih kolonocitov (PD4-PD6) združimo, dobimo povprečno spreminjanje aktivnosti maltaze (Graf 8) ali saharaze (Graf 10) med kultiviranjem s peptidom TP in brez peptida.

**Preglednica 14:** Specifične aktivnosti maltaze v kulturah podganjih kolonocitov med kultiviranjem brez peptida in s TP ob času  $t=0h$ ,  $t=24h$  in  $t=48h$ .

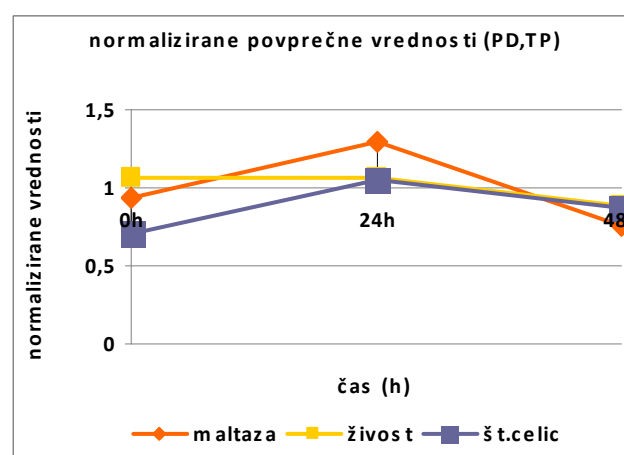
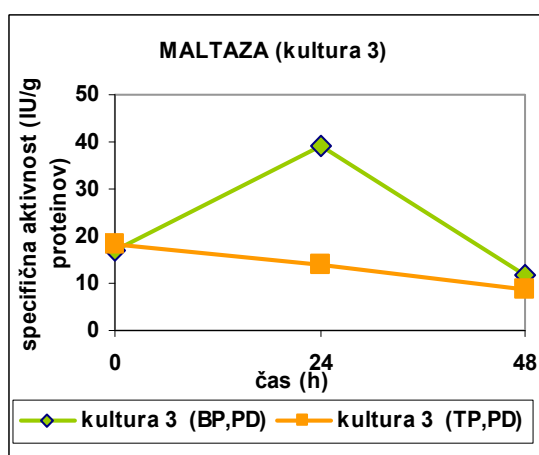
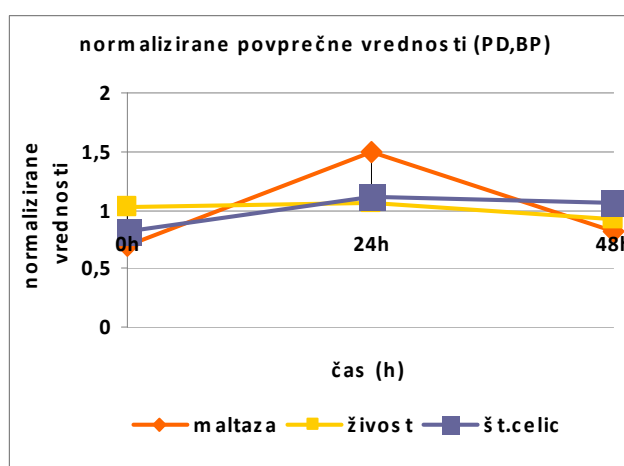
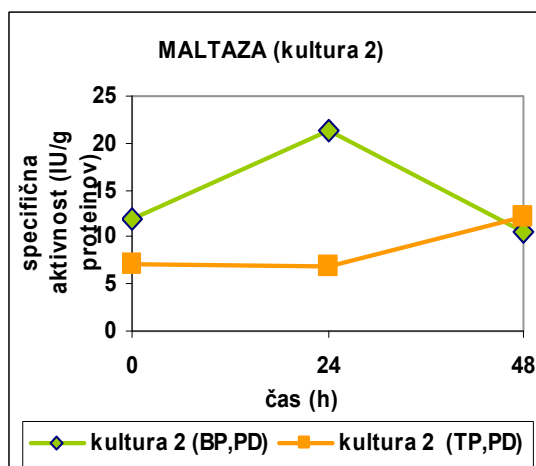
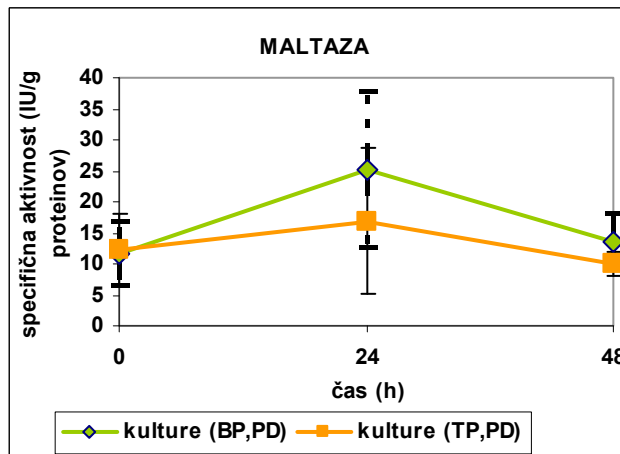
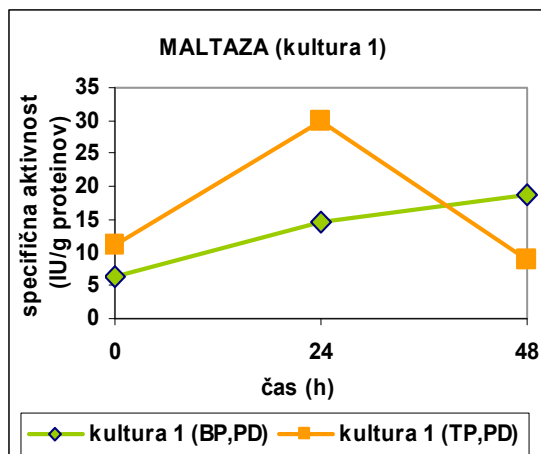


KULTURE	aktivnost maltaze (IU/g proteinov)	
	brez peptida (kontrola)	TP
	t=0h	t=0h
PD4	6,52	11,09
PD5	11,81	7,02
PD6	16,76	18,42
$\bar{X} \pm SD$	<b>11,70±5,12</b>	<b>12,18±5,78</b>
	t=24h	t=24h
PD4	14,67	29,87
PD5	21,38	6,82
PD6	39,03	13,94
$\bar{X} \pm SD$	<b>25,03±12,58</b>	<b>16,88±11,80</b>
	t=48h	t=48h
PD4	18,70	8,83
PD5	10,47	12,11
PD6	11,69	8,88
$\bar{X} \pm SD$	<b>13,62± 4,44</b>	<b>9,94±1,88</b>

V kulturi 3 (PD6) s TP je encimska aktivnost maltaze podganjih kolonocitov padala enakomerno, tudi v kulturi 2 (PD5) vidimo da je aktivnost enakomerno padla v 24 urah kultiviranja. Medtem ko je v kulturi 1 (PD4) prišlo do izrazitega zvišanja aktivnosti v 24 urah. V 48 urah inkubacije s peptidom TP pa se je specifična aktivnost maltaze v kultura podganjih kolonocitov zmanjšala v dveh kulturah 1 in 3. V kulturi 2 pa je aktivnost minimalno narastla. Različen potek aktivnosti oz. nihanje maltazne aktivnosti je mogoče razlagati tudi z določenimi endogenimi biološkimi ritmi. V kulturah, kjer nismo dodali peptida je trend spreminjanja encimske aktivnosti maltaze podoben. In sicer aktivnost po 24 urah močno naraste in nato po 48 urah pade, razen pri kulturi 1, kjer je aktivnost po 48 urah blago narastla.

Graf povprečnih vrednosti kaže, da je aktivnost v 48 urah inkubiranja s peptidom TP padla (Graf 8). Prav tako vidimo, da tudi v kulturah, kjer nismo dodali peptida, aktivnost v 48 urah pade. To smo potrdili tudi s parnim t-testom.

**Graf 7:** Spreminjanje aktivnosti maltaze v posameznih kulturah podganjih kolonocitov (kulture 1,2,3 so PD4, PD5, PD6) med kultiviranjem s TP in brez peptida.



Ugotavljali smo, če se encimska aktivnost v kulturah s toksičnim peptidom v 24 oziroma 48 urah statistično značilno spremeni ( $p < 0,05$ ). Po obdelavi podatkov smo po 24 urah dobili  $p = 0,3769$  in po 48 urah  $p = 0,5297$ . Zato lahko rečemo, da se encimska aktivnost po 24 urah, kot

tudi po 48 urah ni statistično značilno spremenila. Po statistični obdelavi podatkov pa smo ugotovili tudi to, da encimska aktivnost v kulturah s TP v primerjavi s kontrolnimi kulturami ni bila statistično značilna ( $p > 0,05$ ). Iz teh rezultatov lahko zaključimo, da peptid TP nima značilnega (toksičnega) vpliva na aktivnost maltaze zdravih podganjih kolonocitov.

