

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA KLINC

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

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

DIPLOMSKA NALOGA

LJUBLJANA, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Jane Lukač Bajalo, univ. dipl. kem., spec. med. biokem. in somentorstvom doc. dr. Roka Orel, dr. med., spec. ped..

Za pomoč pri nastajanju diplomskega dela bi se predvsem iskreno zahvalila mentorici prof.dr. Jani Lukač Bajalo, ki je znala razdajati svoj raziskovalni duh in svetovati, kadarkoli sem to potrebovala. Hvala tudi somentorju doc.dr. Roku Orlu za vse njegove strokovne nasvete pri izdelavi končne podobe diplomske naloge.

Za vso pomoč pri izvajanju eksperimentalnega dela se zahvaljujem tehničnima sodelavkama, asistentom in mladim raziskovalcem s Katedre za klinično biokemijo. Hvala tudi asist.dr. Igorju Locatelliju za njegove strokovne nasvete pri statistični obdelavi podatkov.

Pred diplomsko nalogo je tudi nekaj let napornega študija, vendar sem ga lažje premagovala skupaj s svojo družino, ki me je ves čas podpirala in verjela vame. Hvala tudi fantu Štefanu za njegovo potrpežljivost in spodbujanje na poti študija. Prav tako bi se rada zahvalila sorodnikom in prijateljicam za vse spodbudne besede. Še enkrat hvala vsem in vsakemu posebej.

Izjava:

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

Nina Klinc

Ljubljana, 2010

Predsednik diplomske komisije:izr. prof. dr. Vojko Kmetec, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Mojca Lunder, mag. far.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	Gluten	1
1.2	Vnetne bolezni črevesja	3
1.2.1	Glutenska enteropatija ali celiakija	3
1.2.2	Kronična vnetna črevesna bolezen	6
1.3	Kultiviranje epitelijskih celic črevesja	9
1.3.1	Vpliv gliadinov na celične kulture	11
1.4	Ozko črevo	12
1.4.1	Struktura in funkcija ozkega črevesa	12
1.4.2	Celice epitelijske plasti ozkega črevesa	14
1.5	Disaharidaze ozkega črevesa	17
1.5.1	Znižana aktivnost disaharidaz	19
1.6	Tkivna transglutaminaza	19
1.6.1	Vloga tkivne transglutaminaze pri celiakiji	20
2	NAMEN DELA	22
3	MATERIALI IN METODE	23
3.1	Materiali	23
3.1.1	Biološki vzorci	23
3.1.2	Laboratorijski pribor	23
3.1.3	Aparature	23
3.2	Reagenti in kemikalije ter priprava delovnih reagentov	24
3.3	Metode	24
3.3.1	Živalski model	24
3.3.2	Statistična metoda za analizo rezultatov	24
3.3.3	Izolacija in shranjevanje humanih epitelijskih celic ozkega črevesa	24
3.3.4	Kultiviranje podganjih in humanih enterocitov	27
3.3.5	Določanje živosti in števila celic med kultiviranjem	28
3.3.6	Določanje aktivnosti maltaze, saharaze in tkivne transglutaminaze v celičnem lizatu	30
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	32
4.1	Kultiviranje primarnih kultur podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa z gliadinskima pentapeptidoma	32
4.1.1	Spremljanje vplivov gliadinskih pentapeptidov p39-43 (P1) in p51-55 (P2) koncentracije 100 µg/mL na podganje enterocite	33
4.1.2	Spremljanje vplivov gliadinskih pentapeptidov p39-43 (P1) in p51-55 (P2) koncentracije 200 µg/mL na podganje enterocite	44
4.2	Kultiviranje primarnih kultur humanih epitelijskih celic dvanajstnika	55
4.2.1	Spremljanje vpliva toksičnega peptida p31-43 (TP) na »zdrave« humane epitelijske celice dvanajstnika	55
4.2.2	Spremljanje vpliva toksičnega peptida p31-43 (TP) na humane epitelijske celice dvanajstnika bolnikov s Crohnovo boleznijo in celiakijo	66
5	SKLEPI	75

6	LITERATURA	77
7	PRILOGA	I

POVZETEK

Razvoj glutenske enteropatije oz. celiakije pri genetsko nagnjenih ljudeh povzroči zaužitje glutena. Raziskovalci se trudijo odkriti tista najkrajša zaporedja gliadinskih peptidov, ki sprožijo bolezen in tudi kakšni so njihovi vplivi.

V prvem delu raziskovalnega dela smo proučevali vplive dveh gliadinskih pentapeptidov p39-43 (P1) in p51-55 (P2) v koncentracijah 100 $\mu\text{g/mL}$ in 200 $\mu\text{g/mL}$ na kulture podganjih enterocitov. Spremljali smo živost in število celic ter encimske aktivnosti maltaze, saharaze in tkivne transglutaminaze (TG2). Ugotovili smo, da nobeden izmed dodanih peptidov pri katerikoli koncentraciji v času 48urnega kultiviranja ni vplival na živost in število celic ter aktivnost maltaze. P1/100 in P2/100 sta po 24h povzročila dvig aktivnosti saharaze, vendar po 48h ni več razlik med kulturami brez in z dodanima peptidoma. P1/200 in P2/200 po 48h kultiviranja znižata aktivnost saharaze, medtem ko v kulturah brez peptida aktivnost naraste. Lahko bi torej rekli, da imata P1 in P2 pri višji koncentraciji negativen vpliv, ki se kaže preko znižanja aktivnosti saharaze, nista pa vplivala na aktivnost TG2. So pa rezultati pokazali, da P1/100 zniža aktivnost TG2, medtem ko jo P2/100 poveča, vendar ne nad vrednostjo »kontrolnih« vzorcev. To pa nakazuje na različen vpliv različnih pentapeptidov.

Ker so v prejšnjih diplomskih nalogah že spremljali učinke toksičnega peptida p31-43 (TP) na mišje in podganje enterocite, smo mi v drugem delu raziskovalnega dela preučevali njegov vpliv na humane enterocite pri koncentraciji 200 $\mu\text{g/mL}$. Ugotovili smo, da TP v kulturah »zdravih« humanih epitelijskih celicah dvanajstnika ni vplival na nobenega izmed spremljanih parametrov (živost, število celic, aktivnost maltaze, saharaze in TG2). Prav tako nismo opazili nobenega vpliva na kulturi celic dvanajstnika bolnikov s Crohnovo boleznijo. Je pa TP pokazal nekakšen vpliv na živost celic, aktivnost saharaze in TG2 v kulturi humanih epitelijskih celic dvanajstnika bolnika s celiakijo, vendar bi za bolj bolj oprijemljivejše zaključke bilo potrebno spremljati večje število »bolnih« vzorcev. Vsekakor pa naši rezultati nakazujejo smiselnost nadaljevanja poskusov na vzorcih ozkega črevesa bolnikov s celiakijo.

Ključne besede: gliadinski pentapeptid, toksičen peptid, kultura podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa, kultura humanih epitelijskih celic dvanajstnika, maltaza, saharaza, tkivna transglutaminaza, živost, število celic

SEZNAM OKRAJŠAV

Ab/Am	antibiotik/antimikotik
APC	antigen predstavitvene celice
Caco-2	celična linija iz humanega adenokarcinoma kolona
CB	Crohnova bolezen (<i>angl.</i> Crohn disease)
CD4	membranski glikoprotein na citotoksičnih limfocitih T
CD8	membranski glikoprotein na celicah T pomagalkah (limfociti T)
DNES	difuzni nevroendokrini sistem
EC	encimski razred (<i>angl.</i> Enzyme Class)
EMA	antiendomizijska protitelesa
F	fenilalanin
G	glicin
Hep-2	celična linija iz humanega karcinoma grla
HLA DQ	humani levkocitni antigen DQ (<i>angl.</i> Human Leukocyte Antigen DQ)
HMW	visoka molekulska masa (<i>angl.</i> High Molecular Weight)
HT-29	celična linija iz humanega adenokarcinoma kolona
IEC	intestinalna epiteljska celična linija
IEL	intraepiteljski limfociti
IFN- γ	interferon γ
IgA/IgG	imunoglobulin A/imunoglobulin G
IL	interlevkin
IU	enota katalitične aktivnosti encima (<i>angl.</i> International Unit)
KVČB	kronična vnetna črevesna bolezen
K562	celična linija iz humane kronične mieloične levkemije
L	levcin
LMW	nizka molekulska masa (<i>angl.</i> Low Molecular Weight)
Lovo	celična linija iz humanega adenokarcinoma kolona
MMPs	matriks metaloproteinaza
NOD	nukleotidni oligomerizirajoči predel
P	prolin
p31-43 TP	sintezni gliadinski peptid H-LGQQQPFPPQQPY-OH*HCl
p39-43 P1	sintezni gliadinski pentapeptid H-PQQPY-OH* HCl
p51-55 P2	sintezni gliadinski pentapeptid H-SQQPY-OH*HCl
Q	glutamin
RPMI	osnovni medij za celične kulture (Roswell Park Memorial Institute)
S	serin
SD	standardna deviacija
TG2	tkivna transglutaminaza 2
Th1/Th2	T celice pomagalke tipa 1/2 (T-helper cell type 1/2)
TNF- α	tumor nekrotizirajoči faktor (<i>angl.</i> Tumor Necrosis Factor)
UK	ulcerozni kolitis
Y	tirozin

1 UVOD

1.1 Gluten

Gluten predstavlja osnovni protein zrnja pšenice, podobne proteine pa najdemo tudi v ječmenu, rži in ovsu. Pri bolnikih s celiakijo gluten povzroči poškodbe sluznice ozkega črevesa in ga je zato potrebno odstraniti iz prehrane (1). Gluten je heterogena mešanica sorodnih, vendar različnih proteinov. V eni vrsti pšenice lahko najdemo do sto molekul glutena. Za vse pa je značilno, da med aminokislinami prevladujeta glutamin (30%) in prolin (15%). Prolin povzroča odpornost glutena na encimsko razgradnjo v prebavni cevi, poveča pa tudi možnost vezave glutena na HLA-DQ.

Glede na topnost v alkoholu gluten delimo na glutenine in gliadine. Gliadinski peptidi so lahko tako imunogeni kot tudi toksični. Imunostimulatorne lastnosti preučujejo v sistemih na osnovi limfocitov in doslej so vsi peptidi, ki so bili imunostimulatorski in vitro, bili toksični in vivo. Vendar pa pomanjkanje stimulatorne sposobnosti in vitro ne more izključiti toksičnega učinka peptida na bolnika. Shranjevalne proteine (prolamini) s podobno aminokislinsko sestavo kot gliadini pšenice so našli tudi v ječmenu, kjer jih poimenujemo hordeini, in v rži pod imenom sekalini. Tudi zanje je značilna podobna sistematika in toksične lastnosti kot za peptide pšenice (2, 3, 4, 5).

Glutenini

Spadajo med največje molekule v naravi in so v alkoholu netopni. Dolgo je prevladovalo mnenje, da glutenini niso vpleteni v patogenezo celiakije. Kasneje pa so raziskovalci ugotovili, da so glutenini podobno imunostimulatorski kot gliadini in da imajo določene podenote gluteninov tudi direktni toksičen učinek na sluznico. Glede na molekulsko maso jih delimo na glutenine z visoko molekulsko maso (HMW) in glutenine z nizko molekulsko maso (LMW). Za HMW podenoto je značilen relativno visok delež glicina in tirozina. 65-70% celotne aminokislinske sestave pa predstavljajo glutamin, prolin in glicin. LMW podenota gluteninov skupaj z α - in γ -gliadini spada med prolamine »bogate z žveplom«, saj vsebujejo aminokislini cistein in metionin, ki vsebujeta žveplo (6).

Gliadini

Glede na mobilnost pri elektroforezi jih delimo na α/β , γ in ω - gliadine. ω gliadinom pravimo tudi »z žveplom revni« prolamini, saj ne vsebujejo cisteina in metionina. Določena aminokislinska zaporedja gliadinov predstavljajo antigen in sprožijo tvorbo protiteles. Raziskovalci se že dolgo trudijo, da bi identificirali tisti del/dele gliadinskih peptidov, ki so odgovorni za razvoj celiakije. Zaenkrat je na vrhu seznama osumljenih α -gliadin, najmanjšega zaporedja aminokislin, ki sproži reakcijo, pa še niso uspeli dokazati (3, 6). Čeprav je imunostimulatornih veliko epitopov glutena, so nekateri bolj aktivni drugi manj. Imunodominanten peptid iz 33 aminokislin (33mer; p57-89), pravijo mu tudi superantigen, so identificirali iz 266 aminokislin dolge α 2- gliadinske komponente. Vsebuje kar šest epitopov in je zelo imunogen (5, 7). Nekateri peptidi pa lahko povzročijo direktne poškodbe sluznice preko prirojenega imunskega odziva. Fragmenta p31-43 in p31-49 α -gliadina se ne vežeta na HLA-DQ2/DQ8 in tako ne stimulirata limfovitev CD4+ T v lamini propriji. V sluznici bolnikov s celiakijo pa povzročita nastajanje IL-15. Prav tako so v kulturi bioptov ugotovili sinergističen učinek, če so poleg p31-43 dodali še drug T celičen stimulatoren glutenski peptid (4, 5).

V različnih in vitro sistemih so preučevali vplive α -, β -, γ - in ω - gliadinskih frakcij, (ne)prebavljenega gliadina, fragmente α -gliadinov ali sintetičnih homologov α -gliadinov z aminokislinskim zaporedjem p31-43, p31-49, p44-55 (njihovi učinki so opisani pri poglavju Vpliv gliadinov na celične kulture). Za vse tri sintetično pridobljene peptide je bila ugotovljena toksičnost in vivo. Sta pa p31-43 in p44-55 zaenkrat edina katerih toksičnost je bila dokazana tako pri bolnikih s celiakijo, na atrofično in zdravljeno sluznico celiakije, kot tudi na fetalne črevesne in nediferencirane celice. Za izražanje njune toksičnosti bi naj bilo bistveno zaporedje -gln-gln-gln-pro in/ali -pro-ser-gln-gln-. Manjši toksičen učinek sta kazala tudi krajša peptida p31-37 in p49-55 (8).

Tabela 1: Primer toksičnih aminokislinskih zaporedij gliadinskih peptidov

p31-43	L-G-Q-Q-Q-P-F-P-P-Q-Q-P-Y
p31-49	L-G-Q-Q-Q-P-F-P-P-Q-Q-P-Y-P-Q-P-Q-P-F
p44-55	P-Q-P-Q-P-F-P-S-Q-Q-P-Y

Q= glutamin, P=prolin, Y=tirozin, F=fenilalanin, L=leucin, G=glicin

1.2 Vnetne bolezni črevesja

1.2.1 Glutenska enteropatija ali celiakija

Celiakija ali glutenska enteropatija je kronična vnetna bolezen ozkega črevesa (predvsem jejunuma, redkeje tudi ileuma), ki jo sproži gluten iz pšenice in sorodni proteini iz ječmena in rži. Za bolezen so značilne lezije ozkega črevesa, ki se kažejo v obliki atrofije resic, hiperplazije kript in kroničnega vnetnega odgovora. Pride do infiltracije z CD8+ citotoksičnimi T celicami (predvsem v epiteliju) in CD4+ T celic pomagalk (predvsem v lamini propriji). Bolezen se razvije pri genetsko dovzetnih ljudeh s prisotnostjo haplotipa HLA-DQ2, redkeje haplotipa HLA-DQ8 (12, 53). HLA geni se nahajajo na COELIAC1 lokusu na kromosomu 6p21 in raziskovalci ocenjujejo, da mu pripada 53% genskega učinka pri celiakiji. Približno 1/3 populacije nosi DQ2, vendar le eden od 20-30 DQ2-pozitivnih posameznikov razvije bolezen. Pri monozigotnih dvojčkih je razmerje skladnosti okrog 80%. Prisotnost HLA-DQ2/DQ8 je nujna za razvoj celiakije, ni pa to zadosten pogoj. V razvoj celiakije so torej vpletene tudi »ne-HLA« regije (5,7). Poleg genskih dejavnikov pa k razvoju celiakije pripomore tudi zgodnje uvajanje glutena v prehrano dojenčkov, zgodnje okužbe z enteropatičnimi virusi ali sprememba bakterijske flore (10).

Celiakija se lahko pojavi že v otroštvu med 6. in 18. mesecem starosti, ali pa šele v odrasli dobi. Zakaj se pri nekaterih pojavi šele v odrasli dobi, še ne razumemo popolnoma. Domnevajo pa, da je vzrok močna obremenitev z glutenom in povečana prepustnost sluznice prebavnega trakta, ki se pojavlja ob vnetjih prebavil (11). Klasična oblika celiakije z drisko in malabsorbcijo je postala relativno redka. Njena razširjenost v razvitih delih sveta je 1 na 2000 do 1 na 10 000. Atipična, oligosimptomatska ali celo asimptomatska oblika z različnimi stopnjami sploščitve črevesnih resic so pogostejše, njihova razširjenost pa je 1 na 200 v Evropi in ZDA. Veliko skrb predstavljajo predvsem oligosimptomatski ali asimptomatski bolniki, saj je pri njih povečano tveganje za razvoj sekundarnih avtoimunih bolezni, gastrointestinalnega in hematološkega (krvnega) raka (7).

Doslej edino učinkovito zdravljenje je stroga in vseživljenjska brezglutenska dieta, vendar je izboljšano razumevanje molekularnih osnov celiakije omogočilo iskanje alternativ dieti brez glutena. Glaven cilj novih terapij je zaščititi bolnika pred majhnimi, nenamernimi in tudi neizogibnimi vnosi glutena. Prav tako bi s tem bilo omogočeno zdravljenje refraktorne celiakije. Primeri novih načinov zdravljenja so prehranjevanje z družinami pšenic z nizko imunogenostjo, predobdelava moke z določenimi laktobacili, uporaba antagonist

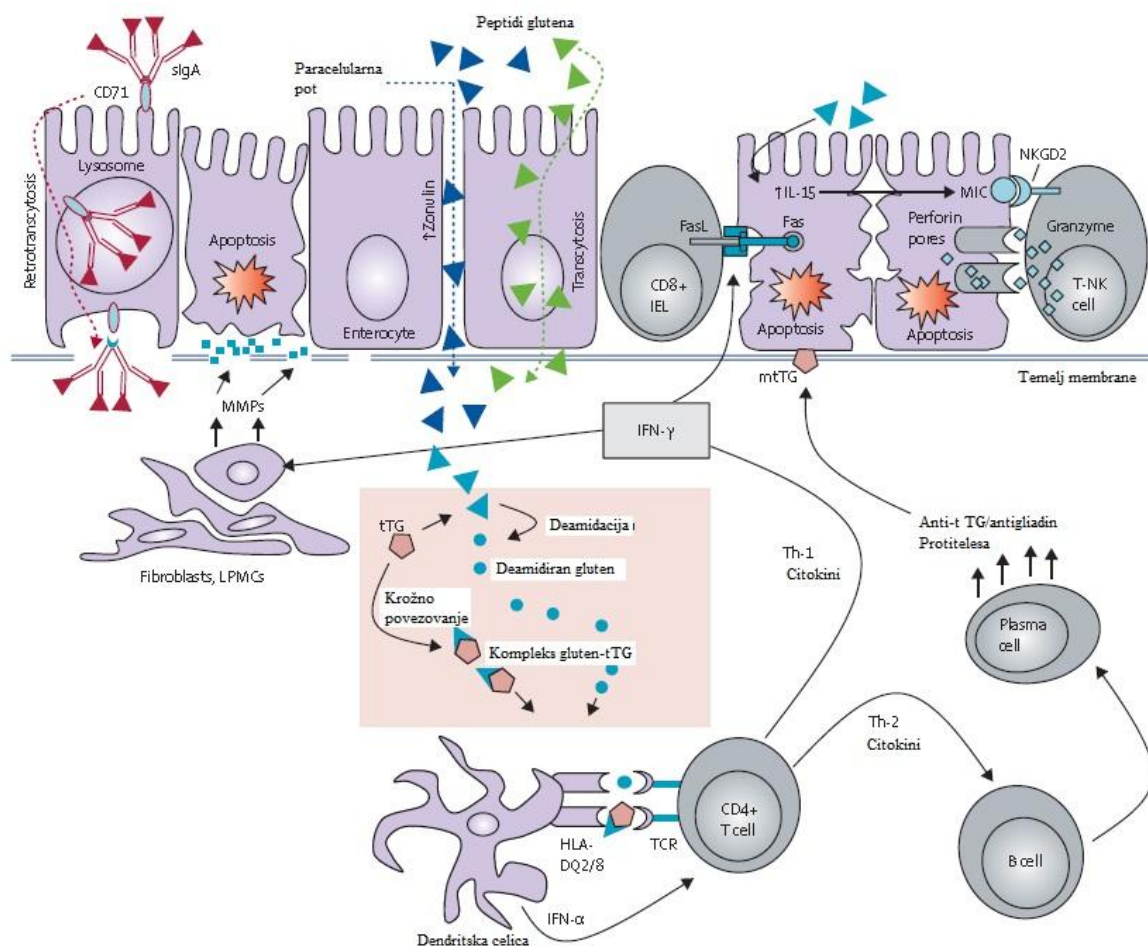
zonulinskega receptorja AT-1001,... (5, 10). Odkritje, da nekateri mikroorganizmi izražajo encim prolil endopeptidazo, ki lahko prebavi s prolinom bogate glutenske peptide, je predlagalo nov način zdravljenja celiakije. Vendar je ta encimska terapija še v fazah razvoja, saj se tudi tukaj pojavljajo nekatere omejitve (10).