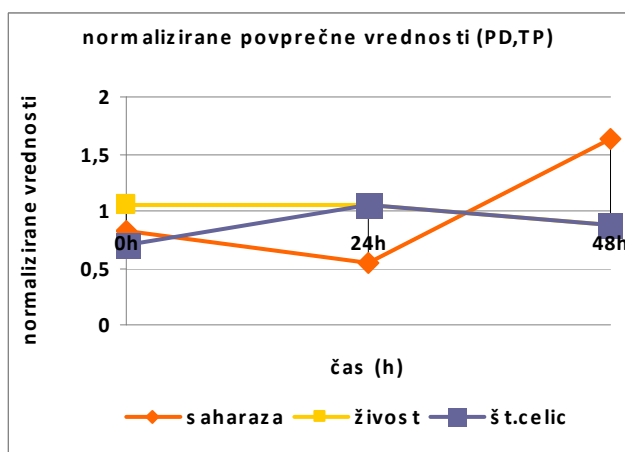
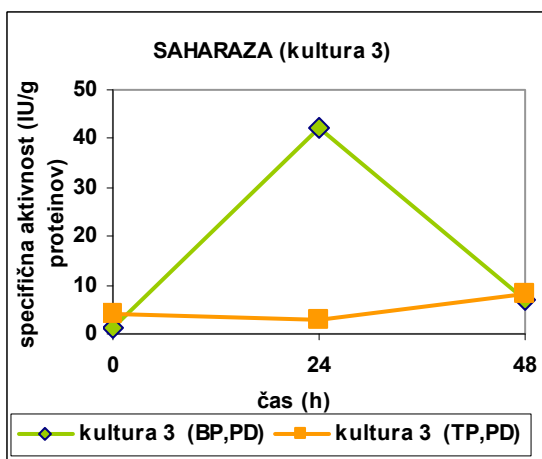
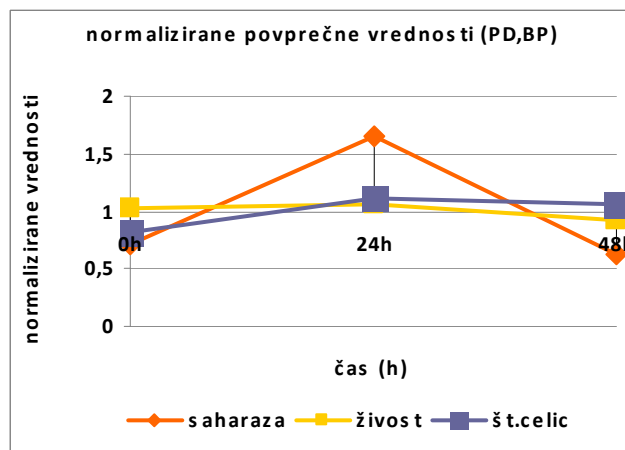
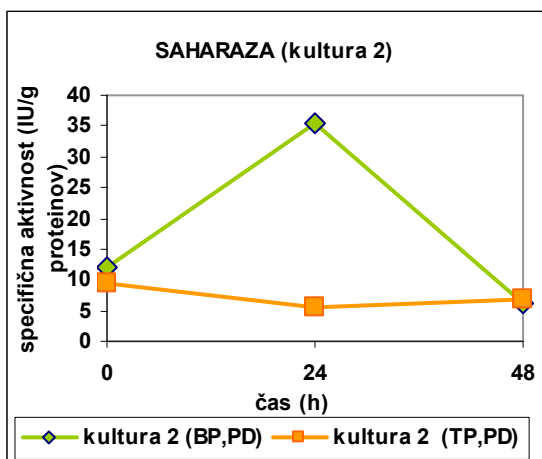
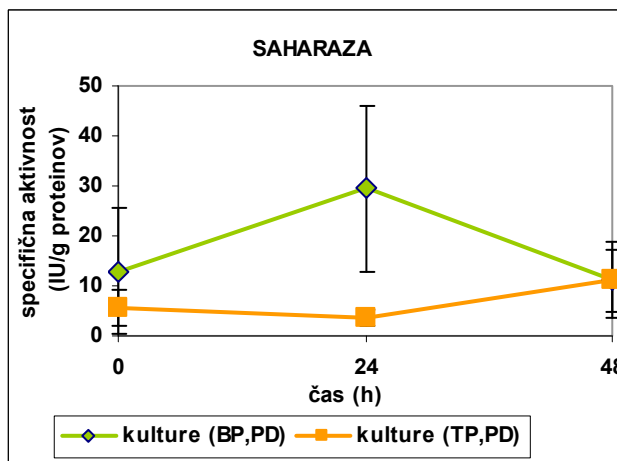
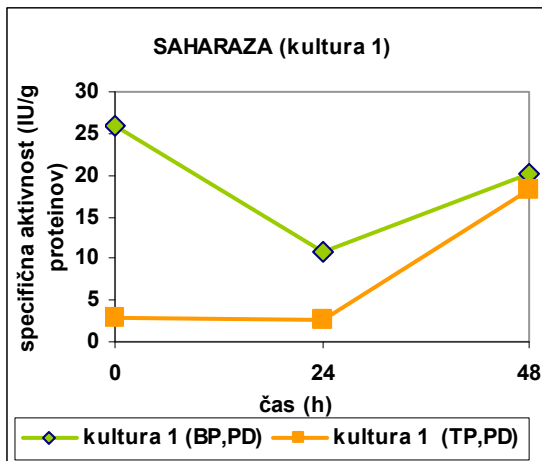
**Preglednica 15:** Specifične aktivnosti saharaze v kulturah podganjih kolonocitov med kultiviranjem brez peptida in s TP ob času  $t=0h$ ,  $t=24h$  in  $t=48h$ .

KULTURE	aktivnost saharaze (IU/g proteinov)	
	brez peptida (kontrola)	TP
	t=0h	t=0h
PD4	25,93	2,91
PD5	11,90	9,51
PD6	1,04	4,19
$\bar{X} \pm SD$	<b>12,96±12,48</b>	<b>5,54±3,50</b>
	t=24h	t=24h
PD4	10,83	2,73
PD5	35,49	5,50
PD6	42,26	2,87
$\bar{X} \pm SD$	<b>29,53±16,54</b>	<b>3,70±1,56</b>
	t=48h	t=48h
PD4	20,12	18,32
PD5	6,30	6,74
PD6	7,10	8,06
$\bar{X} \pm SD$	<b>11,17±7,76</b>	<b>11,04±6,34</b>

Ugotavljali smo, če se encimska aktivnost saharaze v kulturah s toksičnim peptidom v 24 oziroma 48 urah statistično značilno spremeni ( $p < 0,05$ ). Po obdelavi podatkov smo po 24 urah dobili  $p = 0,5487$  in po 48 urah  $p = 0,4274$ . Zato lahko rečemo, da se encimska aktivnost saharaze po 24 urah, kot tudi po 48 urah ni statistično značilno spremenila. Po statistični obdelavi podatkov pa smo ugotovili tudi to, da encimska aktivnost v kulturah s TP v primerjavi s kontrolnimi kulturami ni bila statistično značilna ( $p > 0,05$ ). Tudi iz teh rezultatov lahko zaključimo, da peptid TP nima značilnega (toksičnega) vpliva na aktivnost saharaze zdravih podganjih kolonocitov.

**Graf 9:** Spreminjanje aktivnosti saharaze v posameznih kulturah podganjih kolonocitov (kulture 1,2,3 so PD4, PD5, PD6) med kultiviranjem s TP in brez peptida.

**Graf 10:** Povprečno spreminjanje aktivnosti saharaze med kultiviranjem podganjih kolonocitov s TP in brez peptida.



### **4.3.2 Spremljanje vpliva toksičnega peptida p31-43 (TP) na »zdrave« humane kolonocite**

#### **Vpliv toksičnega peptida na število in živost »zdravih« humanih epiteljskih celic širokega črevesa**

Vpliv toksičnega peptida na število in živost »zdravih« humanih celic smo spremljali v humanih kulturah (HD6, HD17, HD20), podobno kot pri podganjih kulturah. In sicer smo živost celic v kulturi merili ob času nič – takoj po dodatku peptida TP ter po 48 urah inkubiranja s peptidom. Meritev po 24 urah kultiviranja nismo izvajali, ker smo imeli premalo vzorca (700  $\mu$ L suspenzije celic, gostote  $10^5$ /mL). Živost pa smo prav tako merili na aparatu Countess automated cell counter invitrogen – C 10228.