Patofiziologija

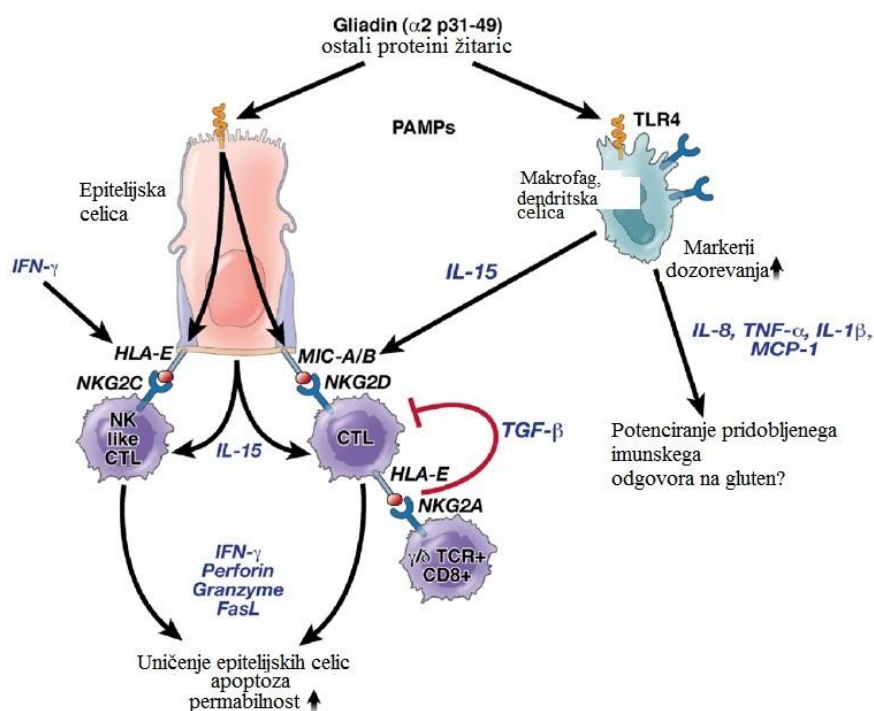
V patogenezo celiakije so vpleteni okoljski, genetski in imunološki dejavniki. Ker gliadini, glutenini, hordeini in sekalini vsebujejo velik delež prolina, so ti proteini odporni na prebavo z želodčnimi in pankreatičnimi encimi ter encimi ščetkaste membrane črevesa, saj jim primanjkuje prolil endopeptidazne aktivnosti. To lahko povzroči nabiranje relativno dolgih peptidnih fragmentov z visoko vsebnostjo prolina in glutamina v ozkem črevesu. Vendar okrnjena prebava teh proteinov ni dovolj za razvoj celiakije in glede tega ni nobene znane razlike med zdravimi posamezniki in tistimi, ki so dovzetni za razvoj celiakije (9). Sicer pa gluten in sorodni proteini sprožijo tako prirojen kot pridobljen imunski odziv. Začetni dogodek v patogenezi celiakije je verjetno abnormalna prepustnost sluznice ozkega črevesa, ki omogoči prehod nerazgrajenim peptidom glutena. Črevesno prepustnost bi naj povečali nekateri stresni faktorji, npr. infekcije prebavil, prirojen imunski odziv na gluten... Nerazgrajeni peptidi glutena lahko prečkajo epitelij paracelularno, s transcitozo ali retrotranscitozo. Paracelularno pot omogoča povečano sproščanje zonulina- proteina, ki je vpleten v odprtje tesnih stikov.

Pri bolnikih s celiakijo je povečana ekspresija in aktivacija tkivne transglutaminaze (TG2). Ta encim v glutenu povzroči deamidacijo glutamina v glutaminsko kislino, zaradi česar postanejo glutenski peptidi negativno nabiti in tako primernejši za vezavo na HLA-DQ2/DQ8 kompleks, ki se nahaja na antigen predstavitevni celici (APC; makrofagi, dendrične celice in limfociti B). Encimska aktivnost TG2 lahko omogoči kovalentno povezavo glutenskih peptidov z TG2 ali ostalimi proteini. Deamidirani glutenski peptidi so torej preko HLA-DQ2/DQ8 na APC predstavljeni limfocitom CD4+ T, kar povzroči njihovo aktivacijo. Aktivirani limfociti CD4+ T izločajo Th1 in Th2 citokine. Med Th1 citokini prevladuje IFN- γ , ki povzroči izločanje matriks metaloproteinaz (MMPs) iz fibroblastov in moononuklearnih celic lamine proprije. MMPs razgradi ekstracelularni matriks in temelje membrane. IFN- γ tudi poveča citotoksičnost intraepitelijskih limfocitov (IEL) ali celic naravnih ubijalk. Le-te pospešijo apoptozo enterocitov z Fas/FasL sistemom, IL-15 pa sproži apoptozo enterocitov preko perforin-grancim in NKG2D-MIC

poti. FasL je ligand oz. molekula vezana na celično površino, ki pripada družini tumor nekrozirajočih faktorjev. Veže se na svoj receptor Fas, kar sproži apoptozo celic, ki imajo vezan receptor Fas. Stres ali poškodba sproži ekspresijo receptorja Fas na enterocitih in tako le ti postanejo tarča ubijalskih limfocitov, ki izražajo ligand FasL. Aktivirane dendritske celice izločajo IFN- α , ki prav tako spodbudi limfocite CD4+ T, da producirajo IFN- γ . Preko Th-2 citokinov pa limfociti CD4+ T sprožijo aktivacijo in klonalno širjenje limfocitov B, ki diferencirajo v plazmatke. Te tvorijo anti gliadinska in TG2 protitelesa. Protitelesa TG2, ki so odložena v temelje membrane, lahko z interakcijo ekstracelularno vezane TG2 povzročijo spremembo citoskeleta enterocitov z ponovno razdelitvijo aktina, kar posledično sproži poškodbo epitelijske celičnice (5, 13).



Slika 1: Mehanizem poškodb sluznice pri celiakiji



Slika 2: Prirojen imunski odziv pri celiakiji

Gliadinska peptida p31-49 in p31-43 ter ostali proteini žitaric lahko sprožijo tudi prirojen imunski odziv. Ti peptidi stimulirajo epiteljske celice, makrofage in dendritske celice k izločanju IL-15. Končna posledica prirojenega imunskega odziva pa je apoptoza epiteljskih celic, povečana prepustnost črevesne sluznice, izločanje citokinov... Zgoraj omenjena in nekateri ostali peptidi pa lahko izzovejo tudi direkten prirojen imunski odziv, saj jih prepoznajo tako imenovani PRR receptorji na makrofagih in dendritskih celicah. To prav tako sproži izločanje IL-15 in tudi ostalih citokinov IL-1 β , IL-8, TNF- α ..., ki lahko okrepijo pridobljen imunski odziv na gluten (7, 10).

1.2.2 Kronična vnetna črevesna bolezen

Ulcerozni kolitis (UK) in Crohnova bolezen (CB) sta kronični vnetni črevesni bolezni (KVČB) neznane etiologije in bolnike spremljata skozi celo življenje. Zanju je značilen kroničen potek bolezni z možnimi pogostimi zagoni in vmesnimi različno dolgimi remisijami. Etiologija in patogeneza KVČB še vedno nista popolnoma jasni. Število bolnikov pa z leti narašča, predvsem pogostnost CB se je v zadnjih 20 letih povečala za 2- do 3-krat. Prevladuje mnenje, da je za razširjeno vnetje črevesne sluznice odgovorna motnja v delovanju lokalnega (sluzničnega) imunskega sistema, ki se pretirano odzove na

normalno neškodljivo črevesno floro. Študije potrjujejo domneve, da so v razvoj in potek KVČB vpleteni tako genetski dejavniki, dejavniki iz okolja, predvsem pa motnja v uravnavanju imunskega odziva in motnje v prepustnosti sluznice (12, 14).

Genski vzrok bolezni razlagajo s pogostejšimi pojavi KVČB med določenimi sorodniki, stopnja skladnosti za CB med monozigotnimi dvojčki pa je 30% do 50%. Čeprav so genetski dejavniki pomembni za nastanek bolezni, pa za bolezen krivega gena še niso našli. Genomske študije bolnikov so pokazale vpletenost lokusov na kromosomih 3, 7, 12 in 16. Predvsem pomembno je odkritje IBD1 lokusa na kromosomu 16. Produkt vpletenega gena NOD2 aktivira nuklearni faktor kappa B v makrofagih kot odgovor na bakterijske lipopolisaharide in na tak način je vpleten v uravnavanje imunskega vnetnega odgovora. Obe CB in UK sta povezani z aleli glavnega histokompatibilnostnega kompleksa razreda II. UK je povezan z HLA-DR2, medtem ko je CB verjetno povezana z aleli HLA-DR1 in HLA-DQw5. To tudi nakazuje, da sta bolezni genetsko različni (14, 15). Moten je tudi imunski odziv na običajno črevesno floro s posledično proliferacijo limfocitov. Pri bolnikih s KVČB so ugotovili zvišan titer protiteles IgG, npr. antinevtrofilna citoplazemska protitelesa so našli pri nekaterih bolnikih z UK. Pri CB pa so pokazali, da povečana prepustnost črevesne sluznice omogoča vstop toksinom in antigenom ter s tem zmanjšuje obrambno sposobnost organizma. Aktivirani limfociti izločajo citokine, ki imajo pomembno vlogo pri uravnavanju vnetnega dogajanja v črevesni sluznici (14, 15).

Z raziskavami so pokazali, da kajenje poveča tveganje za razvoj CB. Vpliv različnih bakterij na KVČB še ni razložen, lahko pa bi predstavljale antigeni sprožilec. Tudi antigeni v hrani lahko sprožijo vnetne spremembe pri bolnikih s KVČB (14, 15).

Ker sta UK in CB kronični bolezni zahtevata dolgotrajno zdravljenje. Konvencionalno farmakološko zdravljenje s protivnetnimi učinkovinami je dopolnjeno s posebno dieto, ki bi naj omejevala nastop sekundarnih zapletov, npr. osteoporozo. Osnovni cilj farmakološkega zdravljenja je omejiti in odpraviti akutne vnetne zaplete in kasneje vzdrževati stanje remisije. Običajno se uporabljajo zdravila s protivnetnimi in imunosupresivnimi učinki. Zaradi omejene uspešnosti konvencionalnih terapevtskih pristopov je v zadnjem desetletju prišlo do razvoja novejših in varnejših bioloških učinkovin (16).

UK in CB se med seboj razlikujeta glede na klinični potek bolezni, histološko sliko bioptov ali operativnega materiala. Pri več kot 10% bolnikov histološka slika ni značilna za

nobeno od bolezni in takrat govorimo o intermediarnem sindromu, ki pa se kasneje prevesi v eno izmed bolezni (14).

Ulcerozni kolitis

V Evropi je incidenca UK višja kot CB. Njegova incidenca je 3-15 bolnikov na 100.000 prebivalcev, prevalenca pa 50-80. Bolezen se lahko pojavi pri katerikoli starosti, največkrat pa med 20. in 25. letom. Ponavadi prizadene le široko črevo in vedno je prizadet rektum. Bolezen pogosto spremljajo sluzaste driske s krvavenjem, bolečine v trebuhu. Kadar je prizadet kratek segment črevesa sta število odvajanj in krvavitev manjši, sistemski zapleti in vročina pa redkejši. Pri prizadetosti vsaj polovice ali celega širokega črevesa pa so zagoni običajno hudi z obilnimi krvavitvami, splošno prizadetostjo in vročino. Hitro se pojavi anemija, hipoalbuminemija, hujšanje, parametri vnetja so visoki. Po 10-ih do 15-ih letih pri bolnikih z UK lahko pride do nastanka raka črevesa, zato je potrebna redna kontrola bolnikov z endoskopijo (12, 14, 15).

Crohnova bolezen

Incidenca je 1-10 bolnikov na 100.000 prebivalcev, prevalenca pa 20-100. Bolezen lahko zajame katerikoli del prebavne cevi od ustne votline do anusa, redkeje tudi izven prebavne cevi. Najpogosteje sta prizadeta terminalni ileum in/ali široko črevo. Pri bolnikih s prizadetostjo ozkega črevesa večkrat opazamo zožitve črevesa in oviran prehod vsebine, medtem ko se pri CB debelega črevesa pojavlja krvava driska. V nasprotju z UK vnetje zajame vse sloje črevesne stene. Napredovanje bolezni lahko vodi do ulceracij, fisur in fistul med samimi črevesnimi vijugami oz. med svetlino vnetega črevesa ter organi v okolici. Kljub težkemu poteku in kroničnosti pa je maligna preobrazba redka. Kadar sta prizadeta jejunum in ileum sta oslabljeni prebavna in absorpcijska funkcija črevesa, kar vodi do številnih problemov- pomanjkanje disaharidaz, kronične izgube krvi, limfatične obstrukcije, pomanjkanje vitamina B12 in folatov... (12, 14, 15, 17).

Med kronično vnetno boleznijo in celiakijo obstaja nekaj podobnosti, predvsem povečan vnetni odgovor. Z različnimi študijami so ugotavljali njihovo povezanost. Pri eni so ocenjevali prevalenco CB in UK pri bolnikih s celiakijo in njihovimi sorodniki. Zaključili so, da so bolniki s celiakijo in njihovi sorodniki bolj nagnjeni k razvoju CB (18). Cilj druge študije pa je bil oceniti prevalenco celiakije med bolniki s KVČB in obratno oceniti prevalenco KVČB med bolniki s celiakijo. Ugotovili so, da je prevalenca KVČB 10krat

povečana pri bolnikih s celiakijo, medtem ko je prevalenca celiakije pri bolnikih s KVČB primerljiva s tisto pri kontrolah (19). Prav tako so pri bolnikih s KVČB zaznali rahlo povišano vrednost anti-tTG protiteles in ugotovili, da so povezana z aktivnostjo bolezni. EMA protitelesa pa so našli le pri bolnikih s celiakijo. Te značilnosti poudarjajo dejstvo, da je pri postavitvi diagnoze celiakije poleg določanja anti-tTG protiteles, potrebno določiti tudi EMA-protitelesa, predvsem pri bolnikih z znano KVČB. Zaključki posameznih študij se ponekod rahlo razlikujejo, zato je potreba po novih raziskavah zelo velika (20).

1.3 Kultiviranje epiteljskih celic črevesja

Do razvoja in vitro modelov epiteljskih celic črevesja je prišlo zaradi želje po preučevanju celične diferenciacije, interakcij med celicami, patofizioloških procesov, učinkov zdravil... Leta 1969 sta Browning in Trier uspela dobiti organsko kulturo iz bioptov sluznice ozkega črevesa človeka, ki je 24 ur ohranila morfološke in funkcionalne lastnosti ter nadaljevala svojo celično proliferacijo. V predhodnih poskusih je do nekroze epiteljskih celic prišlo že v 2 do 3 urah, njima pa je uspelo pri 37°C, 95% O₂ in 5% CO₂, obdržati organsko kulturo dlje časa (21). Bila sta tudi prva, ki sta svojo metodo uporabila pri kultiviranju sluznice ozkega črevesa s celiakijo in ugotovila, da se le-ta v kulturi brez glutena normalizira že po 24 urah (22). Nekoliko prilagojeno Browning-Trierjevo metodo so uporabili tudi za kultiviranje tkiva ozkega črevesa različnih živalskih vrst. Lukač-Bajalo in sod. so leta 1987 z modificirano Browning-Trierjevo metodo uspešno kultivirali podganje ozko črevo (23, 24). Svojo integriteto in funkcijo je tkivo ozkega črevesa ohranilo ves čas kultiviranja (48ur), predvsem na račun boljše oksigenacije tkiva. Modificirano Browning-Trierjevo metodo so v nadaljnih poskusih še malo prilagodili in uspelo jim je razviti dolgoživo primarno kulturo mišjih in podganjih epiteljskih celic ozkega črevesa. Tekom kultiviranja so s spremljanjem specifičnih celičnih markerjev (maltaza, saharaza, mucin, lizocim, kromogranin A) v kulturi podganjih epiteljskih celic identificirali vse 4 vrste epiteljskih celic ozkega črevesa: enterocite, čašaste celice, Panethove celice in enteroendokrine celice (73, 74). Ker jim je uspelo ohraniti kulturo podganjih epiteljskih celic skozi pet tedensko kultiviranje, to pomeni, da so izolirali tudi izvirne ali vsaj prehodne celice (83). Oba modela bi se lahko uporabljala za študij kroničnih črevesnih bolezni, učinkov gliadinskih peptidov in predlaganih zdravilnih učinkovin (75). S spremljanjem aktivnosti maltaze,

saharaze in TG2 so že preučevali vplive gliadinskih peptidov p2-11 in p31-43 (76). Po začetnem uvajanju tkivnih in organskih kultur je prišlo torej do razvoja kultur epitelijskih celic ozkega črevesa. Procese diferenciacije in druge značilnosti epitelijskih celic ozkega črevesa je mogoče opazovati na:

- Primarni kulturi dobljeni iz črevesja embrija (zarodka), katere čas preživetja je bil zelo omejen. Z razvojem epitelijsko-mezenhimske ko-kulture pa jim je uspelo doseči daljše preživetje (2-3 tedne), celice so se tudi morfološko in funkcionalno diferencirale. Hkrati je prišlo tudi do diferenciacije v enterocite in čašaste celice.
- Trajnih celičnih linijah epitelijskega črevesja dobljenih iz transgenih miši ali z virusno infekcijo primarnih celičnih kultur.
- Celičnih linijah tumorskega izvora, katerih večina se pod normalnim celičnimi pogoji ne diferencira. Nato so ugotovili, da se pri določenih pogojih te celične linije lahko diferencirajo in kažejo značilnosti zrelih črevesnih celic npr. enterocitov in čašastih celic. Najbolje poznane celične linije so Caco-2, HT-29 in HRA-19. **Caco-2** celično linijo dobimo iz človeškega adenokarcinoma kolona. V kulturi tvorijo monoplast celic povezanih s tesnimi stiki, kažejo dobro razvite apikalne mikroviluse in spontano diferencirajo do enterocitov. Caco-2 celična linija je eden najbolj priljubljenih in vitro modelov. Z njim lahko hitro ocenimo celično permeabilnost kandidatnih zdravilnih učinkovin, pojasnimo način transporta učinkovin, ocenimo toksikološke učinke... (26). Nekateri raziskovalci so poročali, da imajo Caco-2 celice, glede na epitelij človeka, nizko paracelularno permeabilnost in dopuščajo vstop visoko difuznim majhnim molekulam do mikrovilusov, zaradi pomanjkanja ustrezne sluznične plasti. Z nastankom ko-kulture sestavljene iz Caco-2 in HT29-5M21 so uspeli doseči zmanjšanje permeabilnosti makromolekul in povečano paracelularno permeabilnost, podobno situaciji in vivo. Takšen model bi se lahko uporabljal pri preučevanju nekaterih bolezni, kjer pride do spremenjene permeabilnosti, kot pri celiakiji (27).
- Nespremenjenih celičnih linijah črevesnega epitelijskega črevesja, Quarani je leta 1979 prvi razvil dalj časa živečo epitelijsko celično kulturo dobljeno iz črevesja podgan in jo poimenoval IEC. Te celice dosežejo diferenciacijo, če jim omogočimo nastanek epitelijsko-mezenhimske interakcije v kombinaciji z dodanimi snovmi. Zanimivo pa je, da so z elektronskim mikroskopom identificirali vse 4 celične tipe črevesja (28, 29).

Rezultate dobljene iz raziskav, kjer so uporabili celične kulture poskusnih živali in človeškega raka kolona je potrebno previdno interpretirati. Omejitev celičnih linij človeškega raka kolona je namreč njegov izvor iz kolona in njihova kancerogena narava. Tudi zaključke dobljene iz modelov poskusnih živali zaradi razlik s človekom ne moremo zmeraj neposredno prenesti na stanje pri ljudeh (25).

1.3.1 Vpliv gliadinov na celične kulture

O patologiji celiakije je sicer že veliko znanega, vendar pa malo vemo o njeni zgodnji fazi, ko gliadin sproži ves proces. Zato so njegove vplive preučevali na različnih celičnih kulturah oz. linijah: Hep-2 (karcinom grla), MRC-5 (pljučni fibroblasti embrija človeka), Intestine-407 (črevesne celice embrija), IEC-6, Lovo (karcinom kolona), Caco-2. Zaradi povečane občutljivosti nekaterih celičnih linij (Hep-2, Lovo) in razlik med njimi ter uporabe različnih proteinov se rezultati nekaterih raziskav razlikujejo. Vseeno so prišli do ugotovitev, da gliadini vplivajo na *morfologijo*, *citoskelet* (rezultati nekaterih študij se tukaj razlikujejo- kljub temu so zaključili, da gliadini interagirajo s površinskimi receptorji, kar sproži sproščanje zonulina s posledično preureditvijo F aktina in tesnih stikov, to pa poveča tkivno permeabilnost), *rast in živost celic* (p31-43 in p44-55 jo inhibirata), *apoptozo*, *aglutinacijsko aktivnost* (aglutinacijo K562 je lahko preprečil 1157.5 Da peptid iz 10 aminokislin in njegovi derivati (27)), *celični metabolizem*, porušili so tudi *oksidativno ravnotežje* (znižanje glutaciona, povečana lipidna peroksidacija... isto metabolično stanje bi naj bilo vpleteno v razvoj številnih gastrointestinalnih bolezni npr. KVČB, opazili so ga tudi pri eritrocitih bolnikov s celiakijo) (30).

Vsi ti rezultatu kažejo, da imajo gliadini poleg imunološkega učinka tudi direkten škodljiv učinek na enterocite. Njihovo toksičnost so potrdili tudi z organskimi (celičnimi) kulturami bioptov ozkega črevesa človeka. Na sluznico jejunuma dobljeno iz zdravih posameznikov prisotnost gliadina ni vplivala. Če so sluznico jejunuma posameznikov z aktivno enteropatijo kultivirali v mediju brez gliadina je prišlo do morfološkega in biokemičnega izboljšanja, to pa se ni zgodilo ob prisotnosti toksičnih proteinov in gliadinov (8, 30).

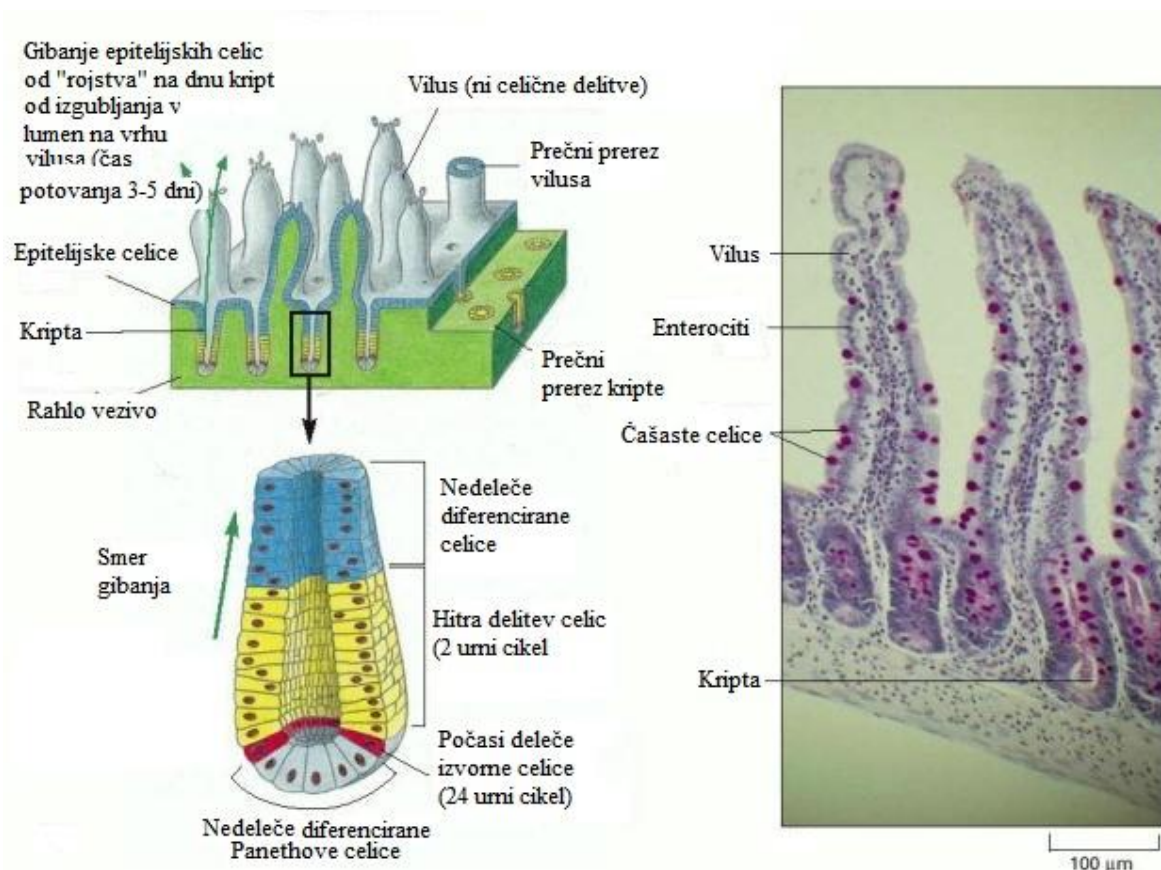
V nedavni raziskavi so vrsto črevesnih limfocitov T dobljeno iz bolnikov s celiakijo inkubirali z gliadinskimi peptidi in dekapeptidom (p10mer; QQPQDAVQPF) dobljenim iz durum pšenice. Ugotovili so, da je p10mer zmanjšal proliferacijo limfocitov in sproščanje IFN- γ , sproženo z deamidiranimi peptidi, in hkrati stabiliziral sproščanje IL-10, ki deluje protivnetno. V in vitro pogojih torej p10mer kaže sposobnost premika imunskega odziva iz

Th1 v Th2 tip in bi se zato lahko uporabljal za zdravljenje Th1 avtoimunih bolezni npr. sladkorna bolezen tip1, revmatoidni artritis in psoriaza, ki so pogosto povezane s celiakijo. Ugotovili so tudi, da sta asparaginska kislina na 5.mestu in alanin na 6.mestu ključni za imunomodulatorni učinek preiskovanega dekapeptida (31).

1.4 Ozko črevo

1.4.1 Struktura in funkcija ozkega črevesa

Ozko črevo obsega 2/3 dolžine prebavne cevi in je pri odraslem človeku dolgo 6-7 metrov, kar omogoča podaljšan stik med hrano in prebavnimi encimi. Prvih trideset centimetrov predstavlja dvanajstnik (duodenum), preostalih 6 metrov pa tešče črevo (jejunum, 2,5m) in vito črevo (ileum, 3,5m). Funkcije ozkega črevesa so: 1) končna prebava hrane pod vplivom pankreatičnih in črevesnih encimov, ki razgrajujejo ogljikove hidrate, beljakovine in maščobe, 2) selektivna absorbcija hranil, vode in vitaminov, 3) prehod neabsorbiranih hranil vzdolž prebavnega trakta. Najpomembnejša funkcija ozkega črevesa je absorbcija in da je ta čim bolj učinkovita je površina ozkega črevesa močno povečana. Črevesne resice (villi intestinales), ki so podaljški enoskladnega visokoprizmatskega epitelija in lamine proprije, povečajo površino ozkega črevesa za 10-krat. V osrednjem prostoru vsakega vilusa najdemo limfno kapilaro (lacteal), ki izvira kot slepa kapilara in se nato izliva v večje limfatične žile submukoze (32). Vsak vilus vsebuje dodatno skupino izboklin imenovanih mikrovilusi, ki pa absorpcijsko površino ozkega črevesa povečajo za 20-krat. Krožne ali Kerkringove gube jo povečajo za 3-krat, črevesne žleze ali Lieberkühnovne kripte pa za 10-krat (33, 34, 35). Podganje ozko črevo je dolgo 107-122 cm odvisno od njihove starosti. Sestavljeno je iz enakih segmentov kot pri človeku, le da pri njih jejunum, ki je sestavljen iz vencu podobne zanke, predstavlja najdaljši del črevesa. Za razliko od človeka podgane nimajo žolčnika, imajo pa vrečasto razširjen slepič, kjer se nahajajo bakterije, ki so sposobne prebaviti celulozo (45, 46).



Slika 3: Lumen ozkega črevesa

Stena ozkega črevesa je zgrajena iz sluznice (mukoza), podsluznice (submukoza), mišične plasti in seroze. Sluznica ozkega črevesa je sestavljena iz epitelijske plasti, lamine proprije in lastne tanke mišične plasti. Epitelijsko plast tvori enoskladen visokoprizmatški epitelij, v katerem najdemo več vrst celic: enterocite, čašaste celice, Panethove celice, enteroendokrine celice, nediferencirane celice in celice M. Znotraj epitelijske plasti najdemo tudi limfocite (intraepitelijski limfociti IEL). Lamina proprija je med črevesnimi resicami in Lieberkühnovimi kriptami. Tvori jo rahlo vezivo z limfociti T in B (oblikujejo limfatične folikle), fibroblasti, tkivni bazofilci, plazmatke, histiociti, gladka mišičnina, žile in živci. Limfatični folikli se proti ileumu večajo in zbirajo v združene limfatične folikle Peyerjeve plošče, ki lahko segajo tudi v podsluznico. Mišično plast sluznice tvori notranja krožna ter zunanja vzdolžna plast gladke mišičnine. Podsluznica ozkega črevesa vsebuje fibroelastično vezivo, histiocite, limfocite, plazmatke, tkivne bazofilce, krvne in limfne žile, živce ter vegetativni submukozni (Meissnerjev) živčni pletež (33). V podsluznici dvanajstnika najdemo Brunnerjeve žleze, ki so razvejane, zvite in cevaste oblike.

Izločajo nevtralni mucin in urogastrin. Izloček Brunnerjevih žlez varuje proksimalno ozko črevo, tako da nevtralizira kislino vsebino iz želodca, hkrati pa vsebini v ozkem črevesu daje takšen pH, ki je optimalen za delovanje pankreatičnih prebavnih encimov. Za podsluznico jejunuma so značilne krožne oz. Kerkringove gube. Najdemo jih tudi v duodenumu in ileumu, vendar tam niso tako velike in nimajo tako značilnih oblik (36). Mišični sloj ozkega črevesa je sestavljen iz notranje krožne plasti in zunanje vzdolžne plasti gladkih mišičnih celic. Med obema slojema leži avtonomni Auerbachov pletež. V ozkem črevesu imamo dva tipa kontrakcij segmentacijo in peristaltiko (32, 33). Seroza pokriva celotno ozko črevo, izjema je spodnja tretjina dvanajstnika, ki ga pokriva adventicija (33).

Tudi stena ozkega črevesa podgan je sestavljena iz enakih plasti: sluznice, podsluznice, gladkih mišic in seroze. Njihove histološke značilnosti so podobne kot pri človeku. Tudi v epiteliju podgan najdemo vse 4 vrste diferenciranih celic, ki imajo enake lastnosti kot pri ljudeh (45).

1.4.2 Celice epiteljske plasti ozkega črevesa

Enterocite imenujemo tudi črevesne absorpcijske celice, vendar absorpcija ni njihova edina funkcija. So visoko stebričaste celice z bazalno ležečim jedrom in imajo dva funkcionalna različna predela celične membrane- apikalno in bazolateralno. Na svoji površini (apikalni del) vsebujejo številne vzporedne mikroviluse, ki so pod svetlobnim mikroskopom videti kot ščetkast obrobek. V krtačastem robu apikalne membrane se nahajajo poglaviti sluznični prebavni encimi- disaharidaze, aminopeptidaze, lipaze in alkalna fosfataza ter številne beljakovine, ki sestavljajo membranske črpalke, prenašalce ter ionske in vodne kanalčke in omogočajo transport hranil, ionov, vode in zdravil (34). Funkcionalne skupine prebavnih encimov, ki so zasidrani na plazemski membrani, štrlijo v zunanost in ob takšni razporeditvi so končni produkti prebave blizu strani, kjer poteka njihova absorpcija (32). Aminokislina in monosaharidi se absorbirajo z aktivnim transportom, monogliceridi in maščobne kisline pa prehajajo preko membrane mikrovilusov pasivno (36). Absorbirane snovi vstopijo bodisi skozi kapilare v lamini propriji tik pod epitelijem ali skozi imfne kapilare-lacteale (36). Apikalno membrano in bazolateralno membrano ločujejo tesni stiki, ki dovoljujejo prehod vode in ionov ter skrbijo za učinkovito mehansko obrambo pred vstopom makromolekul. Enterociti izločajo tudi beta defenzine, ki služijo kot obramba pred mikrobi, njihovo izražanje pa se poveča ob okužbi in vnetju (34). Na bazolateralni membrani so receptorji za rastne faktorje,

imunoglobuline, hormone, peptide in nevrottransmitterje ter ionske črpalke. Enterociti kot nediferencirane celice nastajajo znotraj kripte na dnu vilusa, nato se pomikajo proti vrhu in medtem dozorevajo. Na vrhu vilusa enterociti umrejo in odplavajo v črevo (37). Življenjska doba enterocitov je približno 5-6 dni (37). Enterociti podgan so kubične do nizko stebričaste epiteljske celice, ki so s sosednjimi celicami povezane preko tesnih stikov. Tudi na njihovi apikalni površini najdemo mikroviluse, ki dajejo videz ščetkaste površine, na njej pa se nahajajo encimi hidrolaze. Življenjska doba podganjih enterocitov je 1-1,5 dni (47, 48).

Čašaste celice so druga najpogostejša vrsta celic vrinjena med ostale tipe celic. Njihovo število se povečuje proti ileumu. Izločajo nevtralni in kisli mucin, ki se nahaja v številnih zrnih v zgornjem delu celice in ima zaščitno vlogo. Ko izločijo mucinogen, odmrejo in propadejo. Njihova življenjska doba je 5-6 dni (33, 36).

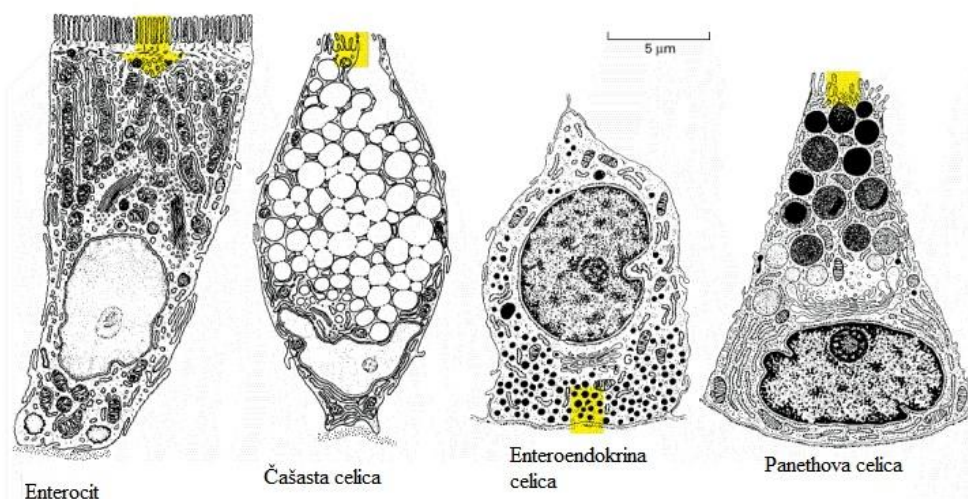
Panethove celice so eksokrine celice na dnu Lieberkühnovih kript. Vsebujejo dobro organizirane in številne zrnate endoplazmatske retikulume, dobro razvit Golgijev aparat in številne sekretorne granule v apikalnem delu citoplazme, ki se barvajo z eozinom in na tak način lahko identificiramo Panethove celice. Granule vsebujejo encim lizocim, ki prebavlja zaščitno celično steno določenih skupin bakterij. Panethove celice lahko celo fagocitirajo določene bakterije. Lizocimska in fagocitna aktivnost sta pripeljali do zaključka, da Panethove celice uravnavajo mikrobno floro črevesja. Zaradi njihove lege na dnu Lieberkühnovih kript in njihovega izločanja rastnih faktorjev in ostalih regulatornih molekul predvidevajo, da Panethove celice regulirajo proliferacijske in diferenciacijske programe ostalih celičnih linij. Njihova življenjska doba je približno štiri tedne (32, 33, 36, 38).

Enteroendokrine celice (DNES) najpogosteje najdemo v nižjih delih kript, lahko pa se nahajajo v vseh plasteh epitelija. Predstavljajo 1% celic epitelija sluznice. Njihovi najpogostejši produkti so: holecistokinin, ki stimulira sekrecijo pankreatičnih encimov in krčenje žolčnika; sekretin, stimulira izločanje bikarbonata iz trebušne slinavke in žolčnika; гастриčni inhibitorni peptid (GIP), ki zavira izločanje želodčne kisline (33, 36).

M celice so specializirane epitelne celice, ki prekrivajo limfatične Peyerjeve plošče. Njihova struktura in funkcija je specializirana za transepiteljski transport, dostavo tujih antigenov in mikroorganizmov limfatičnemu tkivu znotraj mukoze ozkega in širokega črevesa, mandljev, dihal in tako stimulirajo mukozno imunost. Za razliko od ostalih celic so M celice lažje dostopne antigenom iz lumna črevesa, da potujejo skozi Peyerjeve

plošče, saj ne izločajo mukusa ali prebavnih encimov, prav tako je ščetkasta površina glikokaliksa na M celicah veliko tanjša ali celo odsotna (39, 40).

Matične ali izvorne celice so nediferencirane in jih najdemo le na dnu kripta. Iz njih nastanejo vse ostale vrste celic (36). Poleg izvornih celic obstajajo tudi prehodne deleče se celice, ki imajo z njimi nekatere skupne lastnosti (83).



Slika 4: Vrste diferenciranih epitelijskih celic ozkega črevesa

Epitelij črevesja je klasično samoobnovitveno tkivo podobno kot hematopoetski sistem in koža. Hitrost njegove obnovitve je zelo velika, saj se v enem tednu popolnoma obnovi in zamenja. V enem dnevu bi naj nastalo $200 \cdot 10^6$ epitelijskih celic. Ta ogromna številka zahteva mehanizme, ki natančno uravnavajo nastajanje celic, proliferacijo, migracijo in celično smrt, zato da vzdržujejo homeostazo črevesa (46, 42). Pri podganah se črevesni epitelij obnovi vsake 3-4 dni (47).

Izvorne celice v kriptah se delijo do hčerinskih celic, pri čemer se ena hčerinska celica ohrani kot izvorna celica, druga pa se diferencira v enterocit, enteroendokrino, čašasto ali Panethovo celico. Po nastanku hčerinskih celic so le-te najprej podvržene posameznim celičnim ciklom. Po končanem celičnem ciklu pa se v 2-5 dneh dokončno diferencirajo med svojim premikanjem navzgor po vilusu. Enterociti med gibanjem navzgor sočasno torej dozoriijo in na svoji površini izražajo encime za luminalno ter intracelularno prebavo in absorbcijo. Blizu vrha vilusa se celice podvržejo apoptozi in nato odlučijo v lumen črevesa. Panethove celice pa se diferencirajo med potovanjem navzdol po kriпти, kjer nato ostanejo približno 20 dni, nato pa jih odstranijo fagociti (38, 42, 43, 44). Pri odraslih podganah se celice v kriptah črevesnega epitelija delijo vsakih 10-14 ur. Prehoden čas

celice od kripte do vrha vilusa je 48h in med tem potovanjem se tudi podganje celice diferencirajo. Le Panethove celice ostanejo na dnu kript in se nadomestijo vsake 4 tedne. Enterociti mlajših odraslih podgan diferencirajo počasneje kot enterociti starejših (47).

1.5 Disaharidaze ozkega črevesa

Ogljikovi hidrati so glavni energetski vir v prehrani človeka. Zaužijemo jih lahko v obliki polisaharidov (škrob, glikogen), disaharidov (laktoza, saharoza, trehaloza) in monosaharidov (najdemo jih predvsem v sadju, npr. fruktoza). Ker se lahko absorbirajo le monosaharidi, mora človeško telo polisaharide in disaharide razgraditi do monomernih enot. Končno hidrolizo izvršijo disaharidaze, ki se nahajajo na resasti membrani enterocitov. Di-, oligo- in polisaharidi, ki jih α -amilaza in encimi v ozkem črevesu niso uspeli hidrolizirati, se ne morejo absorbirati. Lahko pa jih uporabijo bakterije od spodnjega ileuma naprej, saj imajo več vrst disaharidaz kot človek sam. Monosaharidi, ki se sprostijo od delovanju bakterijskih encimov, nato anaerobno razgradijo bakterije, pri tem pa nastanejo kratkoveržne maščobne kisline, laktat, metan, ogljikov dioksid... (49, 50, 51).