Če povzamemo rezultate primerjav med kulturami s peptidom, bi lahko rekli, da na celice tokom 48 urnega kultiviranja ni bilo zaznanega škodljivega vpliva, saj se je njihovo število pri večini kulturah rahlo povečalo. Lahko bi rekli, da peptid vpliva na proliferacijo celic. Variacije, ki jih opazimo med tremi kulturami, pa so lahko tudi posledica biološke variabilnosti med vzorci heterogenih epiteljskih celic. Pri izolaciji smo namreč zajeli tako celice, ki so v začetni fazi življenjskega cikla, kot celice, ki so že tik pred razpadom. Pri vzorčenju lahko tako pride do različnih deležev različnih epiteljskih celic. Živost celic v kulturah brez peptida in s TP je tokom 48 urnega kultiviranja narastla. V kulturah brez peptida je v povprečju živost celic po 48 urah kultiviranja okoli 68,8 % (porast za 1,75%), v kulturah s peptidom pa je okoli 73,6 % (porast za 11,8%). Po statistični obdelavi podatkov, smo ugotovili, da živost v kulturah s TP v primerjavi s kontrolnimi kulturami ni bila statistično značilno različna ( $p > 0,05$ ). Iz teh rezultatov lahko zaključimo, da peptid TP nima značilnega (toksičnega) vpliva na »zdrave« humane epiteljske celice širokega črevesa.

**Preglednica 16:** Živost »zdravih« humanih epiteljskih celic v 48 h kultiviranja s peptidom TP in brez peptida.

KULTURE	živost (%)	
	brez peptida (kontrola)	TP
	t=0h	t=0h
HD6	71,43	66,67
HD17	66,67	53,3
HD20	61,54	69,23
$\bar{X} \pm SD$	<b>66,55±4,9</b>	<b>63,0± 8,6</b>
	T=48h	t=48h
HD6	75	69,23
HD17	60	72,73
HD20	70	82,35
$\bar{X} \pm SD$	<b>68,3±7,6</b>	<b>74,8±6,8</b>

Živost je definirana kot delež vseh živih celic na število vseh celic (živih in mrtvih celic).

### Vpliv toksičnega peptida na aktivnost tkivne transglutaminaze »zdravih« humanih kolonocitov

Koncentracije proteinov in specifične aktivnosti t-TG v posameznih kulturah »zdravih« humanih celic širokega črevesa smo merili ob začetku kultiviranja s toksičnim peptidom (t=0h) in po 48 ur (t=48h). Po 24 urah kultiviranja nismo merili, ker nismo imeli na razpolago dovolj vzorca. Izmerjene vrednosti specifične aktivnosti t-TG za vse tri kulture »zdravih« humanih kolonocitov med kultiviranjem s peptidom TP in brez nam prikazuje Preglednica 17.

Spreminjanje aktivnosti t-TG v posameznih kulturah med kultiviranjem »zdravih« humanih kolonocitov s peptidom TP in brez njega je prikazano grafično v Grafu 11.

Če rezultate spreminjanja aktivnosti tkivne transglutaminaze v posameznih kulturah »zdravih« humanih kolonocitov (HD6,HD17,HD20) združimo, dobimo povprečno spreminjanje aktivnosti t-TG med kultiviranjem s peptidom TP in brez njega (Graf 12).

**Preglednica 17:** Specifične aktivnosti t-TG v kulturah »zdravih« humanih kolonocitov med kultiviranjem brez peptida in s peptidom TP ob času  $t=0h$  in  $t=48h$ .

KULTURE	aktivnost TG (IU/g proteinov)	
	brez peptida (kontrola)	TP
	t=0h	t=0h
HD6	58,85	62,10
HD17	66,06	117,92
HD20	47,42	54,70
$\bar{X} \pm SD$	<b>57,44±9,40</b>	<b>78,24±34,56</b>
	t=48h	t=48h
HD6	31,51	26,85
HD17	35,85	42,84
HD20	65,38	24,10
$\bar{X} \pm SD$	<b>44,25±18,43</b>	<b>31,26±10,12</b>

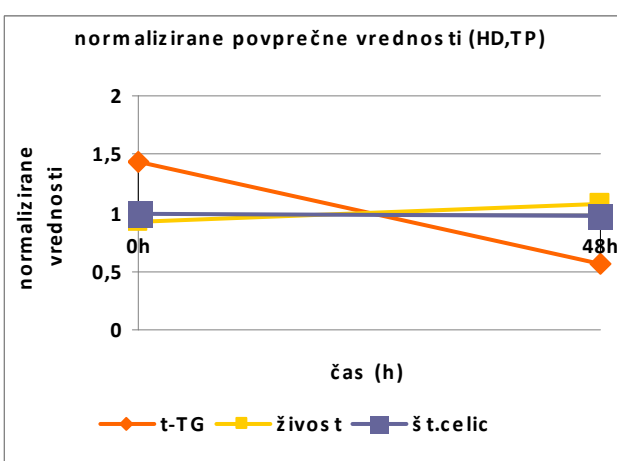
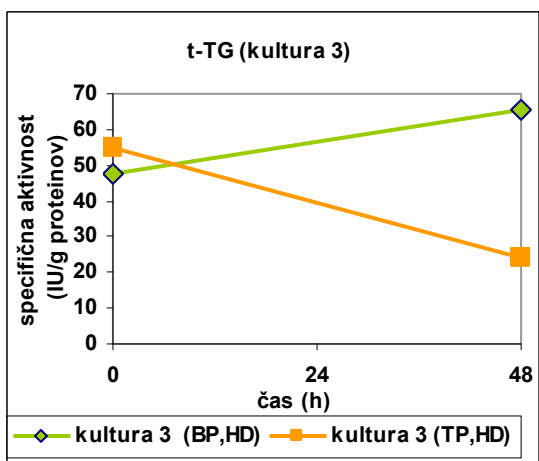
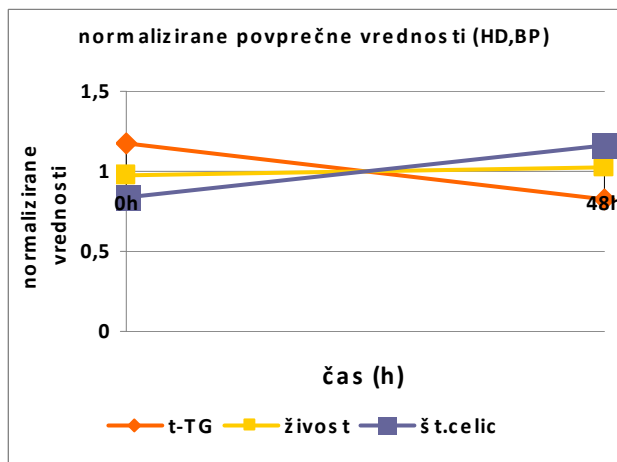
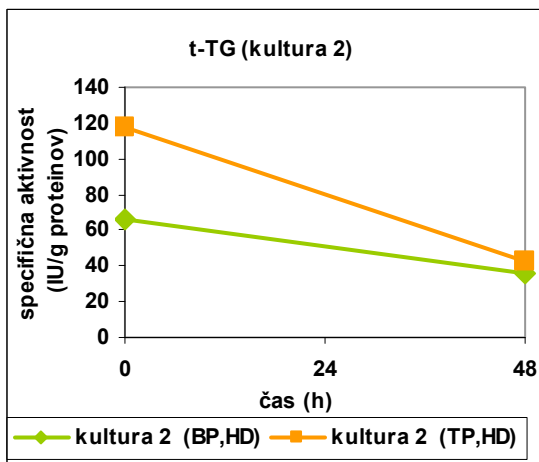
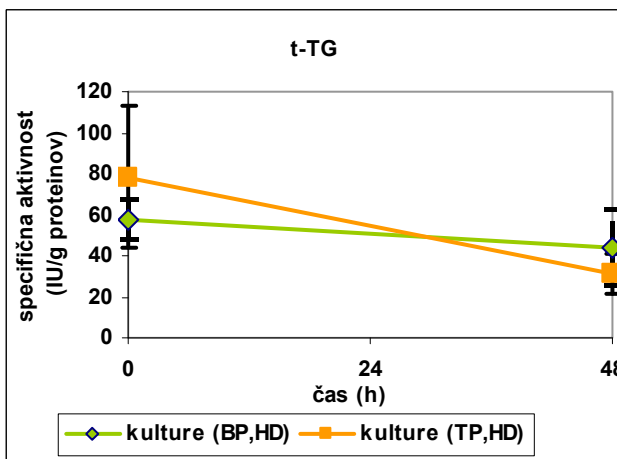
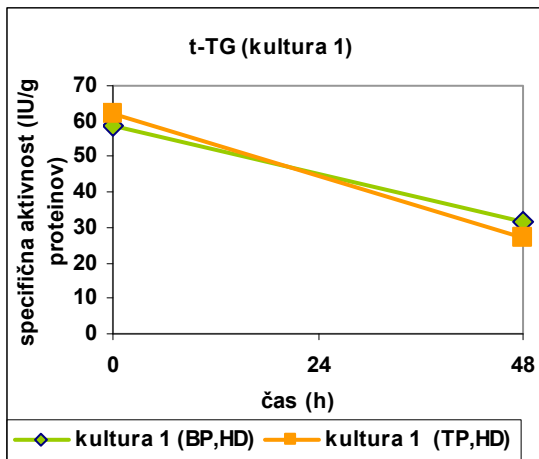
Iz grafov 11 je razvidno, da je trend aktivnosti transglutaminaze med posameznimi humanimi »zdravimi« kulturami s TP enak. Tudi pri kontrolah je opaziti podoben trend aktivnosti tkivne transglutaminaze kot pri kulturah s peptidom TP. Razen pri kulturi 3 (HD20) brez peptida, kjer encimska aktivnost t-TG po 48 urah naraste.