Črevesne disaharidaze ali oligosaharidaze so encimi, ki spadajo v skupino hidrolaz, natančneje v skupino glikozidaz (EC 3.2.1), ki hidrolizirajo O- in S- glikozidne vezi (52, 53). Nahajajo se na resasti membrani enterocitov in nastanejo med njihovo migracijo in sočasnim zorenjem navzgor od kripte do vilusa. Gre za glikoproteine, ki hidrolizirajo disaharide do monosaharidov in tako omogočijo njihovo absorpcijo (52). Glede na glikozidno vez, ki jo cepijo, jih delimo v dve skupini:

- α -glikozidaze: saharaza-izomaltaza (saharaza), maltaza-glukoamilaza (maltaza), trehalaza
- β -glikozidaze: laktaza-florizin hidrolaza (laktaza) (54).

Njihova aktivnost se spreminja vzdolž ozkega črevesa, prav tako pa je odvisna od njegove morfologije. Raziskave so pokazale, da je povprečna vrednost laktaze v duodenumu približno 40% nižja kot v jejunumu, maltaza je znižana v manjši meri, aktivnost saharaze pa je v obeh predelih ozkega črevesa približno enaka (56).

S poskusi na živalskih modelih je bilo ugotovljeno, da obstajajo cirkadialni oziroma dnevni ritmi katalitičnih aktivnosti črevesnih disaharidaz, ki so kontrolirani endogeno in sinhronizirani z ritmom hranjenja. Poskusi na tkivni kulturi črevesa podgan pa so pokazali, da cirkadialnega ritma aktivnosti črevesnih disaharidaz v in vitro kulturah ni mogoče

določiti. Zaznali so le trend 4 urnega nihanja, hkrati pa je do najvišje vrednosti aktivnosti disaharidaz prišlo po 16 urah. Razlog tega dviga bi naj bila odsotnost pankreatičnih proteaz in vitro (23, 24, 57).

Saharaza- izomaltaza (SI)

Saharaza-izomaltaza je integralen membranski glikoprotein tipa II sestavljen iz dveh podenot: saharaze in izomaltaze, ki imata 38% aminokislinskega zaporedja identičnega. N-terminalni konec SI kaže citosolno usmerjenost, C-terminalni konec pa štrli v lumen. Prebavi vso saharozo in 80% zaužite maltoze. Saharaza prebavi primarno α -1,2 in α -1,4 glukopiranozidno vez in je odgovorna za končno prebavo zaužite saharoze in škroba. Izomaltaza pa v glavnem hidrolizira α -1,6 vezi (58, 59).

Pomanjkanje SI se kaže s trebušnimi krči, diarejo, napihovanjem in vodi do izgube teže, napak v rasti in malnutricije. Med Inuiti v Grenlandiji so pomanjkanje SI odkrili pri kar 10% populacije, vzrok pa naj bi bilo pretirano hranjenje dojenčkov s sladkorjem (vendar so v neki drugi študiji odkrili, da bi naj prehranjevanje z določenimi ogljikovimi hidrati povečalo količino disaharidaz). O znižani aktivnosti SI so poročali v južni Afriki, kar kaže na možnost učinka polimorfizma. Do zdaj so identificirali le eno eksonsko mutacijo, ki vodi do substitucije glutamin→prolin na mestu 1098 saharazne podenote. Ta mutacija povzroči zaustavitev prenosa pro-SI v Golgijev aparat (52, 58, 60).

Maltaza-glukoamilaza (MGA)

Je integralni membranski glikoprotein tipa II, monomerne oblike, ki je v resasto membrano enterocitov pripet z N-koncem glukoamilaze. Hidrolizira preostalih 20% maltoze, majhen odstotek izomaltoze in glukozne oligomere. Glukoamilaza sprošča β -glukozo iz nereducirajočih koncev škroba. MGA je torej pomembna pri pomanjkanju SI in α -amilaze, ker prevzame del njihovih nalog, nima pa sposobnosti hidrolizirati saharozo, v čemer se razlikuje od SI. Sicer pa je bilo ugotovljeno, da imata MGA in SI kar 59% identičnega aminokislinskega zaporedja (58, 59, 61, 62).

1.5.1 Znižana aktivnost disaharidaz

Do pomanjkanja disaharidaz lahko pride pri boleznih, ki prizadenejo steno črevesja, saj se encimi nahajajo na ščetkasti membrani enterocitov (63). O primarnem pomanjkanju disaharidaz govorimo, kadar do njega pride zaradi prirojenih napak v metabolizmu in se pokaže takoj po rojstvu ali uvedbi določenega disaharida v prehrano. Sluznica črevesja je morfološko normalna, pomanjkanje pa traja celo življenje. Izjema je primarno pomanjkanje oziroma postopno upadanje količine laktaze z leti, ki je fiziološko, saj je mleko v naravi namenjeno le prehrani mladičev. Sekundarno pomanjkanje disaharidaz pa povzročijo poškodbe črevesne sluznice npr. virusi, bakterije, zdravila, malnutricija. Tukaj opazimo histološke spremembe sluznice črevesja kot posledica bolezni, stanje pomanjkanja disaharidaz pa je le prehodno (64).

Z nekaterimi raziskavami so ugotovili, da prisotnost bolezni duodenuma ne pomeni zmeraj nizke aktivnosti laktaze, so pa bile aktivnosti vseh disaharidaz znatno nižje pri bolnikih s patologijo duodenuma kot z normalno histologijo, pri čemer je bila aktivnost laktaze nižja kot pa saharaze in maltaze. Do povečanega števila pa lahko pride v času nosečnosti in pri diabetesu, kjer vilusi hipertrofirajo (56, 65). Pri aktivni celiakiji je atrofija sluznice povezana z izrazitim znižanjem encimskih aktivnosti črevesnih disaharidaz (maltaza, saharaza, laktaza), zato bi z njimi lahko napovedovali stopnjo atrofije vilusov. Ko se začne sluznica črevesja obnavljati, se poveča tudi aktivnost disaharidaz. Merjenje njihove aktivnosti se uporablja pri postavitvi diagnoze in ocenjevanju odgovora na brezglutensko dieto pri bolnikih celiakije (66).

1.6 Tkivna transglutaminaza

Je encim, ki spada v družino od kalcija odvisnih encimov in križno poveže proteine med amino skupino lizinskega ostanka in gama-karboksamidno skupino glutaminskega ostanka. Nastanejo inter- ali intramolekularne vezi, ki so visoko odporne na proteolizo. Je povsod navzoč citoplazemski encim in se sprošča iz fibroblastov, endotelijskih in vnetnih celic med mehanskim draženjem ter vnetjem. S križnim povezovanjem izvenceličnih komponent matriksa pomaga pri stabilizaciji tkiva po njegovi poškodbi. Tvorba encima je pospešena tudi pri celicah podvrženih apoptozi. TG2 naj bi imela tudi GTP-azno aktivnost, saj bi naj ob prisotnosti GTPja delovala kot G protein, ki sodeluje v procesih signalizacije (7, 67, 68, 69).

1.6.1 Vloga tkivne transglutaminaze pri celiakiji

Vrednost TG2 je povišana v biopsih bolnikov s celiakijo in jo najdemo tako na ščetkasti membrani kot tudi tik pod epitelijem. Pri celiakiji ima vsaj dve vlogi: kot glavni avtoantigen za antiendomizijska in anti-tTG protitelesa in kot deamidirajoči encim, ki poveča imunostimulatorni učinek glutena. Z deamidacijo glutamina v glutaminsko kislino postanejo gliadinski peptidi negativno nabiti in zato primernejši za vezavo na HLA-DQ2/DQ8 kompleks. Deamidacija je učinkovitejša pri nizkem pH-ju, do katerega tudi pride med vnetjem. V molekulah glutena so pogosta zaporedja QP, QXP in QXXP (X je katerakoli AK). Razdalja med Q in P določa ali bo TG2 deamidirala glutamin v glutaminsko kislino in s tem omogočila vezavo molekul glutena na HLA-DQ2 ali HLA-DQ8 (4). Dodatna vloga TG2 pri celiakiji je križno povezovanje z glutamini bogatih proteinov (gluten) z lizinsko skupino drugega proteina. Ta drugi protein je lahko tudi sama TG2. Vse te aktivnosti prispevajo k oblikovanju širokega območja T-celičnih stimulatornih epitopov, ki bi lahko bili vpleteni v različna stanja bolezni in tudi sprožijo nastanek anti-tTG protiteles v B celicah. Predlagali so, da bi povišana TG2 pri celiakiji lahko omogočila nastanek antigenih neo-epitopov s križnim povezovanjem ali deamidacijo virusnih, prehranskih in endogenih proteinov in tako pripomogla k začetku avtoimunih bolezni (5,7, 55).

Protitelesa proti TG2 so bila prvič opisana leta 1997. Njihovo dokazovanje skupaj z dokazovanjem protiteles EMA je danes osnova diagnostike celiakije. Pokazali so, da protitelesa proti TG2 pri celiakiji motijo aktivnost TG2 in imajo škodljiv vpliv na diferenciacijo epiteljskih celic. V črevesnih celičnih linijah se je izkazalo, da anti-tTG protitelesa povečajo epiteljsko permeabilnost in tudi povzročijo poškodbe črevesja. Vlogo bi naj imela tudi pri ekstraintestinalnih manifestacijah celiakije preko interakcije z TG2. Ta protitelesa so namreč našli tudi v malih možganih in možganskem deblu bolnikov z glutensko občutljivostjo in ataksijo malih možganov, kot tudi v koži bolnikov z dermatitisom herpetiformis, ki je kožna manifestacija celiakije (72, 68).

Aktivacija TG2 bi naj bila ključen korak pri razvoju celiakije. V črevesju je namreč normalno neaktivna, v ekstracelularnem prostoru in v enterocitih bolnikov s celiakijo pa so ugotovili, da je povečano izražanje aktivne TG2. Poraja se torej vprašanje zakaj sploh pride do aktivacije? Nekateri predvidevajo, da njeno prehodno aktivnost lahko povzroči prisotnost patogenov in da tudi glutenski peptidi, ki sprožijo prirojen imunski sistem, okrepijo aktivacijo TG2. Ni pa jasno, zakaj se to zgodi le pri bolnikih celiakije in ne pri

zdravih posameznikih. Pri večini HLA-DQ2/8 pozitivnih ljudeh ne nastajajo gluten-specifični limfociti T in ne pride do razvoja bolezni, čeprav imajo sposobnost deamidacije glutenskih peptidov, če je seveda TG2 aktivna. Torej, kaj je tisti glavni faktor, ki odloča o razvoju bolezni, je še vedno skrito v povojih (70, 71). Za razliko od rezultatov dobljenih pri poskusih na »zdravih« humanih vzorcih je bilo na zdravih živalskih modelih (podganji, mišji) ugotovljeno, da toksični peptidi sprožijo aktivacijo TG2 (76, 82).

2 NAMEN DELA

Ker je na področju etiopatogeneze celiakije in kronične vnetne bolezni črevesja še vedno dosti neznank, je razvoj stabilnih primarnih celičnih kultur epitelijskih celic ozkega črevesa prvi korak pri pridobivanju novih informacij. V preteklosti so že ustanovili dolgoživeče primarne kulture mišjih enterocitov, mi pa bomo to metodo prenesli še na podganje in humane enterocite. Cilj našega eksperimentalnega dela je proučiti vpliv dveh pentapeptidov p39-43 (-PQQPY-) in p51-55 (-SQQPY-) v koncentracijah 100 µg/mL in 200 µg/mL na kulturo podganjih enterocitov. Spremljali bomo živost, število celic in encimske aktivnosti maltaze, saharaze ter tkivne transglutaminaze. Naš namen je, da ugotovimo, ali ima katero zaporedje pentapeptidov večji vpliv od drugega. Ker so v prejšnjih diplomskih nalogah že spremljali učinke toksičnega peptida p31-43 (-LGQQQPFPPQQPY-) na mišje in podganje enterocite, bomo mi proučili njegov vpliv še na humane enterocite pri koncentraciji 200 µg/mL. Poskušali bomo ugotoviti, če je njegovo delovanje na humane enterocite enako tistemu na podganje in mišje enterocite. Tudi tukaj bomo spremljali število celic in njihovo živost ter aktivnosti saharaze, maltaze in tkivne transglutaminaze.

Eksperimentalno delo bo potekalo po naslednjih korakih:

1. Kultiviranje odmrznjenih predhodno izoliranih podganjih enterocitov z dodanima pentapeptidom dveh različnih koncentracij in brez peptida.
2. Izolacija in kultiviranje humanih enterocitov z dodanim toksičnim peptidom in brez peptida.
3. Spremljanje števila celic in njihove živosti z aparatom Countess Automated Cell Counter invitrogen-C10227.
4. Merjenje aktivnosti tkivne transglutaminaze ter aktivnosti saharaze in maltaze po Dahlqvistovi metodi v celičnem lizatu. Vse te aktivnosti se izražajo na gram proteinov, zato bomo v celičnem lizatu določili tudi koncentracijo proteinov po metodi Bradford.

Z dobljenimi rezultati bi radi ocenili, če in kakšen vpliv imajo dodani peptidi na podganje enterocite, humane »zdrave« enterocite in enterocite bolnikov s celiakijo in Crohnovo boleznijo.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Biološki vzorci

Ozko črevo podgan in humani biopti odvzeti iz dvanajstnika ozkega črevesa

3.1.2 Laboratorijski pribor

Igle za brizge (FINE-JECT, 4710008040 HENKE SASS WOLF, Tuttlingen, Nemčija), centrifugirke (15 mL, TPP, 91015), centrifugirke (50 mL, CELLSTAR, Cat.No. 227261, greiner bio-one, Frickenhanseu, Nemčija), mikrotiterske ploščice s 6, 12, 24, 96 vdolbinicami (TPP, 92006, 92012, 92024, 92096, Švica), polnilna pipeta (Midi Plus; BIOHIT, Helsinki, Finska), plastični nastavki za polnilno pipeto (5 mL, 10 mL, 25 mL, TPP, 94005, 94010, 94025, Trasadingen, Švica), plastični nastavki za polnilno pipeto (50 mL, CELLSTAR, 768180, greiner bio.one, Frickenhanseu, Nemčija), avtomatske pipete: 0,5-10 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L (eppendorf, BIOHIT, Helsinki, Finska), plastični nastavki za pipete (SARSTEDT, Nemčija), krioampule 1,2 mL (TPP, 89012, Švica), plastične epruvete z zamaškom 1,5 mL in 2 mL (Sarstedt, Nemčija), steklovina: čaše (100 ml), merilne bučke (100 mL, 250 mL), ploščica za merjenje števila celic in živost (Invitrogen, C10283, ZDA), stojalo za epruvete in centrifugirke, rokavice za enkratno uporabo, papirnate brisačke, 70% etanol v pršilki, plinski gorilnik

3.1.3 Aparature

Analitska tehnica (Acculab-Atilon, Brooklyn, NY, ZDA), centrifuga (CENCTRIC, 322A; Tehnica, Železniki, Slovenija), inkubator (Heraus, Nemčija), laminarij (Variolab Waldner, Nemčija), mikrotiterski čitalec Safire² (Tecan, Avstrija), mikrotiterski čitalec Tecan Sunrise (Avstrija), stresalnik (Environmental Shaker-Incubator ES-20; Biosan, Riga, Latvija), vibracijsko mešalo Bio Vortex (Biosan, Riga, Latvija), mikrocentrifuga (neoLab,GMC-060, Koreja), aparat Countess Automated Cell Counter (Invitrogen-C10227), Dewarjeva posoda s tekočim dušikom, aparat za pripravo ultračiste vode (PURELAB classic UF,ELGA), vodna kopel (Sutjeska), digitalni fotoaparat (Olympus C-7070, Japonska), pH-meter (SevenEasy, Mettler Toledo, Kitajska)

3.2 Reagenti in kemikalije ter priprava delovnih reagentov

Sestava 250 mL kompletiranega RPMI 1640, priprava fiziološke raztopine in sestava raztopin A in B za zamrzovanje so enake že opisanim postopkom. (81)

Priprava raztopine kolagenaze XI v Hanksovi raztopini

15 mg kolagenaze XI (Collagenase from Clostridium histolyticum, Sigma, C9407-1G, Nemčija) raztopimo v 10 mL Hanksove raztopine (Sigma, H9269, Nemčija).

3.3 Metode

3.3.1 Živalski model

Kot študijski živalski model so bile uporabljene odrasle podgane Wistar moškega spola, ki so že jih že uporabili pri izvajanju eksperimentalnega dela za diplomu Spremljanje aktivnosti lizocima kot celičnega označevalca Panethovih celic v kulturah mišjih in podganjih epiteljskih celic tankega črevesa (T.Lapajne). Evtanazija poskusnih živali za izvajanje znanstveno raziskovalnega dela na tkivu predhodno usmrčenih živali je bila odobrena s strani Veterinarske uprave RS 03.02.2009, pod številko 34401-72/2008/4.

3.3.2 Statistična metoda za analizo rezultatov

Dobljene rezultate smo statistično obdelali s programoma SPSS Inc Statistic 17.0 in Microsoft Office Excel 2007. Pri ugotavljanju razlik med pentapeptidoma smo uporabili enofaktorsko ANOVO in sicer smo kot odvisno spremenljivko uporabili razlike med 24h in 0h oz. 48h in 0h dobljenih vrednostih encimskih aktivnosti, števila celic in živosti pri kulturah brez peptida, z P1 in P2 oba koncentracije 100 µg/mL oz. 200 µg/mL. Pri humanih vzorcih pa smo z t-testom za neodvisne vzorce testirali razliko dobljenih vrednosti v času 48h in 0h med kulturami z toksičnim peptidom in brez njega ter tako ugotavljali vpliv tosičnega peptida. Če pa smo želeli pri podganjih in humanih vzorcih ugotoviti le spremembe tekom časa, smo uporabili t-test za parne vzorce.

3.3.3 Izolacija in shranjevanje humanih epiteljskih celic ozkega črevesa

Pri eksperimentalnem delu diplomske naloge smo uporabili vzorce dobljene pri biopsiji posameznikov z že diagnosticiranimi boleznimi ali pa so preiskave še nedokončane. Uporabo humanih vzorcev je bila dovoljena s strani Državne komisije za medicinsko etiko Republike Slovenije.

Postopek izolacije:

1. Takoj po biopsiji smo bioppte dali v epice z 1 mL kompletiranega RPMI medija, segretega na 37°C.
2. Bioppte v epicah smo čim prej prinesli v celični laboratorij. Temperaturo 37°C smo vzdrževali s svojo telesno temperaturo (držanje epice v roki in žepu). Seveda bi pri tem lahko prišlo do okužb, vendar se to pri nas ni zgodilo. K temu je mogoče prispevala tudi spremenjena sestava Ab/Am v kompletiranem RPMI mediju (povečana koncentracija in dodatek gentamicina).
3. Po prihodu v celični laboratorij smo bioppte s pinceto, ki smo jo prežarili na ognju, prenesli v že stehtane epice z 1 mL kompletiranega RPMI medija (37°C) in vse skupaj še enkrat stehtali. Ta del je bil potreben, da smo dobili podatke o teži bioptov.
4. Sledilo je spiranje bioptov v epicah z obračanjem in mešanjem na mešalniku.
5. Medij nato previdno odpipetiramo in zavržemo ter dodamo 1 mL svežega kompletiranega RPMI medija. Epice zopet stresamo na mešalniku.
6. Postopek spiranja (5) še enkrat ponovimo.
7. Vsakemu spranemu bioptu dodamo 1 ml kolagenaze XI v Hanksovi raztopini, ki jo pripravljamo sproti.
8. Bioppte s kolagenazo XI inkubiramo 30-60 min na 37°C in jih vmes premešamo.
9. Ko medij postane moten, je to znak, da so se iz tkiva sprostile celice. Takrat medij odpipetiramo v centrifugirke (falkonke) in začnemo s spiranjem kolagenaze. V motnem supernatantu so namreč prisotne, celice, tkivo in kolagenaza XI, ki jo je potrebno ločiti, sicer povzroči razgradnjo celic.
10. Motnemu supernatantu v centrifugirkah dodamo 2 mL svežega kompletiranega RPMI medija in centrifugiramo 5 min pri 1200 vrtljajih/min.
11. Bister supernatant odlijemo, sediment (peletko) pa resuspendiramo z dodatkom 2 mL svežega kompletiranega RPMI in stresanjem na mešalniku. Spet centrifugiramo 5 min pri 1200 vrtljajih/min. ta postopek še dvakrat ponovimo.
12. Ko opravimo zadnje spiranje, medij odstranimo in nastalo peletko obravnavamo po postopku za zamrzovanje.

Za kultiviranje smo uporabili 10 bioptov vzetih iz dvanajstnika, 7 smo jih obravnavali kot »zdrave« in 3 kot »bolne«. Vendar pa je pri teh 7 vzorcih izključena samo celiakija in

Crohnova bolezen, kar pomeni, da so ti vzorci le pogojno zdravi, saj niso izključene ostale črevesne bolezni.

Tabela 2: Seznam vzorce/bioptov, ki smo jih kultivirali, teža dobljenih bioptov in njihove pripadajoče diagnoze.

Številka vzorca	Diagnoza	Teža biopta (mg)
H1	celiakija	7,2
H5	Crohnova bolezen	6,8
H8	brez diagnoze	13,1
H10	Crohnova bolezen	1,6
H16	brez diagnoze	10,7
H19	/	2,6
H24	Krvaveči ulkus na anastomozi	9,6
H28	/	9,6
H29	brez diagnoze	6,9
H31	GERB	11,3

Teža humanih bioptov je veliko manjša kot teža podganjega ozkega črevesa. Povprečna teža ozkega črevesa podgan je bila namreč 5,37 g (77), zato je tudi število raziskav, ki jih lahko naredimo na humanih vzorcih manjše. Smo pa pri humanih vzorcih ugotovili, da teža biopta ni popolnoma sovpadala s številom celic v kulturi. Nizka teža bioptov ni pomenila nizkega števila celic in obratno. K povečanju teže, lahko namreč prispeva odvzeta sluz, ki pa smo jo na začetku izolacije s spiranjem odstranili.

Postopek zmrzovanja celic: smo izvedli po že opisanem postopku (81).

Postopek odmrzovanja celic

1. Krioampule smo odvzeli iz tekočega dušika, jih prenesli v vodno kopel in počakali, da se je vsebina stalila. Vsebino smo nato prenesli v centrifugirke z 9 mL na 37°C segretega kompletiranega RPMI medija. Vsako krioampulo smo še enkrat sprali z 1 mL kompletiranega RPMI medija in ga prenesli v centrifugirko. Ta del je potrebno napraviti čimprej, da razredčimo citotoksičen DMSO.
2. Centrifugirke smo dali centrifugirati 5 min pri 1200 vrtljajih/min.
3. Celice so se posedle, vendar je bil nastali sediment precej majhen. Zato smo večina supernatanta odlili, dali še enkrat centrifugirati in s preostanek medija odstranili s pipeto.
4. Sediment smo nato resuspendirali s 360 µL kompletiranega RPMI medija (37°C) in nato centrifugirko kvantitativno sprali še z enkrat toliko medija. Oba volumna smo

prenesli v mikrotitrsko ploščico. Kulture v mikrotitrskih ploščicah smo pustili 24h v inkubatorju (37°C, 100% vlažnost, zrak v katerem je 5% CO₂), da so se adaptirale.

Vzorci podganjega ozkega črevesa PT4, PT5, PT6, ki so bili izolirani in shranjeni že v predhodnih poskusih (77), smo odmrznili po istem postopku, končni sediment pa smo resuspendirali v 3 mL kompletiranega RPMI medija (37°C). Ker smo po 24 urah adaptacije v kulturi opazili, da so zaradi prevelike gostote nastali skupki, smo vsaki kulturi dodali še 3 mL kompletiranega RPMI medija (37°C).

3.3.4 Kultiviranje podganjih in humanih enterocitov

Izolirane podganje in humane enterocite smo kultivirali po metodi, ki je bila razvita za kultiviranje tkiva ozkega črevesa (23). V prejšnjih diplomskih nalogah so uspešno prenesli prilagojeno metodo kultiviranja epiteljskih celic ozkega črevesa na mišji in podganji model (77, 78). Ker pa so sumili na namnožitev bakterij so predlagali optimizacijo sestave kultivacijskega medija, predvsem z ustrežnejšo kombinacijo Ab/Am. Zato smo v kompletiranemu RPMI mediju podvojili koncentracijo Ab/Am (5 mL na 250 mL) in dodali še gentamicin v koncentraciji 16 µg/ml. Le-ta se je že izkazal kot uspešen antibiotik (23). Ta sprememba se je tudi pri našem kultiviranju izkazala za pravilno odločitev, saj ni prišlo do namnožitve bakterij.

Dodatek gliadinskih pentapeptidov p39-43 in p51-55 kulturam podganjih enterocitov

Po 24 urah adaptacije kultur smo 6 mL vsake kulture (PT4, PT5, PT6) razdelili na tri dele po 2 mL. En del nam je predstavljal kontrolo, v ostala dva pa smo dodali p39-43 (P1) oz. p51-55 (P2), tako da je bila končna koncentracija 100 µg/mL. Naslednji dan smo iz kultur, ki jim nismo dodali peptidov, odvzeli 400 µL in dodali 1500 µL kompletiranega RPMI. Nastalih 1900 µL smo razdelili na dva dela in vsakemu dodali P1 oz. P2 v koncentraciji 200 µg/mL. Na koncu smo torej vsako kulturo imeli razdeljeno na pet delov. V prvih dveh smo imeli P1 oz. P2 koncentracije 100 µg/mL, v drugih dveh P1 oz. P2 koncentracije 200 µg/mL, enemu delu pa nismo ničesar dodali in nam je služil kot kontrolni vzorec. Tekom kultiviranja smo ob časih 0h, 24h in 48h določali število celic in viabilnost s Countess Automated Cell Counter in naredili lizate za nadaljne teste določanja aktivnosti maltaze, saharaze in TG2.

Sintetična gliadinska pentapeptida:

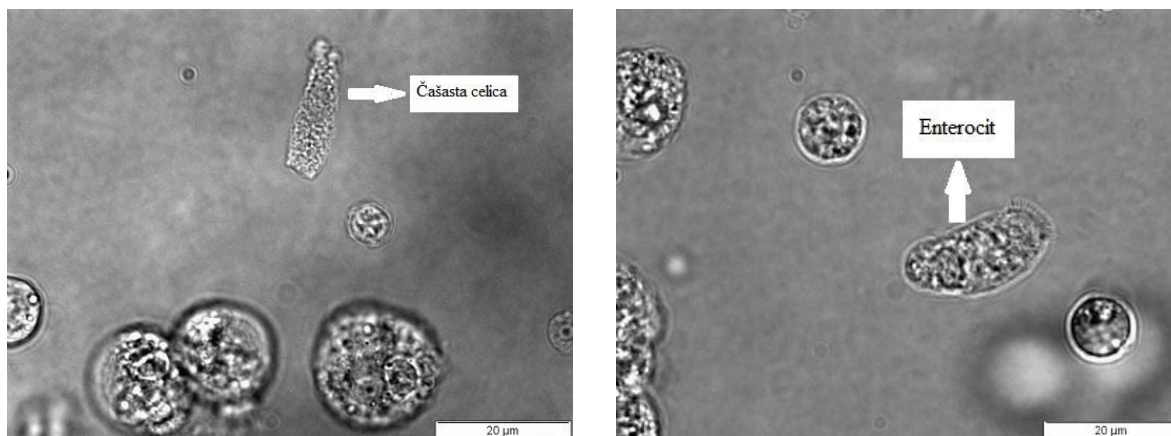
- P1: p39-43 H-PQQPY-OH* HCl (JPT Inovative Peptide Solutions, Bath.No: 290409V-27, 10,0mg, Nemčija)
- P2: p51-55 H-SQQPY-OH*HCl (JPT Inovative Peptide Solutions, Bath.No: 220509C2, 10,1mg, Nemčija)

Dodatek toksičnega peptida p31-43 kulturam humanih enterocitov

V vdolbinici mikrotitrskih ploščic smo imeli 720 μL posamezne kulture (H1, H5, H8, H10, H16, H19, H24, H28, H29, H31) in vsako smo razdelili na dva enaka dela (2-krat 360 μL). Enemu delu smo dodali p31-43, tako da je bila njegova končna koncentracija v kulturi 200 $\mu\text{g/mL}$. Drugi del vsake kulture, ki mu nismo dodali p31-43, nam je služil kot kontrolni vzorec. Vzorce smo kultivirali 48 ur, ob času 0h in 48h smo merili živost in število celic ter pripravili lizate za določanje aktivnosti saharaze, maltaze in TG2. Te parametre smo želeli spremljati tudi ob času 24h, vendar nam premajhna gostota celic in posledično manjša količina vzorca za analizo, tega ni dopuščala.

Toksičen peptid:

- TP: p31-43 H-LGQQQPFPPQQPY-OH*HCl (JPT Inovative Peptide Solutions, Bath.No: 081209Z-23, 30mg, Nemčija)



Slika 5: Humane epiteljske celice dvanajstnika v kulturi H19 (Mikroskopski sistem cell R, Olympus IX81; 1000 x povečava)

3.3.5 Določanje živosti in števila celic med kultiviranjem

Živost in število celic smo določali z avtomatskim števcem celic- Countess Automated Cell Counter (Invitrogen). Metoda temelji na standardni tehniki barvanja s tripanskim

modrilom. Aparat vsebuje majhen mikroskop, digitalno kamero in računalnik, ki omogoča hitro štetje in določanje živosti 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 in hitro dobimo zelene podatke (79, 80).

Countess je najsodobnejša avtomatska naprava, ki omogoča optično in slikovno analizo. Z njim lahko s standardno tehniko barvanja s tripanskim modrilom določimo število živih, mrtvih in vseh celic. Preiskovan vzorec nanese v enega izmed dveh zaprtih prostorov na ploščico za enkratno uporabo. Aparat šteje celice v osrednjem mestu, kamor smo nanegli vzorec. Volumen, v katerem prešteje celice je enak $0,4\mu\text{l}$, kar je enako štirim kvadratkom s površino 1mm^2 kot pri standardnem hemocitometru (80). Aparat nam za vsak vzorec da podatke o številu živih in mrtvih celic/ml, skupnem številu celic/ml, živosti (% živih celic glede na skupno število), povprečnem premeru, sliko celic in grafični prikaz podatkov.

Prednost tega aparata je, da nam avtomatsko izmeri zelene parametre in tako izključi subjektivnost posameznika. Kljub temu pa delo z njim zahteva določena znanja in izkušnje.

Reagenti in kemikalije:

- Trypan Blue Stain 0,4% (T10282, ZDA)

Postopek dela:

1. $10\mu\text{L}$ svojega vzorca dobro zmešamo s $10\mu\text{L}$ tripanskega modrila. $10\mu\text{L}$ te mešanice nanese na ploščico v prostor A ali B in jo vstavimo v režo na aparatu.
2. Z gumbom za zoom 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 sicer napisano, da se pravilna slika uravna samo pred začetkom prve meritve, mi pa smo ugotovili da je pri naših vzorcih bilo potrebno pred vsakim vzorcem nastaviti sliko.
3. S pritiskom na zavihek Count Celss nam je aparat v približno 30 sekundah dal podatke o živosti in številu celic, ki smo jih lahko shranili na USB ključ s dotikom na funkcijo Save. Če hočemo videti grafično predstavitev podatkov pritisnemo na gumb More Data.
4. Po končanih meritvah ploščico vzamemo iz reže in v prazen prostor A ali B nanese novo mešanico vzorca z tripanskim modrilom.

5. Ploščico spet vstavimo v režo, pritisnemo Next Sample in nato Count Cells.
6. Po končanem delu aparat izklopimo.

3.3.6 Določanje aktivnosti maltaze, saharaze in tkivne transglutaminaze v celičnem lizatu

V kulturah podganjih enterocitov smo ob časih 0h (takoj po dodatku P1 in P2), 24h in 48h spremljali aktivnosti maltaze, saharaze in TG2 v celičnem lizatu. Iste parametre smo določali v kulturah humanih enterocitov, vendar le ob času 0h (takoj po dodatku TP) in 48h.

Delo je potekalo po naslednjih korakih:

1. Priprava celičnega lizata.
2. Merjenje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi, saj aktivnosti izražamo na gram proteinov.
3. Merjenje aktivnosti maltaze, saharaze in tkivne transglutaminaze.

Priprava podganjega celičnega lizata

1. 300 μL (oz. 600 μL z P1 in P2 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) celične kulture smo prenesli v centrifugirko in 10 μL porabili takoj za merjenje živosti in števila celic. Ostalo smo centrifugirali 5 min pri 1200 vrt./min.
2. Približno 200 μL (oz. 500 μL) nastalega supernatanta smo odvzeli in ga shranili za nadaljne raziskave. Sediment smo resuspendirali v 10 mL fiziološke raztopine in centrifugirali 5 min pri 1200 vrt./min.
3. Fiziološko raztopino previdno odlijemo, spet dodamo 10 mL fiziološke raztopine, peletko resuspendiramo in nato centrifugiramo 5 min pri 1200 vrt./min
4. Supernatant smo odlili in ker sediment ni bil dovolj trdno pritrjen na dno, smo centrifugirali še enkrat 5 min pri 1200 vrt./min in nato fiziološko raztopino odstranili z pipeto.
5. Sedimentu smo dodali 300 μL (oz.400 μL) destilirane vode, ga resuspendirali in nato vsebino prenesli v plastično epruveto z zamaškom in jo shranili v zmrzovalniku.

Priprava humanega celičnega lizata

1. Iz celične kulture, ki smo jo prej dobro homogenizirali z mešanjem, smo odvzeli 160 μL in jo dali v epico (1,5 mL) ter centrifugirali 1-2 min pri 2000 vrt./min.

2. Supernatant smo odpipetirali in shranili, sediment pa resuspendirali v 1 mL fiziološke raztopine in zopet centrifugirali 1-2 min pri 2000 vrt./min.
3. Supernatant smo odpipetirali in zavrgli, sediment pa še enkrat resuspendirali v 1 mL fiziološke raztopine in centrifugirali 1-2 min pri 1200 vrt./min.
4. Po centrifugaciji je bilo potrebno nastali supernatant čim bolj odstraniti. Peletki pa smo dodali 160 μ L destilirane vode, dobro premešali in shranili v zmrzovalnik.

Postopek priprave celičnega lizata humanih celic se razlikuje od podganjih, saj smo tukaj imeli manjšo gostoto celic in posledično majhne nastale sedimente. Da ne bi prišlo do izgub, smo ves čas delali v istih epicah in z manjšimi volumni fiziološke raztopine.

Merjenje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi

Uporabljeni reagenti in kemikalije, priprava delovnih reagentov in postopek merjenja koncentracije proteinov v podganjem in humanem celičnem lizatu so enaki kot v že opisanem postopku merjenja koncentracije proteinov (81). Le da je volumen v katerem smo merili koncentracijo pri podganjih vzorcih bil 25 μ L (dve paralelki), pri humanih pa 20 μ L (dve paralelki).

Merjenje aktivnosti maltaze in saharaze po Dahlqvistovi metodi

Uporabljeni reagenti in kemikalije, priprava delovnih reagentov in postopek merjenja aktivnosti maltaze in saharaze v podganjem ter humanem celičnem lizatu so enaki kot v že opisanem postopku. (81) Volumen podganjega vzorca je bil 20 μ L, humanega pa 10 μ L. Potrebno je bilo paziti, da je količina glukoznega standarda enaka količini uporabljenega vzorca.

Merjenje aktivnosti tkivne transglutaminaze

Tudi tukaj so uporabljeni reagenti in kemikalije, priprava delovnih reagentov in postopek merjenja aktivnosti tkivne transglutaminaze v podganjem in humanem celičnem lizatu enaki že opisanemu postopku (81). Aktivnost pri podganjem vzorcu smo merili v dveh paralelkah po 50 μ L, pri humanih vzorcih pa prav tako v dveh paralelkah, vendar po 25 μ L.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Celiakija in KVČB v današnjem času dobivata vse večje razsežnosti, tako v pogostosti pojavljanja kot tudi v razumevanju patofizioloških procesov. Zaradi etičnih razlogov je humane vzorce v raziskovalne namene možno dobiti le pri postavljanju diagnoze in pri sekciji črevesja. Hkrati se za raziskovanje lahko uporabijo le preostanki vzorcev, če je le-to prej odobrila Državna etična komisija. Zato se raziskovalci danes trudijo dobiti čim bolj primerljiv živalski model ozkega črevesa. V prejšnjih diplomskih nalogah so že uspešno prenesli metodo kultiviranja mišjih enterocitov na podganje, zato smo tukaj izkoristili že pridobljene izkušnje in podganje enterocite kultivirali z dvema različnima gliadinskima pentapeptidoma. Že takrat je bil predlagan tudi prenos metode iz podganjega na humani model. Iz bioptov dobljenih pri biopsijah smo izolirali in kultivirali humane epiteljske celice in ugotavljali kakšen direkten vpliv ima nanje peptid, za katerega je že bila ugotovljena toksičnost na nekatere celične linije.

4.1 Kultiviranje primarnih kultur podganjih epiteljskih celic ozkega črevesa z gliadinskima pentapeptidoma

Epiteljske celice ozkega črevesa podgan, ki smo jih uporabili pri naših poskusih, so že bile izolirane pri predhodnih diplomskih nalogah in nato shranjene v tekočem dušiku. Izolacija in kultiviranje sta bili zelo uspešni, saj so iz posameznega ozkega črevesa podgan izolirali kar $1 \cdot 10^8$ heterogenih epiteljskih celic (77). Za uporabo v naše namene jih je bilo potrebno le odmrzniti po že zgoraj opisanem postopku, nato pa je sledilo kultiviranje v primernem kompletiranem RPMI mediju brez ali z dodanima gliadinskima peptidoma dveh različnih koncentracij.

4.1.1 Spremljanje vplivov gliadinskih pentapeptidov p39-43 (P1) in p51-55 (P2) koncentracije 100 µg/mL na podganje enterocite

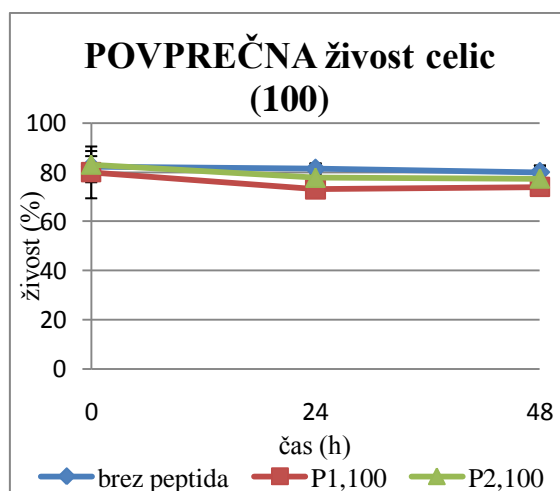
Vpliv na živost in število podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa

Tabela 3: Živost podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa tekom 48 urnega kultiviranja s pentapeptidoma P1 in P2 konc. 100 µg/mL in brez peptida

kultura	Živost (%)								
	Brez peptida			P1,100			P2,100		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
PT4	86	79	83	70	76	74	87	77	83
PT5	86	83	79	91	70	77	80	84	72
PT6	75	82	78	79	73	71	82	72	77
Povp ± SD	82,33 ± 6,35	81,33 ± 2,08	80 ± 2,65	80 ± 10,54	73 ± 3	74 ± 3	83 ± 3,61	77,67 ± 6,03	77,33 ± 5,51

PT4/5/6 (podganje tanko črevo po zaporednih številkah živali)

Graf 1: Povprečno spreminjanje živosti celic med kultiviranjem podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa s P1 in P2 konc. 100 µg/mL in brez peptida



Živost smo določali v treh časovnih točkah: ob času 0h (takoj po dodatku peptidov), 24h in 48h. *¹Živost v kulturi PT4 brez in z P2/100 po 48h rahlo pade, medtem ko pri kulturi PT5 povsod rahlo pade po 48h. V kulturi PT6 živost po 48h pade le tam, kjer sta bila dodana peptida. Ta rahla nihanja v padcu živosti med posameznimi kulturami lahko pripišemo biološki variabilnosti med vzorci heterogenih epitelijskih celic. Pri postopku izolacije so namreč zajeli tako celice, ki so v začetni fazi življenjskega cikla kot tudi celice, ki so že tik

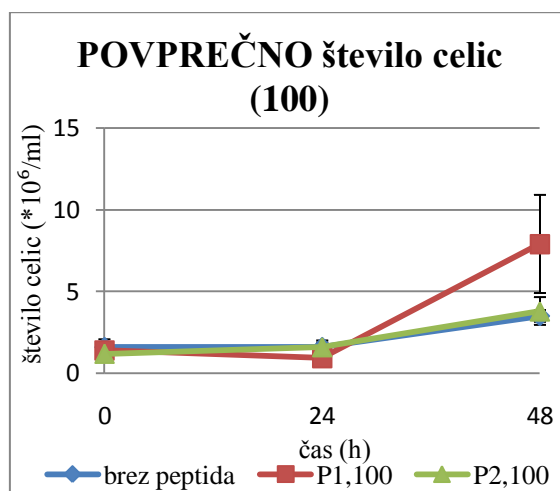
¹ Živost celic za posamezne kulture podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa med 48 urnim kultiviranjem prikazuje graf 46, Priloge, str. I.

pred razpadom. Znotraj posameznih kultur lahko statistično značilen padec po 48h opazimo le pri kulturah z P2/100 ($p=0,02 < 0,05$), zato bi lahko rekli da ima P2/100 vpliv na znižanje živosti celic po 48h kultiviranja. Ko pa smo med sabo primerjali posamezne skupine kultur brez, z P1/100 in P2/100, smo ugotovili, da med njimi ni statistično značilnih razlik. Takšen rezultat kaže na dejstvo, da je vzporedno kultiviranje brez peptida nujno za verodostojne zaključke. Če ne bi imeli kontrolnega vzorca, bi namreč prišli do napačnega sklepa.