Iz grafa povprečnih vrednosti spreminjanja aktivnosti t-TG med kultiviranjem s toksičnim peptidom TP (Graf 12) je vidno, da ne prihaja do bistvenih sprememb v aktivnosti, ob času  $t=0h$  je maksimalna (78,24 IU/g proteinov) in po 48 urah pade (31,26 IU/g proteinov).

Podatke smo nato statistično obdelali (parni t-test). Ugotavljali smo, če encimska aktivnost v kulturah s toksičnim peptidom v 48 urah statistično značilno spremeni ( $p < 0,05$ ). Po obdelavi podatkov smo po 48 urah dobili  $p = 0,9932$ . Zato lahko rečemo, da encimska aktivnost po 48 urah se ni statistično značilno spremenila. Po statistični obdelavi podatkov, pa smo ugotovili tudi to, da encimska aktivnost v kulturah s TP v primerjavi s kontrolnimi kulturami tudi ni bila statistično značilna ( $p > 0,05$ ). Iz teh rezultatov lahko zaključimo, da peptid TP nima značilnega (toksičnega) vpliva na t-TG »zdravih« humanih kolonocitov.

**Graf 11:** Spreminjanje aktivnosti t-TG v posameznih kulturah »zdravih« humanih kolonocitov (kulture 1,2,3 so HD6, HD17, HD20) med kultiviranjem s TP in brez peptida.

**Graf 12:** Povprečno spreminjanje aktivnosti t-TG med kultiviranjem »zdravih« humanih kolonocitov s TP in brez peptida.





### Vpliv toksičnega peptida na aktivnost maltaze in saharaze »zdravih« humanih kolonocitov

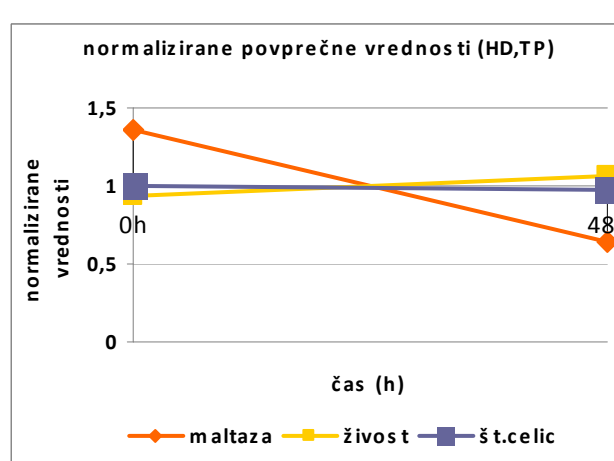
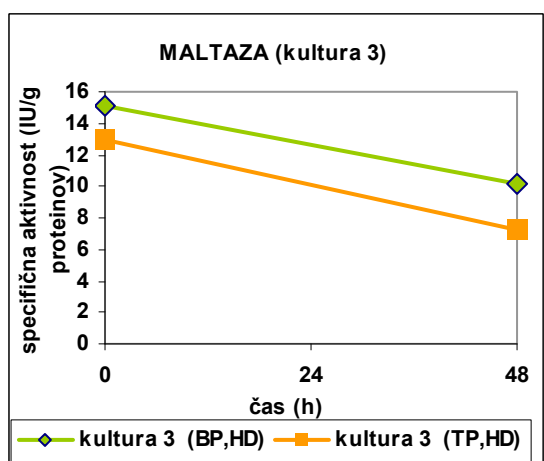
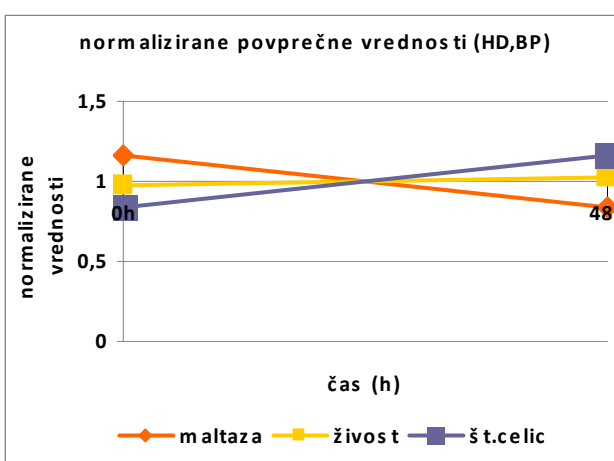
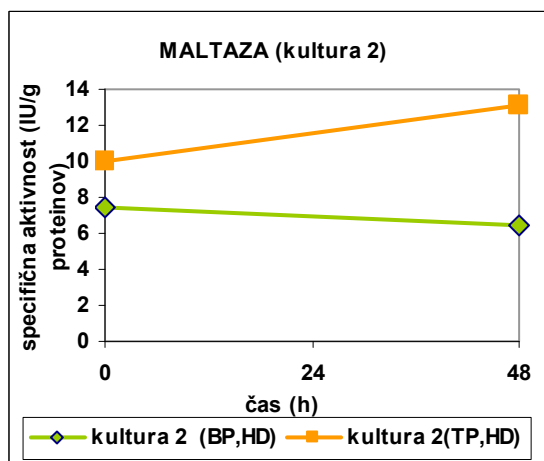
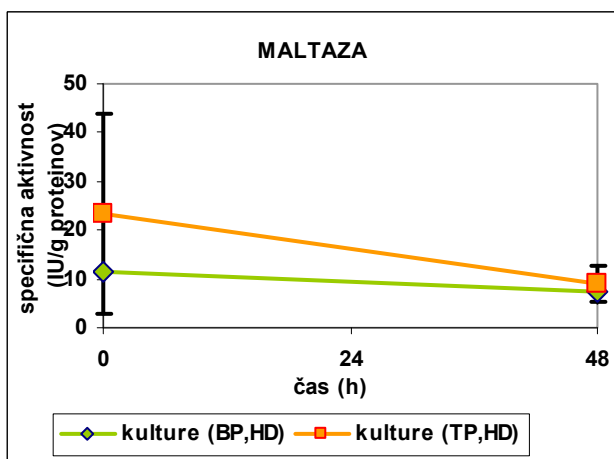
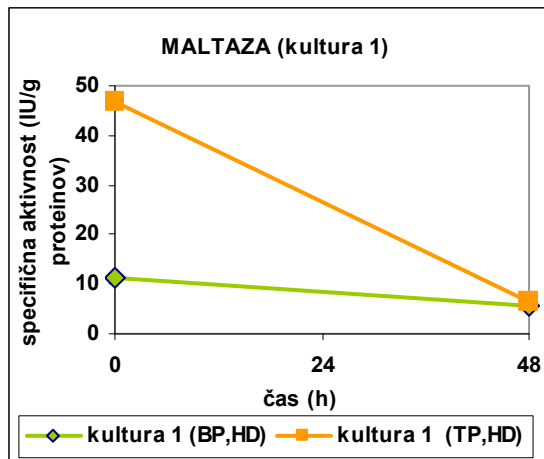
Specifične aktivnosti maltaze in saharaze v posameznih kulturah humanih »zdravih« celic širokega črevesa so tudi grafično prikazane (maltaza: Graf 13, saharaza: Graf15). Predstavljeni sta dve krivulji na posameznem grafu, ena predstavlja spreminjanje aktivnosti v kulturah brez peptida (kontrola); druga pa v kulturah s dodanim peptidom. Izmerjene vrednosti specifične aktivnosti maltaze za vse tri kulture »zdravih« humanih kolonocitov med kultiviranjem s peptidom TP in brez so zbrane v Preglednici 18, za saharazo pa v Preglednici 19.