Tabela 4: Število podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa tekom 48 urnega kultiviranja s pentapeptidoma P1 in P2 konc. 100 $\mu\text{g/mL}$ in brez peptida

kultura	Število celic (celice/ml)								
	Brez peptida			P1,100			P2,100		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
PT4	$2 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^6$	$7,8 \cdot 10^5$	$9,4 \cdot 10^6$	$9,5 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^6$	$4,6 \cdot 10^6$
PT5	$1,8 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^6$	$3,9 \cdot 10^6$	$9,5 \cdot 10^5$	$8,6 \cdot 10^5$	$9,8 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^6$	$3,8 \cdot 10^6$
PT6	$1,1 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^6$	$3,4 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^6$	$4,5 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^6$	$2,9 \cdot 10^6$
Povp	$1,6 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^6$	$3,5 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^6$	$9,5 \cdot 10^5$	$7,9 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^6$	$3,8 \cdot 10^6$
\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
SD	$4,7 \cdot 10^5$	$4,0 \cdot 10^5$	$3,6 \cdot 10^5$	$4,1 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^5$	$3,0 \cdot 10^6$	$2,8 \cdot 10^5$	$2,7 \cdot 10^5$	$8,5 \cdot 10^5$

Graf 2: Povprečno spreminjanje števila celic med kultiviranjem podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa s P1 in P2 konc. 100 $\mu\text{g/mL}$ in brez peptida



*²Po 24h pri nobeni skupini kultur ne pride do značilnega padca ali porasta števila celic. Je pa iz grafa 2 razvidno, da pri vseh kulturah po 48h pride do povečanega števila celic. Ta porast je pri 5% tveganju statistično značilen za kulture z P2/100 ($p=0,02 < 0,05$) in kulture brez peptida ($p=0,02 < 0,05$). Vzroki porasta števila celic so lahko vzpostavitev primerne mikrookolja v kulturi, odsotnost pankreatičnih proteaz in začetni padec števila celic, ki

² Število celic za posamezne kulture podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa med 48 urnim kultiviranjem prikazuje graf 47, Priloge, str. I.

sproži signal za pospešeno proliferacijo izvornih celic, kar pripomore k povečanju števila celic. Pri ugotavljanju razlik med kulturami z in brez peptidov smo z Anova testom ugotovili, da pri 10% tveganju ($p = 0,054$) lahko rečemo, da med njimi obstaja razlika. Ta je po statističnem testu Bonferoni najbolj očitna za kulture z P1/100 in brez peptida, saj v kulturah z P1/100 pride do večjega porasta števila celic po 48h, kot v kulturah, kjer nismo dodali ničesar. Če bi se odločili za 5% tveganje, pa lahko zaključimo, da med posameznimi skupinami ni razlik in torej P1/100 in P2/100 ne vplivata na število celic.

Vpliv na aktivnost maltaze in saharaze

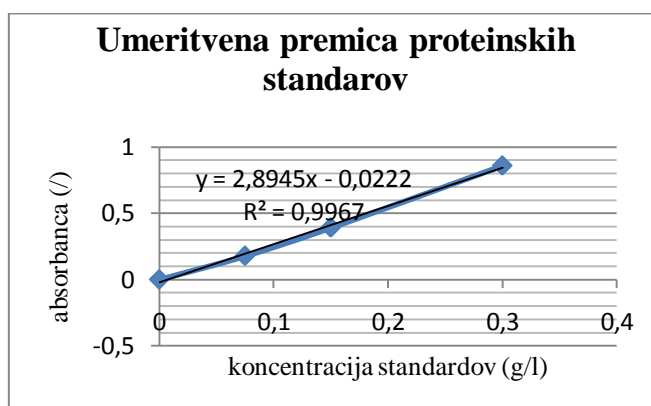
V kulturah z dodanima peptidoma in kontrolnih vzorcih smo ob času 0h (takoj po dodatku peptidov), 24h in 48h v celičnih lizatih merili aktivnost disaharidaz maltaze in saharaze. Ker aktivnosti izražamo v enotah IU/g proteinov ($\mu\text{mol}/\text{min g proteinov}$), je bilo potrebno določiti koncentracijo proteinov v vsakem lizatu. Za takšen način podajanja aktivnosti smo se odločili zaradi lažje interpretacije, saj so absolutne (izmerjene) vrednosti encimskih aktivnosti odvisne od števila celic v kulturah, z izražanjem na g proteinov pa so bolj primerljive. Umeritveno premico s pomočjo katere smo nato izračunali vrednosti proteinov, smo dobili iz absorbanc proteinskih standardov.

Tabela 5: Absorbance proteinskih standardov (humani albumin)

Koncentracija standarda (g/L)	Absorbanca standarda (Ast)
0,3	1,2075
0,15	0,7394
0,075	0,5259

Pri izračunavanju sem poleg točk Ast-Asl uporabila še točko (0,0).

Graf 3: Umeritvena premica iz proteinskih standardov (humani albumin)



Koncentracijo proteinov sem izračunala po enačbi: $A = 2,895c - 0,022$ ($R^2 = 0,9967$)

Tabela 6: Koncentracija proteinov v kulturah podganjih epitelijskih celic s pentapeptidoma P1 in P2 konc. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in brez peptida

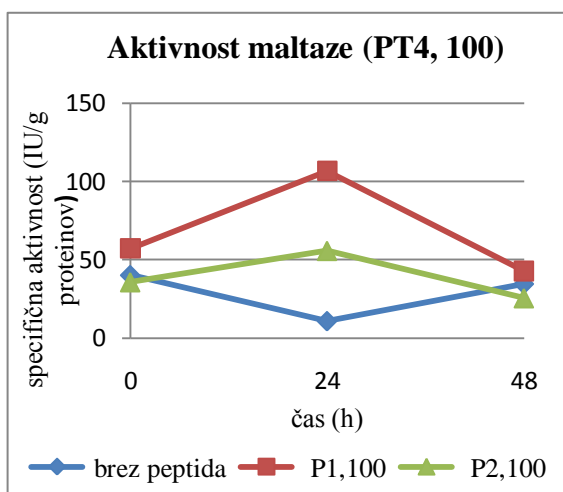
kultur	Koncentracija proteinov (g/l)								
	Brez peptida			P1,100			P2,100		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
PT4	0,017	0,0164	0,0189	0,013	0,0067	0,0213	0,0158	0,0174	0,0164
PT5	0,0161	0,0179	0,0163	0,0123	0,0154	0,0143	0,0173	0,0139	0,0178
PT6	0,0224	0,0189	0,012	0,0191	0,0166	0,015	0,0394	0,0318	0,0251
Povpr.	0,0185	0,0177	0,0157	0,0148	0,0129	0,0169	0,0242	0,0210	0,0198
\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
SD	0,0034	0,0013	0,0035	0,0037	0,0054	0,0039	0,0132	0,0095	0,0047

Tabela 7: Aktivnost maltaze v podganjih epitelijskih celicah ozkega črevesa tekom 48 urnega kultiviranja s pentapeptidoma P1 in P2 konc. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in brez peptida

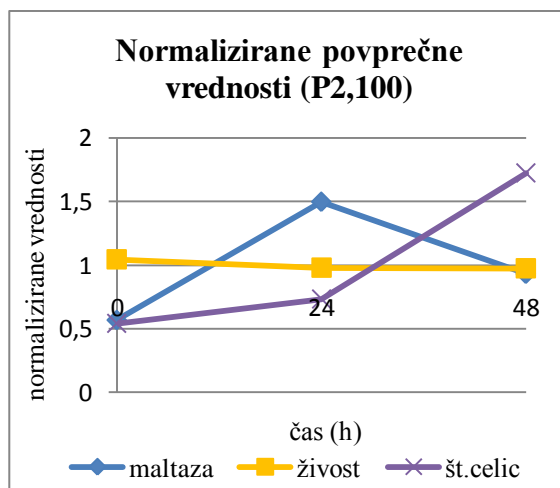
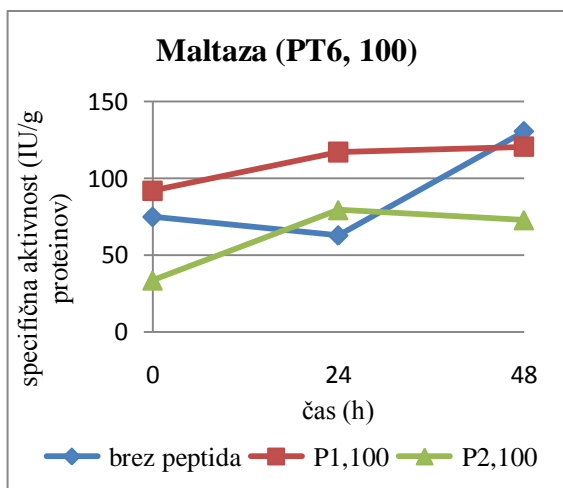
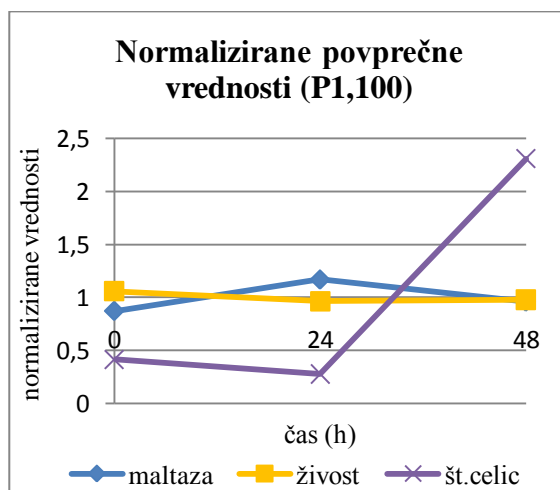
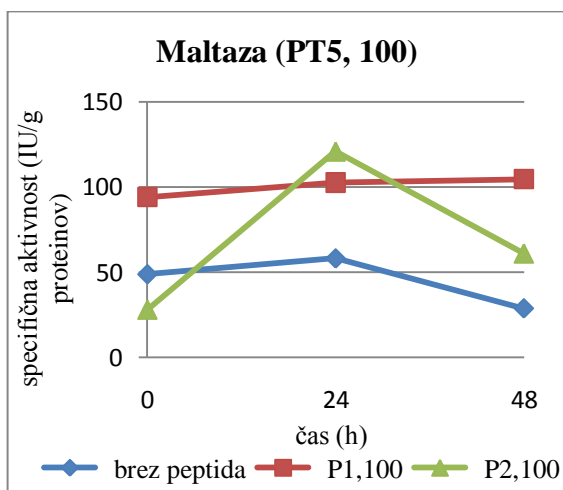
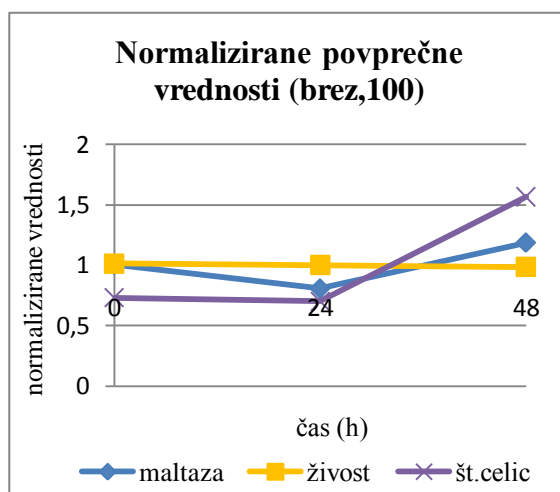
kultura	Aktivnost maltaze (IU/g proteinov)								
	Brez peptida			P1,100			P2,100		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
PT4	40,24	10,98	34,70	57,35	106,74	42,82	35,78	55,82	25,53
PT5	48,80	58,12	28,72	94,10	102,58	104,61	27,97	120,84	60,97
PT6	74,86	62,80	130,32	91,84	117,02	120,51	33,63	79,45	72,90
Povp	54,64	43,97	64,58	81,09	108,78	89,31	32,46	85,37	53,13
\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
SD	18,03	28,67	57,01	20,60	7,44	41,04	4,03	32,91	24,64

Iz grafov 4 je razvidno, da aktivnost maltaze po 24h v kulturah PT4 in PT6 brez peptida pade, le v PT5 se rahlo poveča. Po 48h pa nato aktivnost pade le v kulturi PT5, pri PT4 in PT6 pa se dvigne. Ti padci in naraščanje aktivnosti maltaze so le prehodna stanja in so del biološkega nihanja, ki je pri vseh živih organizmih normalen pojav. V vseh treh kulturah z P1/100 in P2/100 pa po 24h aktivnost maltaze naraste. Ta porast pri 5% tveganju ni statistično značilen, kar pomeni, da je le posledica endogenih bioloških ritmov, ki jih imajo črevesne disaharidaze in vitro in ima lastnosti ultradiurnalnega ritma, znotraj katerega se pojavljajo nihanja aktivnosti na približno 4 ure (25, 26). Prav tako lahko do porasta aktivnosti maltaze pride zaradi primernejšega mikrookolja v kulturah in odsotnosti pankreatičnih proteaz. Po 48h kultiviranja je aktivnost maltaze v kulturi PT5 in PT6 z P1/100 in P2/100 še vedno višja kot ob času 0h. Aktivnosti maltaze so tudi precej visoke, kar lahko pripišemo nizkim koncentracijam proteinov v vzorcih in posledično pride do lažnega višjega izračuna specifičnih aktivnosti maltaze.

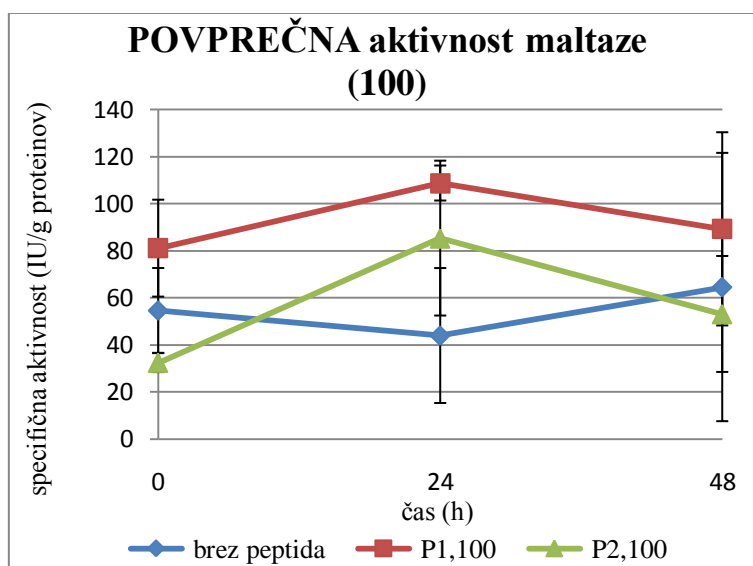
Graf 4: Spreminjanje aktivnosti maltaze v posameznih kulturah podganjih epiteljskih celic (kulture PT4, PT5, PT6) ozkega črevesa s P1 in P2 konc. 100 µg/mL in brez peptida



Graf 5: Normalizirano povprečno spreminjanje aktivnosti maltaze med kultiviranjem podganjih epiteljskih celic ozkega črevesa s P1 in P2 konc. 100 µg/mL in brez peptida



Graf 6: Dejansko povprečno spreminjanje aktivnosti maltaze med kultiviranjem podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa s P1 in P2 konc. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in brez peptida



Iz grafa 6 lahko razberemo, da se po 24h aktivnost maltaze v kulturah z P1/100 in P2/100 v povprečju poviša napram kulturam brez dodanih peptidov. S testom enofaktorska Anova smo primerjali razlike aktivnosti maltaze ob času 24h in 0h v kulturah z in brez peptidov ter ugotovili, da med njimi pri 5% tveganju ni statistično značilne razlike. Lahko pa bi rekli, da med skupinami obstaja razlika pri 10% tveganju ($p=0,07$). Pri takšnem tveganju obstaja statistično značilna razlika med kulturami brez peptida in kulturami z P2/100. Lahko bi rekli, da ima P2 kratkoročen vpliv na aktivnost maltaze, ki pa po 48h izveni in takrat ne moremo govoriti več o nobeni statistično značilni razliki. Encimska aktivnost v kulturah P2/100 se je mogoče zvišala na osnovi kompenzacijskega odziva na morebiten negativen vpliv peptida in propadanje maltaz.

Pri vzorcih brez peptida aktivnost maltaze sovpada z naraščanjem in padanjem števila celic. Lahko bi rekli, da po signalu za delitev celic pride do diferenciacije v enterocite, ki so nosilci disaharidaznih aktivnosti. Zanimivo je, da pri vzorcih z dodanima peptidoma naraščanju števila celic po 48h kultiviranja ne sledi tudi porast aktivnosti maltaze. Lahko bi torej rekli, da v kulturi ne pride le do diferenciacije celic do enterocitov, ampak tudi do ostalih vrst epitelijskih celic ozkega črevesa, ki pa nimajo disaharidaznih aktivnosti. In ker pride do večje diferenciacije teh celic, se aktivnost maltaze ne more povečati.

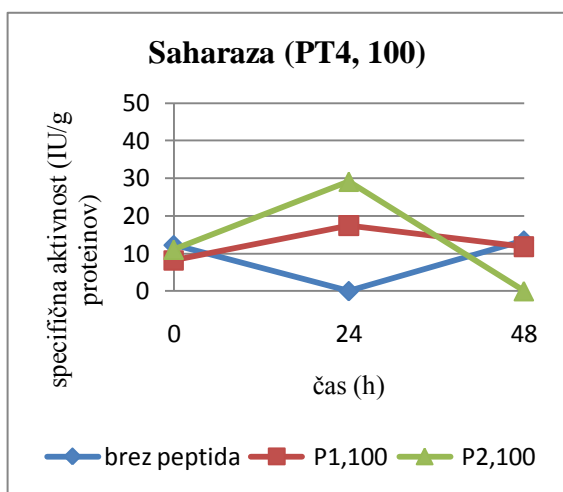
Tabela 8: Aktivnost saharaze v podganjih epitelijskih celicah ozkega črevesa tekom 48 urnega kultiviranja s pentapeptidoma P1 in P2 konc. 100 µg/mL in brez peptida

kultura	Aktivnost saharaze (IU/g proteinov)								
	Brez peptida			P1,100			P2,100		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
PT4	12,26	0	13,47	8,16	17,43	11,80	11,04	29,15	0
PT5	22,69	0	13,10	14,94	17,68	34,00	1,61	27,78	8,50
PT6	48,00	16,60	30,65	13,40	15,56	25,75	3,07	6,37	28,27
Povp	27,65	5,53	19,07	12,17	16,89	23,85	5,24	21,10	12,26
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
SD	18,38	9,59	10,03	3,55	1,16	11,22	5,08	12,78	14,51

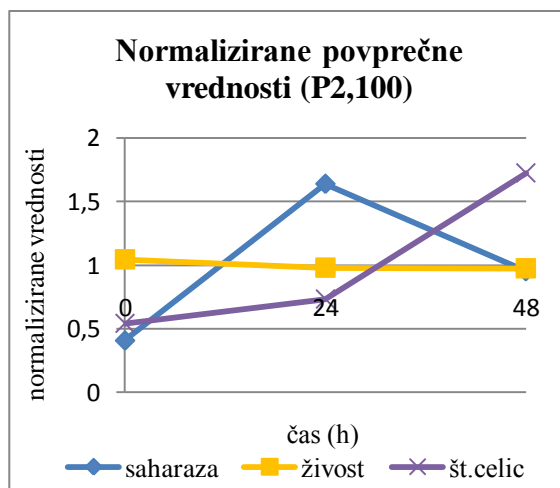
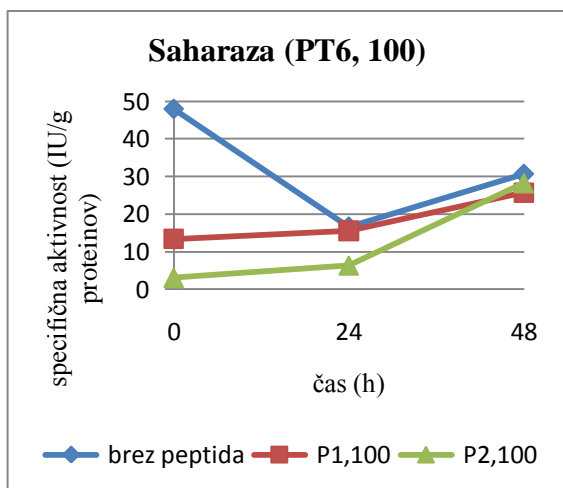
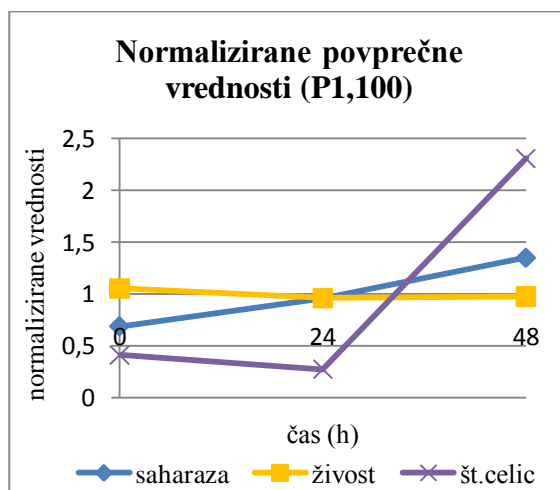
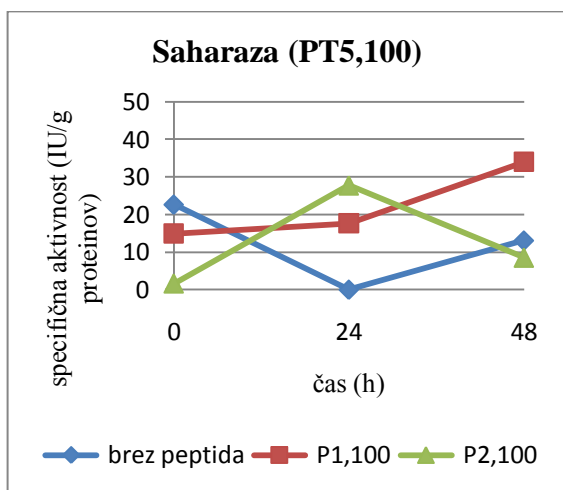
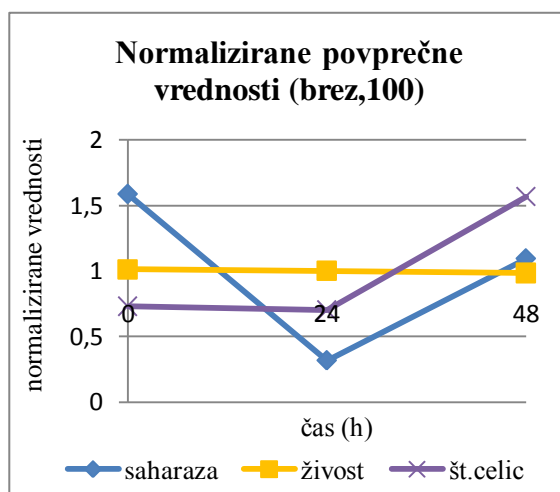
Ob pogledu na grafe 7 vidimo, da aktivnost saharaze po 24h v vseh treh kulturah brez dodanega peptida pade. Ta padec pri 5% tveganju ni statistično značilen ($p=0,06 < 0,10$). Čeprav smo pričakovali, da bo po 24h aktivnost saharaze narastla zaradi ugodnega mikrookolja in odsotnosti pankreatičnih proteaz, pa temu ni bilo tako. Vzrok so verjetno spet endogena nihanja črevesnih disaharidaz z značilnimi nihanji aktivnosti na približno 4 ure, pri čemer lahko aktivnosti nihajo za $\pm 30\%$. Po 48h pa aktivnost naraste, vendar je v kulturah PT5 in PT6 še vedno nižja od začetne, pri PT4 pa je malenkost večja. V kulturah z P1/100 in P2/100 pa aktivnost saharaze po 24h naraste, vendar parni t-test ni pokazal, da bi ta porast pri 5% obojestranskem tveganju bil statistično značilen. V kulturah PT5 in PT6 z P1/100 aktivnost saharaze po 48h še vedno raste, medtem ko v kulturi PT4 rahlo pade. Pri dveh kulturah (PT4,PT5) z P2/100 aktivnost saharaze po 48h pade, pri PT6 pa naraste. Razlike v aktivnosti saharaze med kulturami lahko pripišemo lastnim endogenim biološkim ritmom, postopku izolacije pri kateri so dobili heterogene epitelijske celice črevesa in nehomogenemu jemanju vzorcev za pripravo celičnih lizatov.

Obnašanje grafov povprečnih vrednosti saharaze je zelo podobno grafu povprečnih aktivnosti maltaze, le da so aktivnosti saharaze nižje. Z testom enofaktorska Anova smo ugotovili, da med skupinami obstaja statistično značilna razlika ($p=0,005 < 0,05$) po 24h. Z natančnejšim testom Bonferoni smo videli, da se med sabo razlikujeta predvsem kulture brez peptida in z P2 ($p=0,006 < 0,05$) ter tudi kulture z P1 in brez peptida ($0,032 < 0,05$). S 5% tveganjem lahko torej rečemo, da tako P1 kot P2 po 24h povečata aktivnost saharaze. P1/100 in P2/100 lahko spodbudita aktivnost saharaze preko vpliva na povečano propadanje encima, lahko pa pride tudi do indukcije in povečane sinteze encima. Po 48h pa ni več razlik v učinkih peptidov na aktivnost saharaze v primerjavi s kontrolo. Verjetno gre le za kratkoročen pozitiven učinek dodanih peptidov, ki po 48h izveni.

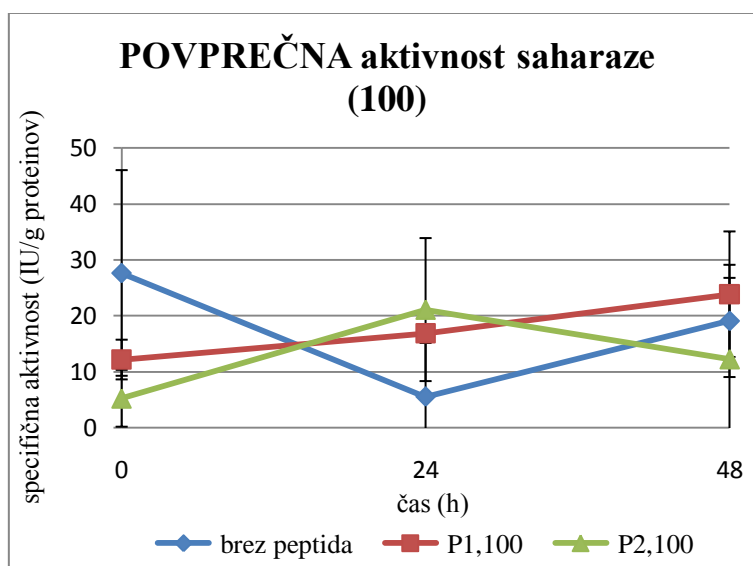
Graf 7: Spreminjanje aktivnosti saharaze v posameznih kulturah podganjih epiteljskih celic (kulture PT4, PT5, PT6) ozkega črevesa s P1 in P2 konc. 100 µg/mL in brez peptida



Graf 8: Normalizirano povprečno spreminjanje aktivnosti saharaze med kultiviranjem podganjih epiteljskih celic ozkega črevesa s P1 in P2 konc. 100 µg/mL in brez peptida



Graf 9: Dejansko povprečno spreminjanje aktivnosti saharaze med kultiviranjem podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa s P1 in P2 konc. 100 µg/mL in brez peptida



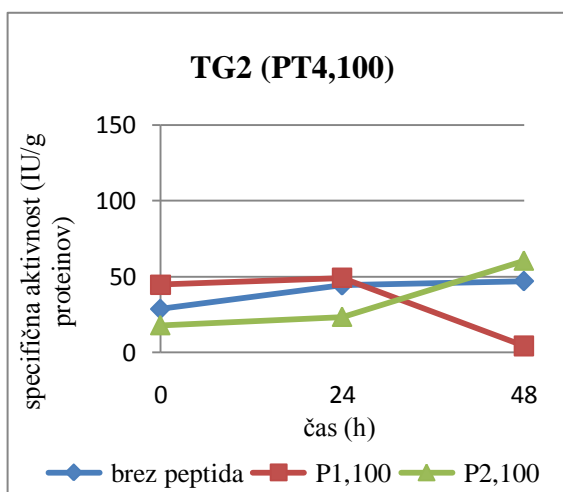
Grafi normaliziranih povprečnih aktivnosti saharaze se ujemajo z grafi dejanskih povprečnih vrednostih. V kulturah brez peptidov je porastu števila celic med 24h in 48h sledilo tudi naraščanje aktivnosti saharaze, medtem ko tega sozvočja ni v kulturah z dodanima P1/100 ali P2/100. To smo ugotovili že pri aktivnosti maltaze, vzrok pa je verjetno spet, da povečani proliferaciji sledi manjša diferenciacija do enterocitov in večja do ostalih vrst epitelijskih celic ozkega črevesja, ki nimajo disaharidaznih aktivnosti.

Vpliv na aktivnost tkivne transglutaminaze (TG2)

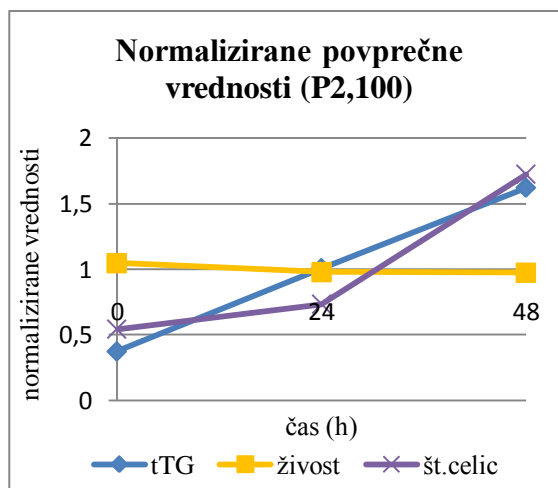
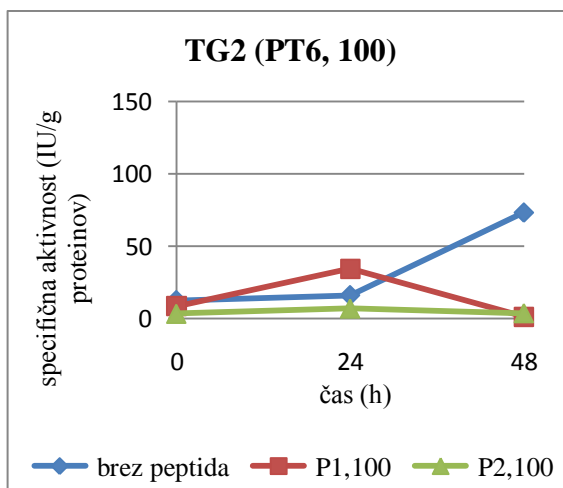
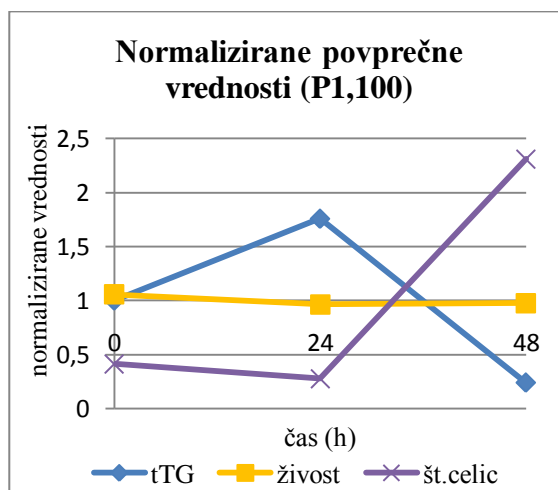
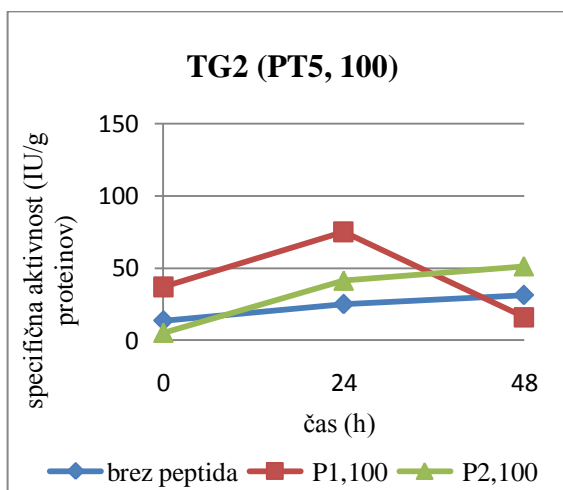
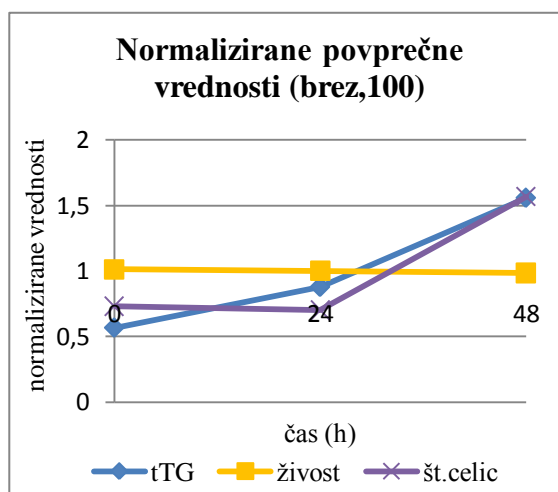
Tabela 9: Aktivnost TG2 v podganjih epitelijskih celicah ozkega črevesa tekom 48 urnega kultiviranja s pentapeptidoma P1 in P2 konc. 100 µg/mL in brez peptida

kultura	Aktivnost TG2 (IU/g proteinov)								
	Brez peptida			P1,100			P2,100		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
PT4	28,71	44,19	46,98	44,70	49,13	4,30	17,88	23,42	60,45
PT5	13,71	25,05	31,30	39,97	75,06	16,07	5,30	41,30	51,29
PT6	12,58	16,05	73,24	8,54	34,38	1,30	3,38	7,05	3,82
povp±SD	18,33	28,43	50,51	30,07	52,85	7,22	8,85	23,92	38,52
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	9,00	14,37	21,19	19,04	20,60	7,81	7,88	17,13	30,40

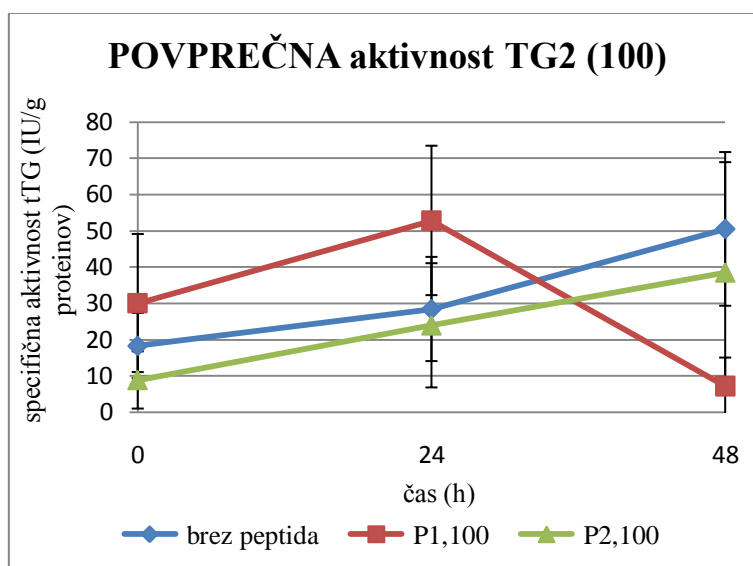
Graf 10: Spreminjanje aktivnosti TG2 v posameznih kulturah podganih epiteljskih celic (kulture PT4, PT5, PT6) ozkega črevesa s P1 in P2 konc. 100 µg/mL in brez peptida



Graf 11: Normalizirano povprečno spreminjanje aktivnosti TG2 med kultiviranjem podganih epiteljskih celic ozkega črevesa s P1 in P2 konc. 100 µg/mL in brez peptida



Graf 12: Dejansko povprečno spreminjanje aktivnosti TG2 med kultiviranjem podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa s P1 in P2 konc. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in brez peptida



V grafih 10 vidimo, da aktivnost TG2 v vseh treh kulturah PT4, PT5, PT6 brez dodanega peptida po 24h in po 48h naraste, vendar pri 5% tveganju ta dvig ni statistično značilen. Po 24h naraste tudi aktivnost TG2 v vseh kulturah z P1/100 in P2/100, vendar ne statistično značilno. V vseh treh kulturah z P1/100 aktivnost TG2 po 48h pade pod vrednost aktivnosti ob času 0h, ampak tudi ta padec ni statistično značilen. V kulturah PT4 in PT5 z P2/100 aktivnost TG2 po 48h še vedno narašča, razen v kulturi PT6 pade na vrednost podobno začetni.

Iz grafa 12 vidimo, da po 24h pride do dviga aktivnosti TG2, najbolj naraste v kulturah z P1/100, sicer pa ni nobenih razlik v vplivu peptidov na TG2, če jih primerjamo med sabo ali s kulturami, kjer nismo dodali peptida. Pride pa do statistično značilnih razlik po 48h. Testiranje razlik aktivnosti TG2 ob času 48h in 0h z enofaktorsko Anovo je pokazal, da med skupinami kultur brez peptida, z P1/100 in P2/100 obstaja statistično značilna razlika ($p=0,041 < 0,05$) pri 5% tveganju. Kljub temu nam test Bonferoni ni pokazal statistično značilnega vpliva pri 5% tveganju. Rezultati tega testa so bili, da se med sabo pri 10% tveganju razlikuje učinek P1/100 na aktivnost TG2 v primerjavi z kulturami brez peptida ($p=0,074$) in da so razlike tudi v vplivu peptida P1 in P2 ($p=0,088$). V kulturah z dodanim P1/100 namreč aktivnost TG2 pade po 48h, medtem ko v kulturah z dodanim P2/100 še vedno narašča. V tem primeru bi lahko rekli, da ima P1 pri koncentraciji 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bolj protektiven vpliv kot P2. Dobljene rezultate testov Anove in Bonferonija razlagamo tako: peptida imata nekakšen vpliv na TG2, vendar pa je vzorec premajhen, da bi se statistično značilne razlike pokazale tudi med posameznimi skupinami kultur z P1/100, P2/100 in

brez peptida. Vsekakor pa ne moremo reči, da ima P2/100 negativen vpliv na podganje epitelijske celice ozkega črevesa, ki bi se kazal preko povišanja TG2, saj ni statistično značilnih razlik med kulturami brez peptida in z P2/100.

4.1.2 Spremljanje vplivov gliadinskih pentapeptidov p39-43 (P1) in p51-55 (P2) koncentracije 200 µg/mL na podganje enterocite

V kulturah enterocitov dobljenih iz istih podgan kot zgoraj (PT4, PT5, PT6) smo preučevali morebiten vpliv istih peptidov tudi v koncentraciji 200 µg/mL. Prav tako smo spremljali živost in število celic ter aktivnosti maltaze, saharaze in TG2 ob času 0h (tako po dodatku P1 in P2 koncentracije 200 µg/mL), 24h in 48h. Pri statistični obdelavi podatkov smo ugotavljali, če imata peptida pri višji koncentraciji kakšen vpliv na podganje epitelijske celice, če se le-ta razlikuje med njima ali pa glede na kulture brez dodanih peptidov.