Če rezultate spreminjanja aktivnosti maltaze ali saharaze v posameznih kulturah »zdravih« humanih kolonocitov združimo (HD6,HD17,HD20), dobimo povprečno spreminjanje aktivnosti maltaze (Graf 14) ali saharaze (Graf 16) med kultiviranjem s peptidom TP in brez njega.

**Preglednica 18:** Specifične aktivnosti maltaze v kulturah »zdravih« humanih kolonocitov med kultiviranjem brez peptida in s peptidom TP ob času  $t=0h$  in  $t=48h$ .

KULTURE	aktivnost maltaze (IU/g proteinov)	
	brez peptida (kontrola)	TP
	t=0h	t=0h
HD6	11,26	46,86
HD17	7,42	10,03
HD20	15,16	13,00
$\bar{X} \pm SD$	<b>11,28±3,87</b>	<b>23,30±20,46</b>
	t=48h	t=48h
HD6	5,69	6,60
HD17	6,50	13,09
HD20	10,14	7,30
$\bar{X} \pm SD$	<b>7,44±2,37</b>	<b>8,99±3,56</b>

**Graf 13:** Spreminjanje aktivnosti maltaze v posameznih kulturah »zdravih« humanih kolonocitov (kulture 1,2,3 so HD6, HD17, HD20) med kultiviranjem s TP in brez peptida.



Iz grafov 13, je razvidno, da se izmerjene aktivnosti maltaze med posameznimi kulturami razlikujejo, verjetno zaradi individualne biološke variabilnosti med posameznimi kulturami

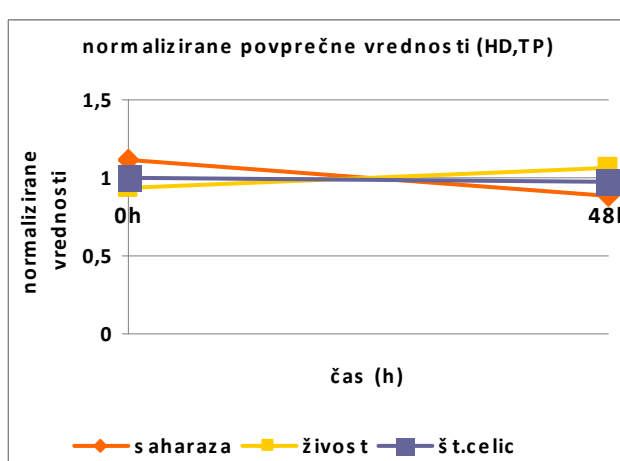
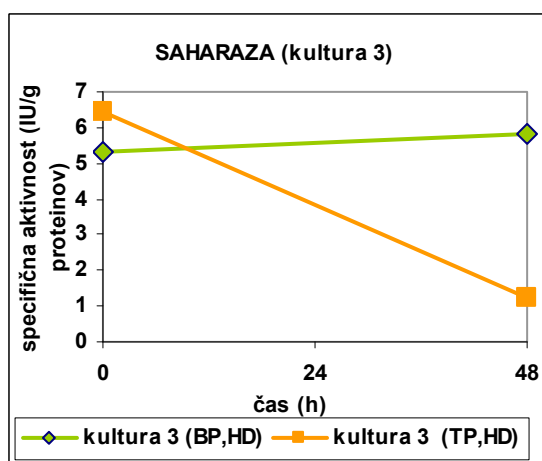
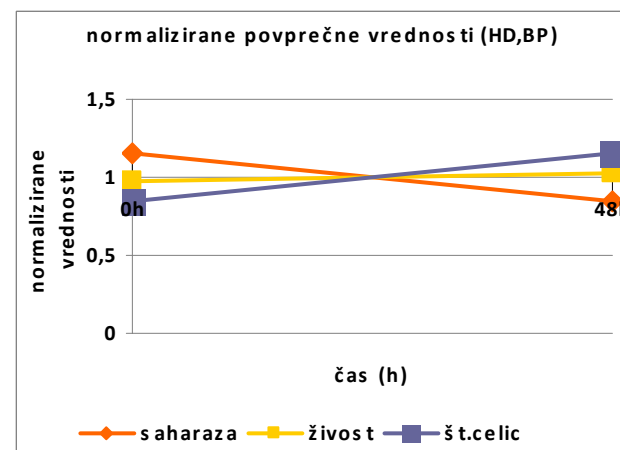
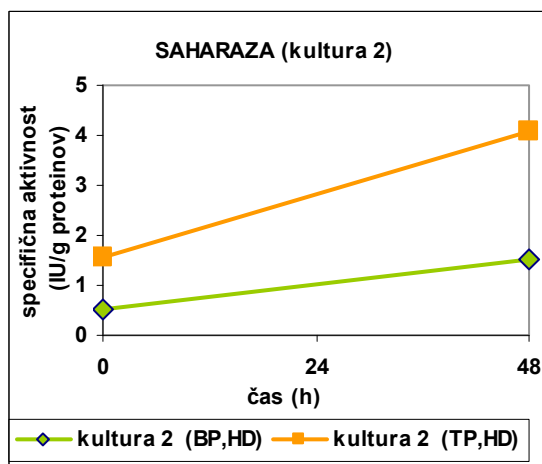
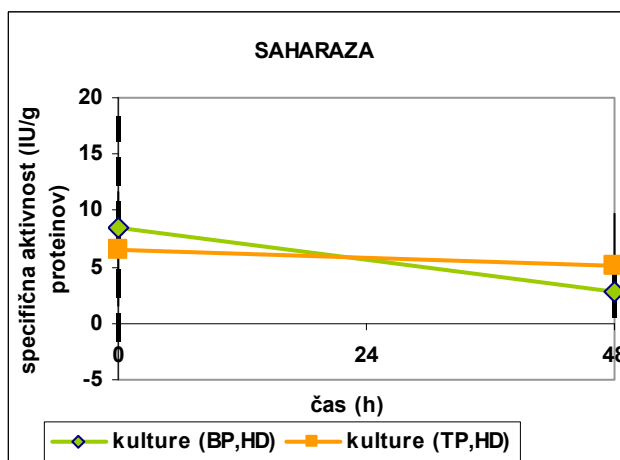
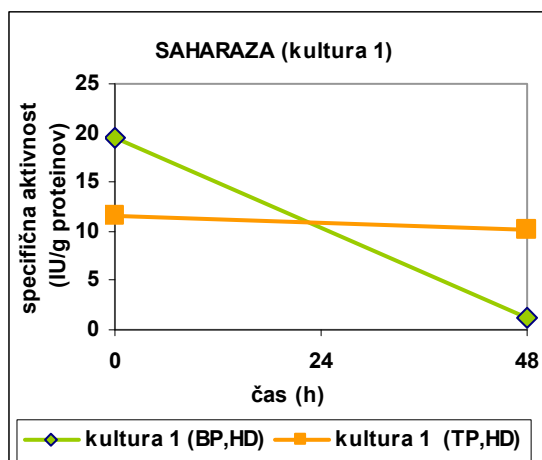
celic. Iz posameznih grafov je vidno, da specifična aktivnost maltaze v kulturah, kjer nismo dodali toksičnega peptida, minimalno pada. To je opaziti v vseh treh kulturah. V kulturah s TP pa tudi ni videti, da bi prihajalo do velikega odstopanja v primerjavi kontrolami.

V grafu povprečnih vrednosti (Graf 14) lahko razberemo, da specifična aktivnost maltaze po 48 urah kultiviranja s toksičnim peptidom pade; kot tudi v kulturah, kjer ni prisoten toksični peptid. Podatke smo nato statistično obdelali (parni t-test). Ugotavljali smo, če se encimska aktivnost v kulturah s toksičnim peptidom v 48 urah statistično značilno spremeni ( $p < 0,05$ ). Po obdelavi podatkov smo po 48 urah dobili  $p = 0,6844$ . Zato lahko rečemo, da se encimska aktivnost maltaze po 48 urah ni statistično značilno spremenila. Po statistični obdelavi podatkov, pa smo ugotovili tudi to, da encimska aktivnost v kulturah s TP v primerjavi s kontrolnimi kulturami tudi ni bila statistično značilna ( $p > 0,05$ ). Iz teh rezultatov lahko zaključimo, da peptid TP nima značilnega (toksičnega) vpliva na aktivnost maltaze »zdravih« humanih kolonocitov.

**Preglednica 19:** Specifične aktivnosti saharaze v kulturah »zdravih« humanih kolonocitov med kultiviranjem brez peptida in s peptidom TP ob času  $t=0h$  in  $t=48h$ .

KULTURE	aktivnost saharaze (IU/g proteinov)	
	brez peptida (kontrola)	TP
	t=0h	t=0h
HD6	19,49	11,63
HD17	0,52	1,58
HD20	5,34	6,45
$\bar{X} \pm SD$	<b>8,44±9,86</b>	<b>5,22±4,90</b>
	t=48h	t=48h
HD6	1,24	10,09
HD17	1,51	4,06
HD20	5,84	1,25
$\bar{X} \pm SD$	<b>2,86±2,58</b>	<b>4,22±4,11</b>

**Graf 15:** Spreminjanje aktivnosti saharaze v posameznih kulturah »zdravih« humanih kolonocitov (kulture 1,2,3 so HD6, HD17, HD20) med kultiviranjem s TP in brez peptida.



Iz grafov 15, je razvidno, da se izmerjene aktivnosti saharaze med posameznimi kulturami razlikujejo, verjetno zaradi individualne biološke variabilnosti. Iz grafa povprečnih

vrednosti (Graf 16) lahko razberemo, da specifična aktivnost saharaze po 48 urah kultiviranja s toksičnim peptidom pade; kot tudi v kulturah, kjer ni prisoten toksični peptid. Podatke smo nato statistično obdelali (parni t-test). Ugotavljali smo, če se encimska aktivnost saharaze v kulturah s toksičnim peptidom v 48 urah statistično značilno spremeni (zniža) ( $p < 0,05$ ). Po obdelavi podatkov smo po 48 urah dobili  $p = 0,5188$ . Zato lahko rečemo, da se encimska aktivnost po 48 urah ni statistično značilno spremenila (znižala). Po statistični obdelavi podatkov, pa smo ugotovili tudi to, da encimska aktivnost v kulturah s TP v primerjavi s kontrolnimi kulturami ni bila statistično značilno različna ( $p > 0,05$ ). Iz teh rezultatov lahko zaključimo, da peptid TP nima značilnega (toksičnega) vpliva na aktivnost saharaze »zdravih« humanih kolonocitov.

### **4.3.3 Spremljanje vpliva toksičnega peptida p31-43 (TP) na kolonocite bolnika s Crohnovo boleznijo**

#### **Vpliv toksičnega peptida na število in živost epiteljskih celic širokega črevesa bolnika s Crohnovo boleznijo**

Vpliv toksičnega peptida na število in živost epiteljskih celic debelega črevesa bolnika smo spremljali podobno kot pri podganjih kulturah in kulturah »zdravih« humanih kolonocitov in sicer smo število in živost celic merili ob času nič – takoj po dodatku peptida TP ter po 48 urah inkubiranja s peptidom TP. Po 24 urah kultiviranja nismo izvajali meritev, ker smo imeli premalo vzorca. Število in živost smo merili na aparatu Countess automated cell counter invitrogen – C 10228.

Pri kulturi bolnika s Crohnovo boleznijo (HD9) je živost celic tokom kultiviranja narastla, tako v kulturi brez peptida (za 24,1%), kot tudi v kulturi s TP (za 16,25%) (Preglednica 20).

Če bi imel peptid kakršenkoli vpliv, bi bile razlike v živosti verjetno bolj opazne. Po statistični obdelavi podatkov, smo ugotovili, da živost v kulturah s TP v primerjavi s kontrolnimi kulturami ni bila statistično značilna ( $p > 0,05$ ). Iz teh rezultatov lahko zaključimo, da peptid TP nima vpliva na živost epiteljskih celic širokega črevesa bolnika s Crohnovo boleznijo.

**Preglednica 20:** Živost v kulturah humanih kolonocitov bolnika s Crohnovo boleznijo tokom 48 urnega kultiviranja s peptidom TP in brez peptida.

KULTURA	Živost (%)	
	brez peptida (kontrola)	TP
	t=0h	t=0h
HD9	61,54	68,75
	T=48h	t=48h
HD9	85,71	85

Živost je definirana kot delež vseh živih celic na število vseh celic (živih in mrtvih celic).

### Vpliv toksičnega peptida na aktivnost tkivne transglutaminaze kolonocitov bolnika s Crohnovo boleznijo

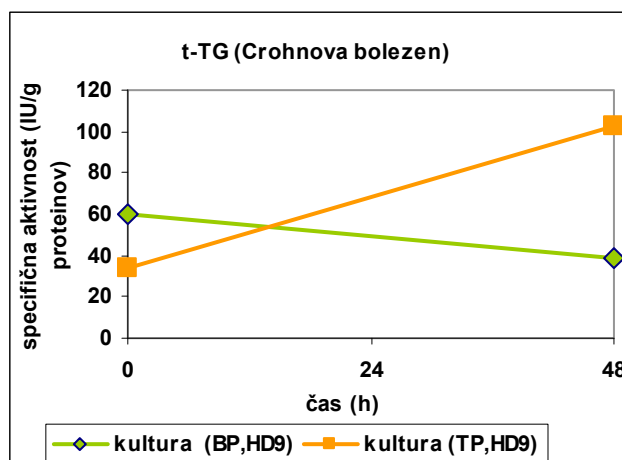
Specifične aktivnosti t-TG v kulturi kolonocitov bolnika s Crohnovo boleznijo smo merili ob začetku kultiviranja z toksičnim peptidom (t=0h) in po 48 ur (t=48h). Po 24 urah kultiviranja nismo merili, ker nismo imeli na razpolago dovolj vzorca. Izmerjene vrednosti specifične aktivnosti t za kulturo kolonocitov bolnika med kultiviranjem s peptidom TP in brez nam prikazuje Preglednica 21.

Spreminjanje aktivnosti t-TG v kulturi kolonocitov bolnika med kultiviranjem brez in s peptidom TP je prikazano tudi grafično v Grafu 17.

**Preglednica 21:** Specifične aktivnosti t-TG v kulturi humanih kolonocitov bolnika s Crohnovo boleznijo med kultiviranjem brez peptida in s peptidom TP ob času t=0h in t=48h.

KULTURA	aktivnost t-TG (IU/g proteinov)	
	brez peptida (kontrola)	TP
	t=0h	t=0h
HD9	60,13	33,66
	t=48h	t=48h
HD9	38,69	102,75

**Graf 17:** Spreminjanje aktivnosti t-TG v kulturi kolonocitov bolnika s Crohnovo boleznijo med kultiviranjem s TP in brez peptida.



Pri kulturi kolonocitov bolnika s Crohnovo boleznijo je aktivnost t-TG celic manjša kot v kontroli na samem začetku kultiviranja, se pravi ob času nič. Po 48 urnem kultiviranju pa je aktivnost t-TG v primerjavi s kontrolo, kjer ni peptida, močno narastla (za faktor 3) (Preglednica 11). Porast aktivnosti t-TG kolonocitov bolnika v kulturi s TP po 48 urah je lahko posledica vpliva toksičnega peptida, vendar je za to trditev potrebno izvesti poizkuse na kolonocitih večih bolnikov s Crohnovo boleznijo, predvsem zato, ker je trend aktivnosti t-TG obraten, kot pri »zdravih« humanih kolonocitih.

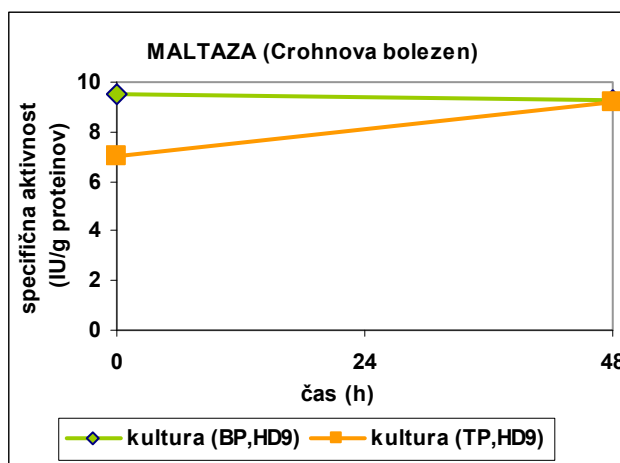
### Vpliv toksičnega peptida na aktivnost maltaze in saharaze kolonocitov bolnika s Crohnovo boleznijo

Specifična aktivnost maltaze in saharaze v kulturi kolonocitov bolnika s Crohnovo boleznijo so grafično prikazana (maltaza: Graf 18, saharaza: Graf19). Izmerjene vrednosti specifične aktivnosti maltaze za kulturo kolonocitov bolnika med kultiviranjem s peptidom TP in brez so zbrane v Preglednici 22, za saharazo pa v Preglednici 23.

**Preglednica 22:** Specifične aktivnosti maltaze v kulturi humanih kolonocitov bolnika s Crohnovo boleznijo med kultiviranjem brez peptida in s peptidom TP ob času t=0h in t=48h.

KULTURA	aktivnost maltaze (IU/g proteinov)	
	brez peptida (kontrola)	TP
	t=0h	t=0h
HD9	9,48	6,98
	t=48h	t=48h
HD9	9,28	9,19

**Graf 18:** Spreminjanje aktivnosti maltaze v kulturi kolonocitov bolnika s Crohnovo boleznijo med kultiviranjem s TP in brez peptida.



Pri kulturi kolonocitov bolnika s Crohnovo boleznijo je aktivnost maltaze celic manjša kot v kontroli na samem začetku kultiviranja, se pravi ob času nič. Po 48 urnem kultiviranju pa je aktivnost maltaze v primerjavi s kontrolo, kjer ni peptida, skoraj popolnoma enaka (Preglednica 22).

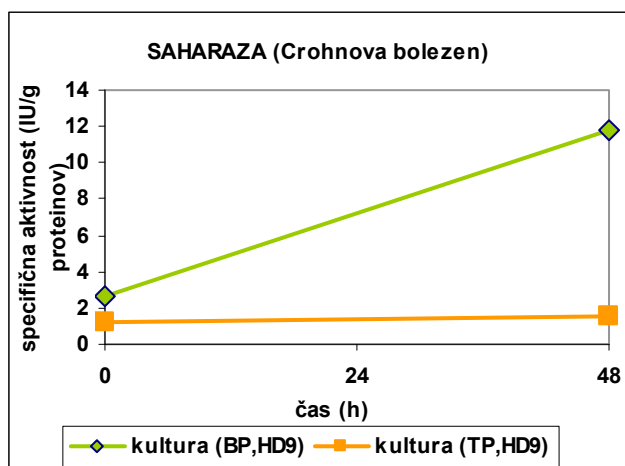
Iz teh rezultatov lahko zaključimo, da peptid TP verjetno nima vpliva na aktivnost maltaze kolonocitov bolnika s Crohnovo boleznijo.

**Preglednica 23:** Specifične aktivnosti saharaze v kulturi humanih kolonocitov bolnika s Crohnovo boleznijo med kultiviranjem brez peptida in s peptidom TP ob času  $t=0h$  in  $t=48h$ .

KULTURA	aktivnost saharaze (IU/g proteinov)	
	brez peptida (kontrola)	TP
	t=0h	t=0h
HD9	2,60	1,21
	t=48h	t=48h
HD9	11,74	1,49



**Graf 19:** Spreminjanje aktivnosti saharaze v kulturi kolonocitov bolnika s Crohnovo boleznijo med kultiviranjem s TP in brez peptida.



Pri kulturi kolonocitov bolnika s Crohnovo boleznijo je aktivnost saharaze celic tokom 48 urnega kultiviranja skoraj konstantna, v kulturah brez peptida pa je po 48 urnem kultiviranju aktivnost saharaze močno narastla (za faktor 4,5) (Preglednica 23), kar kaže na podobnost obnašanja kultiviranih enterocitov bolnikov s celiakijo (35).

Iz teh rezultatov lahko zaključimo, da peptid TP vpliva na zmanjšanje aktivnosti saharaze v kulturi kolonocitov bolnika s Crohnovo boleznijo.

## 5. SKLEPI

V naši raziskovalni nalogi smo proučevali vpliv gliadinskega pentapeptida p39-43 (P1) in toksičnega peptida p31-43 (TP) na podganje kolonocite preko spremljanja števila in živosti celic in preko aktivnosti tkivne transglutaminaze (t-TG) ter aktivnosti dveh membranskih encimov, maltaze in saharaze. Poleg tega pa smo proučevali tudi vpliv istega toksičnega peptida p31-43 (TP) na humane »zdrave« kolonocite ter na kolonocite bolnika s Crohnovo boleznijo. Pri tem smo prišli do sledečih ugotovitev:

- ◆ Z opisanim postopkom izolacije smo izolirali mešano populacijo humanih epiteljskih celic širokega črevesa.
- ◆ **Pentapeptid P1** v času 48 urnega kultiviranja ne vpliva izrazito na morfologijo podganjih epiteljskih celic, ne vpliva na število in živost celic, kot tudi ne na aktivnost t-TG zdravih podganjih kolonocitov.
- ◆ **Toksični peptid TP** v času 48 urnega kultiviranja ne vpliva izrazito na morfologijo podganjih epiteljskih celic širokega črevesa, ne vpliva na število in živost celic, prav tako nima značilnega vpliva na aktivnost t-TG, maltaze in saharaze zdravih podganjih kolonocitov.
- ◆ **Toksični peptid TP** v času 48 urnega kultiviranja ne vpliva na morfologijo »zdravih« humanih epiteljskih celic širokega črevesa, ne vpliva na število in živost celic, prav tako nima značilnega vpliva na aktivnost t-TG, maltaze in saharaze »zdravih« humanih kolonocitov.
- ◆ **Toksični peptid TP** v času 48 urnega kultiviranja ne vpliva na morfologijo humanih epiteljskih celic širokega črevesa bolnika s Crohnovo boleznijo, ne vpliva na število in živost celic. Po 48 urnem kultiviranju je aktivnost t-TG v primerjavi s kontrolo, kjer ni bilo peptida, porastla za faktor 3, kar je lahko posledica vpliva toksičnega peptida, vendar je za to trditev potrebno izvesti poizkuse na kolonocitih več bolnikov s Crohnovo boleznijo. Peptid TP verjetno nima vpliva na aktivnost maltaze, vpliva pa na aktivnost saharaze kolonocitov bolnika s Crohnovo boleznijo.

Izsledki raziskave so pomembni predvsem za nadaljnje proučevanje vpliva gliadinskih peptidov pri kroničnih vnetnih črevesnih boleznih.

## 6. LITERATURA

- (1) Ferkolj I: Kronična vnetna črevesna bolezen. V: Kocjančič A, Mravlje F: Interna medicina (Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1993: 374-380).
- (2) Dr. Marjan P in dr. Anton Š: Anatomija in fiziologija za medicinske šole (DZS, Ljubljana, 1997: 97-98, 107-117).
- (3) [http://si.wikipedia.org/wiki/tanko\\_črevo](http://si.wikipedia.org/wiki/tanko_črevo) (20.04.2009).
- (4) Fraile Ovejero A, Negrid M: Fiziologija človeka (Založba Mladinska knjiga, Ljubljana, 1993: 34-38).
- (5) Zbornik prispevkov 1. slovenskega strokovnega srečanja o celiakiji: Celiakija danes (Slovensko društvo za celiakijo, Ljubljanska 5, Maribor, maj 2002: 8-35).
- (6) Dolinšek J, Urlep-Žužej D, Mičetić-Turk D: Sodobni principi diagnostike celiakije ( Zdravstveni vestnik, 2006;75: II-89-97).
- (7) Tušek Bunc K: Celiakija v ambulanti zdravnika družinske medicine («Celiakija» - glasilo slovenskega društva za celiakijo, 2006: 5).
- (8) Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H: The histopathology of coeliac disease (time for a standardized report scheme for pathologists, Eur J Gastroenterol Hepatol 1999; 11: 1185-1194).
- (9) Marsh MN, Crowe PT: Morphology of the mucosal lesion in gluten sensitivity (Baillieres Clin Gastroenterol 1995; 9: 273-293).
- (10) Hiller A; (prevedla Jurič N): Raznolika dieta pri celiakiji ( IN OBS MEDICUS, d.o.o., Ptuj, 2003: 9-32).
- (11) Viršček Marn M, Dolinšek J: Preobčutljivost na gluten (celiakija) (Varnost živil: Ljubljana, biotehnična fakulteta, 2004: 75-79).
- (12) <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/smallgut/lifecycle.html> (07.05.2009).

- (13) Potten CS: Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death (Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1998; 353: 821-830).
- (14) <http://www.courseweb.uottawa.ca/medicine-histology/English/gastrointestinal/GastroSmallintest.html> (07.05.2009)
- (15) <http://wwwmgs.bionet.nsc.ru/mgs/gnw/trrd/thesaurus/Di/small.html#anat> (07.05.2009)
- (16) <http://en.wikipedia.org/wiki/Enterocyte> (10.05.2009)
- (17) [http://www.bioeng.auckland.ac.nz/anatml/database/cells/parts/part/part\\_33.html](http://www.bioeng.auckland.ac.nz/anatml/database/cells/parts/part/part_33.html) (11.05.2009)
- (18) Koželj M, Ferkolj I: Kronična vnetna črevesna bolezen (Krka,d.d., Novo mesto; izdano v Novem mestu; 2004: 10-13, 18-20, 36-39, 56-57).
- (19) [http://si.wikipedia.org/wiki/debelo\\_črevo](http://si.wikipedia.org/wiki/debelo_črevo) (15.05.2009)
- (20) Di Tola M, Sabbatella L, Anania MC, Viscido A, Caprilli R, Pica R, Paoluzi P, Picarelli A: Anti-tissue transglutaminase antibodies in inflammatory bowel disease: new evidence. (Clin Chem Lab Med 2004; 42: 1092-1097).
- (21) Masachs M, Casellas F, Malagelada JR: Inflammatory bowel disease in celiac patients. (Rev Esp Enferm Dig 2007; 99: 446-450).
- (22) Howdle PD: Gliadin,glutenin or both? The search for the Holy Grail in coeliac disease. (Eur J Gastroenterol Hepatol 2006; 18: 703-706).
- (23) Velikonja T: Funkcionalne motnje prebavil Kako si pomagamo? (Modrijan založba, d.o.o., za založbo Branimir Nesovic, Ljubljana, 2006: 113-135).
- (24) [http://en.wikipedia.org/wiki/Cell\\_culture](http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_culture) (25.05.2010)
- (25) 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).

- (26) Bradford MM: A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding (Anal Biochem 1976; 72: 248-254).
- (27) Navodila proizvajalca: Transglutaminase Assay Kit.  
<http://www.sigmaaldrich.com/sigma/bulletin/cs1070bul.pdf> (10.4.2010)
- (28) Dahlqvist A: Assay of Intestinal Disaccharidases (Anal Biochem 1968; 22: 99-107)
- (29) Kronične vnetne črevesne bolezni in zdravila.  
<http://www.revijakapital.com/life/clanki.php?idclanka=50> (03.06.2010)
- (30) Boštjančič Lidija: Kultiviranje mišjih enterocitov in proučevanje njihovih funkcij in vitro, Diplomaska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2008.
- (31) Roglič Jernej: Primerjava uspešnosti kultiviranja mišjih in podganjih enterocitov, Diplomaska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2009.
- (32) Lapanja Tina: Spremljanje aktivnosti lizocima kot celičnega označevalca Panethovih celic v kulturah mišjih in podganjih epiteljskih celic tankega črevesa, Diplomaska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2009.
- (33) Catalog no. C10227: Countess TM Automated Cell Counter (invitrogen, Version A, 16 september 2008, MP1022/).
- (34) Browning TH, Trier JS: Organ culture of mucosal biopsies of human small intestine. J Clin Invest (1969; 48(8): 1423-1432).
- (35) Trier JS, Browning TH: Epithelial-cell renewal in cultured duodenal biopsies in celiac sprue. New Eng J Med (1970; 283: 1245-1250).
- (36) 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. (Cronobiol 1987; XIV/2: 199-200).

- (37) Carethers JM: Cell checkpoints and enterocyte differentiation: a recipe for sequential stages Focus on »Caco-2 intestinal cell differentiation is associated with G1 arrest and suppression of CDK2 and CDK4«. Am J Physiol Cell Physiol (1998; 275: 1191-1192)  
<http://ajpcell.physiology.org/cgi/content/full/275/5/C1191> (8.6.2010).
- (38) Sambuy Y, de Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati 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).
- (39) Nollevaux G, Deville C, El Moualij B, Zorzi W, Deloyer P, Schneider YJ, Peulen O, Dandrifosse G: Development of a serum-free co-culture of human intestinal epithelium cell lines (Caco-2/HT29-5M21). BMC Cell Biology (2006; 7: 20) .
- (40) Halbleib JM, Sääf AM, Brown PO, Nelson WJ: Transcriptional Modulation of Genes Encoding Structural Characteristics of Differentiating Enterocytes During Development of a Polarized Epithelium In Vitro. Moll Biol Cell 2007; 18(11): 4261-4278.
- (41) 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)
- (42) Perreault N, Beaulieu JF: Primary cultures of fully differentiated and pure human intestinal epithelial cells. Exp Cell Res 1998; 245(1): 34-42.
- (43) Elli L, Dolfini E, Bardella MT: Gliadin cytotoxicity and in vitro cell cultures. Toxicol (Lett 2003; 146: 1-8).
- (44) Silano M, De Vincenzi M: In vitro screening of food peptides toxic for coeliac and other gluten-sensitive patients: a review. Toxicology (1999; 132: 99-110).
- (45) Freshney IR: Culture of animal cells. A manual of basic technique. (3rd ed. New York: Wiley-Liss 1994: 486).

- (46) Kaeffler B: Mammalian intestinal epithelial cells in primary culture: A mini-review. (Society for In Vitro Biology 2002, In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal 38: 123-134).
- (47) Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Corazza GR: The immune recognition of gluten in coeliac disease. (Clin Exp Immunol 2005; 140: 408-416).
- (48) Sollid LM, Khosla C: Future therapeutic options for celiac disease. (Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 2005; 2: 140-147) .
- (49) Sturgess R, Day P, Ellis HJ, Lundin KE, Gjertsen HA, Kontakou M, Ciclitira PJ: Wheat peptide challenge in coeliac disease. (Lancet 1994; 343: 758-761).
- (50) Fasano A, Not T, Wang W, Uzzau S, Berti I, Tommasini A, Goldblum SE: Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. (Lancet 2000; 355: 1518-1519).
- (51) Mowat AM: Coeliac disease – a meeting point for genetics, immunology, and protein chemistry. (Lancet 2003; 361: 1290-1292).
- (52) Troncone R, Mazzarella G, Leone N, Mayer M, De Vincenzi M, Greco L, Auricchio S: Gliadin activates mucosal cell mediated immunity in cultured rectal mucosa from coeliac patients and a subset of their siblings. (Gut 1998; 43: 484-489).
- (53) Lukač-Bajalo J, Boštjančič L, Handžija M, Majdič G, Orel R, Stražar M, Božič B. Long-term culture of mouse small intestinal epithelial cells as a study model. V: Breclj J (ur.), Orel R (ur.). The 1st South-Eastern European Pediatric Gastroenterology (SEEPEG) Meeting : Ljubljana, September [25th and 26th], 2009, (Medicinski razgledi, Supplement, Letn. 48, 3). Ljubljana: Medicinski razgledi, cop. 2009, str. 118.
- (54) Lukač-Bajalo J, Lapanje T, Orel R, Perse M, Roglič J, Štrukelj K, Vrtačnik P, Božič B. Long-term culture of rat intestinal epithelial cells as a study model. V: Breclj J (ur.), Orel R (ur.). The 1st South-Eastern European Pediatric Gastroenterology (SEEPEG) Meeting : Ljubljana, September [25th and 26th], 2009, (Medicinski razgledi, Supplement, Letn. 48, 3). Ljubljana: Medicinski razgledi, cop. 2009, str. 119.



(55) Lukač-Bajalo J, Eržen A, Gosak J, Majdič G, Orel R, Roglič J, Štrukelj K, Božič B. Study of in vitro effects of two gliadin peptides on mouse small intestinal epithelial cells. V: Brecelj J (ur.), Orel R(ur.). The 1st South-Eastern European Pediatric Gastroenterology (SEEPEG) Meeting : Ljubljana, September [25th and 26th], 2009, (Medicinski razgledi, Supplement, Letn. 48, 3). Ljubljana: Medicinski razgledi, cop. 2009, str. 120.

(56) Lukač-Bajalo J, Boštjančič L, Hadžija M, Majdič G, Orel R, Stražar M, Božič B. Primary culture of mouse small intestinal epithelial cells as a study model for bowel diseases. V: 7th International Congress on Autoimmunity, Ljubljana, Slovenia, May 5-9, 2010 : final program. [S.l.: s.n.], 2010, str. 133.

(57) B. Seidelin J, Horn T, Nielsen Ole H: Simple and efficient method for isolation and cultivation of endoscopically obtained human colonocytes ( Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 285: G1122-G1128, 2003)

(58) Baten A, Sakamoto K, and Shamsuddin A M: Long- term culture of normal human colonic epithelial cells in vitro (Department of Pathology, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland 21201, USA, 1992)

(59) Schorkhuber M, Karner-Hanusch J, Sedivy R, Ellinger A, Armbruster C, Schulte-Hermann R, and Marian B. Survival of normal colonic epithelial cells from both rats and humans is prolonged by coculture with rat embryo colonic fibroblasts. (Cell Biol Toxicol 14:211-223, 1998)

(60) Bartsch I, Zschaler I, Haseloff M and Steinberg P (Chair of Nutritional Toxicology, Institute of Nutritional science, University of Potsdam, Arthur-Scheunert-Allee 114-116, 14558 Nuthetal, Germany, 2004)