Vpliv na živost in število celic podganjih epitelijskih celic

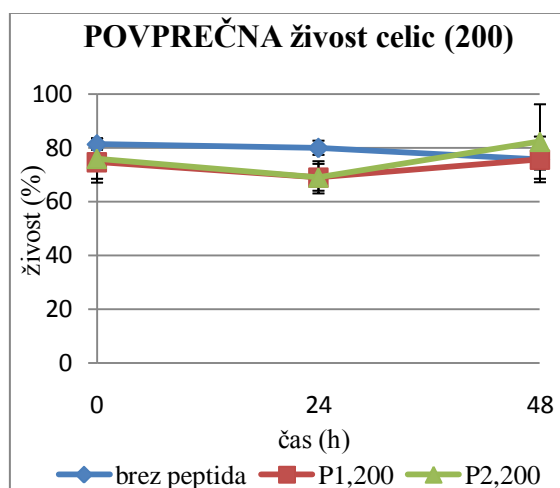
Tabela 10: Živost podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa tekom 48 urnega kultiviranja s pentapeptidoma P1 in P2 konc. 200 µg/mL in brez peptida

kultura	Živost (%)								
	Brez peptida			P1,200			P2,200		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
PT4	79	83	73	73	69	76	77	64	86
PT5	83	79	74	83	75	84	83	74	67
PT6	82	78	80	68	63	67	68	69	94
Povp	81,33	80	75,67	74,67	69	75,67	76	69	82,33
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
SD	2,08	2,65	3,79	7,64	6	8,51	7,55	5	13,87

Iz grafov³ lahko vidimo, da v dveh kulturah brez peptida po 24h živost pade in v eni naraste, medtem ko po 48h pade živost v vseh treh kulturah brez peptida, vendar ne statistično značilno. V kulturah z P1/200 pa lahko pri 5% tveganju rečemo, da živost po 24h pade statistično značilno, vendar se po 48h spet dvigne. V dveh kulturah z P2/200 živost po 24h pade, po 48h pa se zopet dvigne. Le v kulturi PT5 pada skozi celih 48h kultiviranja. Lahko torej vidimo, da se živost med posameznimi kulturami precej razlikuje in da nimajo enotnega trenda. K temu je lahko pripomogla izolacija različnih vrst epitelijskih celic. V eni kulturi je bilo mogoče zajetih več izvornih celic, ki nadomeščajo odmrle. Ko se torej živost zniža, je to signal za proliferacijo in kasneje diferenciacijo celic.

³ Živost celic za posamezne kulture podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa med 48 urnim kultiviranjem prikazuje graf 48, Priloge, str. II.

Graf 13: Povprečno spreminjanje živosti med kultiviranjem podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa s P1 in P2 konc. 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in brez peptida

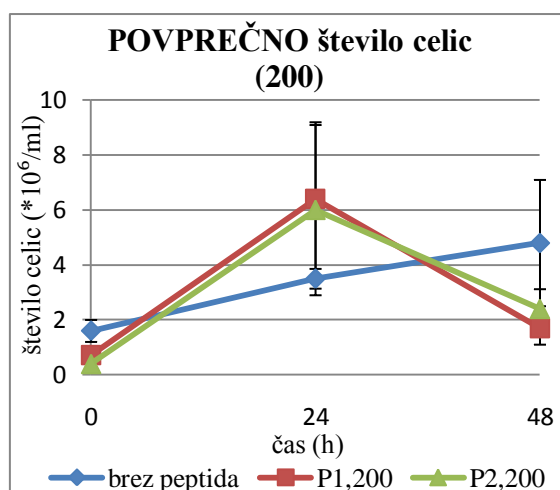


Graf 13 nam kaže, da v povprečju pri kulturah z P1/200 in P2/200 po 24h živost pade, nato pa se spet dvigne. V kulturah brez peptida pa pada tako po 24h kot po 48h. Ko smo med sabo primerjali posamezne skupine kultur z P1/200, P2/200 in brez peptida, smo ugotovili, da med njimi ni razlik. Torej lahko zaključimo, da P1 in P2 pri koncentracije 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ po 48h kultiviranja, ne vplivata na živost celic.

Tabela 11: Število podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa tekom 48 urnega kultiviranja s pentapeptidoma P1 in P2 konc. 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in brez peptida

kultura	Število celic (celice/ml)								
	Brez peptida			P1,200			P2,200		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
PT4	$1,8 \cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^6$	$7,5 \cdot 10^6$	$9,8 \cdot 10^5$	$9,5 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^6$
PT5	$1,1 \cdot 10^6$	$3,9 \cdot 10^6$	$3,5 \cdot 10^6$	$5,6 \cdot 10^5$	$5,6 \cdot 10^6$	$2,3 \cdot 10^6$	$3,4 \cdot 10^5$	$8,7 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^6$
PT6	$1,8 \cdot 10^6$	$3,4 \cdot 10^6$	$3,5 \cdot 10^6$	$5,8 \cdot 10^5$	$4,1 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^6$	$6,9 \cdot 10^5$	$6,6 \cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^6$
Povp	$1,6 \cdot 10^6$	$3,5 \cdot 10^6$	$4,8 \cdot 10^6$	$7,1 \cdot 10^5$	$6,4 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^5$	$6 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^6$
\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
SD	$4,0 \cdot 10^5$	$3,6 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^5$	$3,1 \cdot 10^6$	$7,2 \cdot 10^5$

Graf 14: Povprečno spreminjanje števila celic med kultiviranjem podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa s P1 in P2 konc. 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in brez peptida



Že iz grafov*⁴ je razvidno, da v vseh kulturah brez in z P1/200 in P2/200 po 24h pride do povečanega števila celic. Ta porast je pri 5% tveganju statistično značilen za kulture brez peptida ($p=0,048 < 0,05$), pri 10% pa tudi za kulture z P1/200 in P2/200 ($p(\text{P1},200)= 0,06$; $p(\text{P2},200)= 0,08$). Po 48h v kulturah z P1/200 in P2/200 število celic sicer pade, vendar je še vedno višje od začetne vrednosti. Ko smo s parnim t-testom ugotavljali razliko med številom celic ob času 0h in 48h v kulturah z P2/200, smo dobili statistično značilno razliko ($p=0,017 < 0,05$). To pomeni da je pri 5% tveganju število celic po 48h statistično značilno večje kot ob času 0h. V kulturi PT4 in PT6 brez peptida po 48h število celic še vedno narašča, medtem ko pri PT5 pada.

Iz grafa 14 vidimo, da v povprečju število celic v kulturah brez peptida konstantno narašča tekom 48h, medtem ko se v kulturah z P1/200 in P2/200 po 24h približno isto poveča, nato pa po 48h pade na podobno vrednost. Statistično značilnih razlik med skupinami kultur brez in z P1 in P2 konc. 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ni, torej nobeden od dodanih peptidov ne vpliva na število celic.

Vpliv na aktivnost maltaze in saharaze

Tudi tukaj smo za izračun specifičnih aktivnosti maltaze in saharaze potrebovali koncentracijo proteinov, ki smo jo izračunali iz že zgoraj napisane enačbe (graf 3). V tabeli 12 so predstavljene izračunane koncentracije proteinov.

⁴ Število celic za posamezne kulture podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa med 48 urnim kultiviranjem prikazuje graf 49, Priloge, str. II.

Tabela 12: Koncentracija proteinov v kulturah podganjih epitelijskih celic s pentapeptidoma P1 in P2 konc. 200 µg/mL in brez peptida

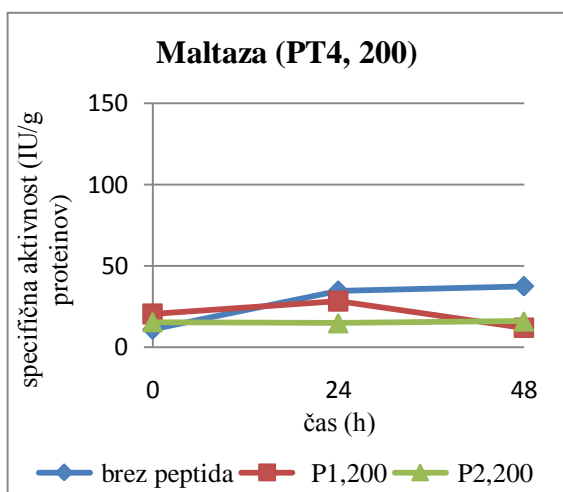
kultura	Koncentracija proteinov (g/l)								
	Brez peptida			P1,200			P2,200		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
PT4	0,0164	0,0189	0,0146	0,0102	0,0101	0,0193	0,0114	0,0167	0,016
PT5	0,0179	0,0163	0,0173	0,0117	0,0138	0,0168	0,0156	0,019	0,0183
PT6	0,0189	0,012	0,0158	0,0147	0,0039	0,0184	0,0205	0,0131	0,0183
Povp	0,0177	0,0157	0,0159	0,0122	0,0093	0,0182	0,0158	0,0163	0,0175
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
SD	0,0013	0,0035	0,0014	0,0023	0,005	0,0013	0,0046	0,0030	0,0013

Tabela 13: Aktivnost maltaze v podganjih epitelijskih celicah ozkega črevesa tekom 48 urnega kultiviranja s pentapeptidoma P1 in P2 konc. 200 µg/mL in brez peptida

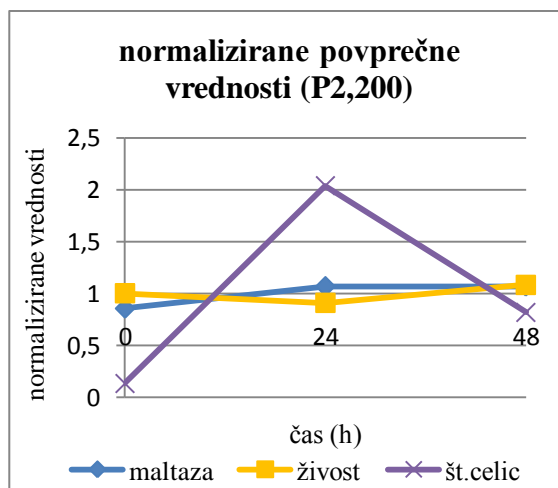
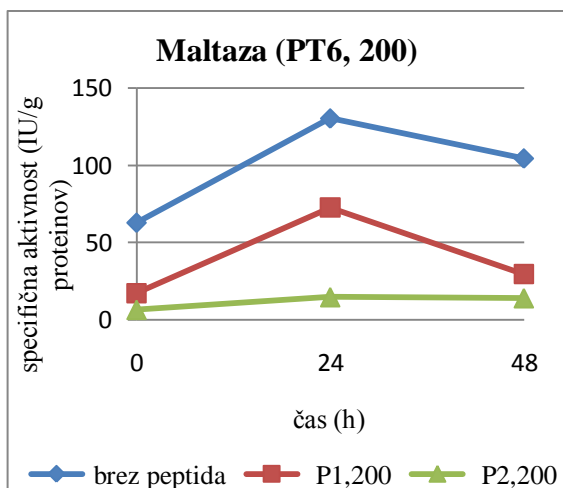
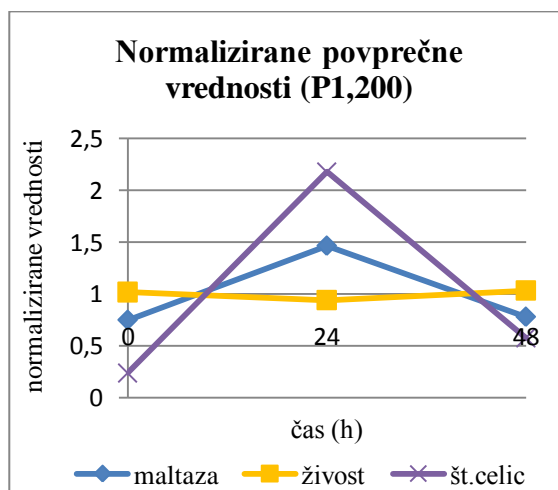
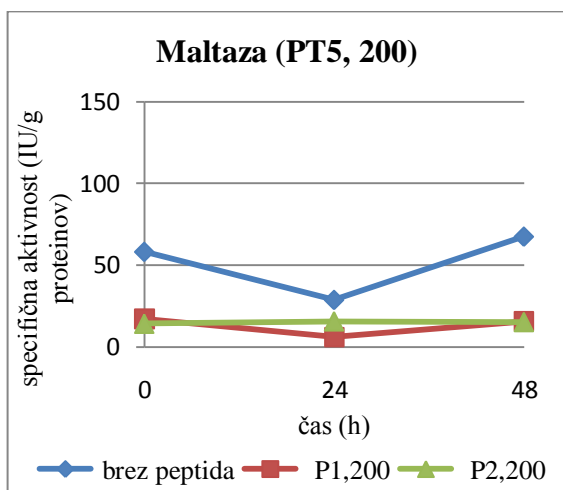
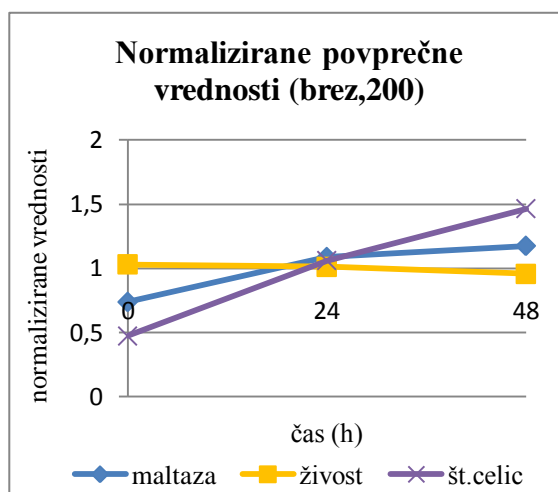
kultura	Aktivnost maltaze (IU/g proteinov)								
	Brez peptida			P1,200			P2,200		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
PT4	10,98	34,70	37,44	20,42	28,27	11,79	15,45	14,75	15,87
PT5	58,12	28,72	67,42	17,06	6,04	15,64	14,17	15,63	15,19
PT6	62,80	130,32	104,43	17,28	72,56	29,53	6,60	14,76	14,09
Povp	43,97	64,58	69,76	18,26	35,62	18,99	12,07	15,05	15,05
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
SD	28,67	57,01	33,56	1,88	33,87	9,33	4,79	0,51	0,90

Grafi 15 kažejo, da v kulturah PT4 in PT6 brez peptida po 24h pride do porasta aktivnosti maltaze, pri PT5 pa do padca. Pri kulturi PT5 brez peptida v naslednjih 24h aktivnost spet naraste, medtem ko pri kulturi PT6 po začetnem dvigu nato pade. V kulturi PT4 pa še vedno narašča. Iz tega lahko vidimo, da znotraj treh kultur, ki smo jih enako obravnavali (jim nismo dali peptida), prihaja do razlik, ki jih lahko pripišemo njihovim lastnim endogenim biološkim ritmom. Kulturi PT5 in PT6 z P1/200 imata podoben trend obnašanja kot kulturi brez peptida: začetnemu padcu sledi porast aktivnosti maltaze in obratno. V kulturi PT4 z P1/200 po 24h aktivnost maltaze naraste in nato spet pade. V vseh treh kulturah PT4, PT5, PT6 z P2/200 ne prihaja tekom 48urnega kultiviranja do izrazitih nihanj, saj aktivnost maltaze ostaja bolj ali manj ves čas na istih vrednostih. S parnim t-testom smo ugotovili, da znotraj posameznih skupin kultur brez in z P1 in P2 konc. 200 µg/mL med 48urnim kultiviranjem ne pride do statistično značilnih dvigov ali padcev aktivnosti maltaze.

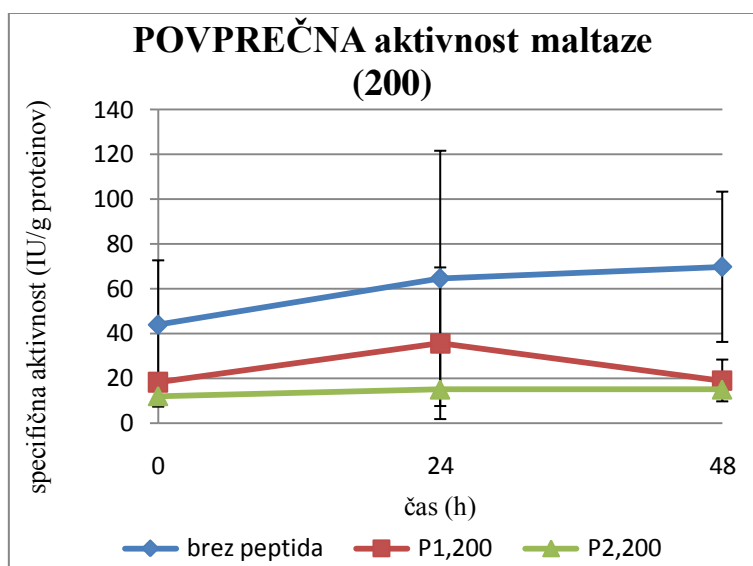
Graf 15: Spreminjanje aktivnosti maltaze v posameznih kulturah podganih epitelijskih celic (kulture PT4, PT5, PT6) ozkega črevesa s P1 in P2 konc. 200 µg/mL in brez peptida



Graf 16: Normalizirano povprečno spreminjanje aktivnosti maltaze med kultiviranjem podganih epitelijskih celic ozkega črevesa s P1 in P2 konc. 200 µg/mL in brez peptida



Graf 17: Dejansko povprečno spreminjanje aktivnosti maltaze med kultiviranjem podganjih epiteljskih celic ozkega črevesa s P1 in P2 konc. 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in brez peptida



Iz grafa 17 razberemo, da je povprečna aktivnost maltaze v kulturah brez peptida precej višja kot v ostalih kulturah in da tekom 48urnega kultiviranja ves čas raste, medtem ko v kulturah z P1/200 po 24h naraste in nato pade. V kulturah z P2/200 pa ostaja približno konstantna. Po 24h med skupinami ni razlik, do njih pri 5% tveganju ne pride niti po 48h, čeprav ob pogledu na graf 21 izgleda kot, da oba peptida znižata aktivnost maltaze. Lahko pa pri 10% tveganju ($p=0,065$) rečemo, da peptida vplivata na aktivnost maltaze po 48h. Vendar je pri statistični obdelavi spet problem premajhen vzorec, da bi iz njega lahko dobili statistično značilen rezultat in tako z večjo gotovostjo rekli, da P1 in P2 pri koncentraciji 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ po 48h povzročita znižanje aktivnosti maltaze.

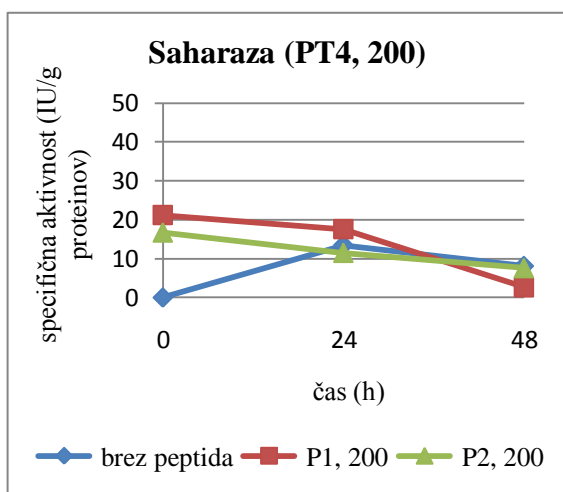
Grafi normaliziranih povprečnih vrednosti se ujemajo z grafi dejanskih povprečnih vrednosti. V kulturah z P1/200 povečanemu številu celic po 24h sledi tudi povečana aktivnost maltaze, zmanjšanju števila celic po 48h pa analogno znižanje aktivnosti maltaze. Tudi v kulturah brez peptida povečanje aktivnosti maltaze sledi povečanemu številu celic. Tega obnašanja ni opaziti pri kulturah z P2/200 in morda je to znak, da je nizka in ves čas enaka aktivnost maltaze res posledica dodanega P2 ali pa je v teh kulturah prisoten manjši delež enterocitov in večji delež ostalih vrst epiteljskih celic ozkega črevesa.

Tabela 14: Aktivnost saharaze v podganih epiteljskih celicah ozkega črevesa tekom 48 urnega kultiviranja s pentapeptidoma P1 in P2 konc. 200 µg/mL in brez peptida

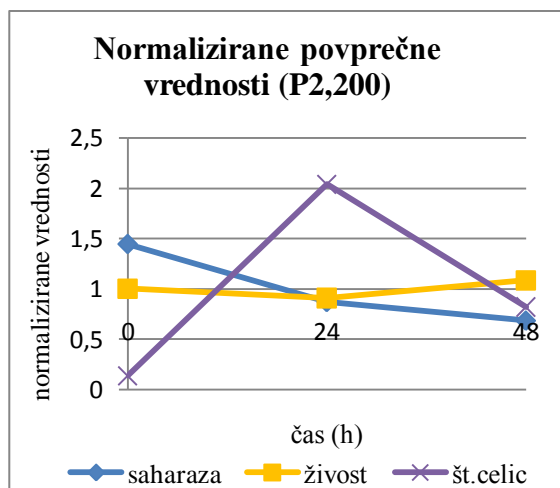
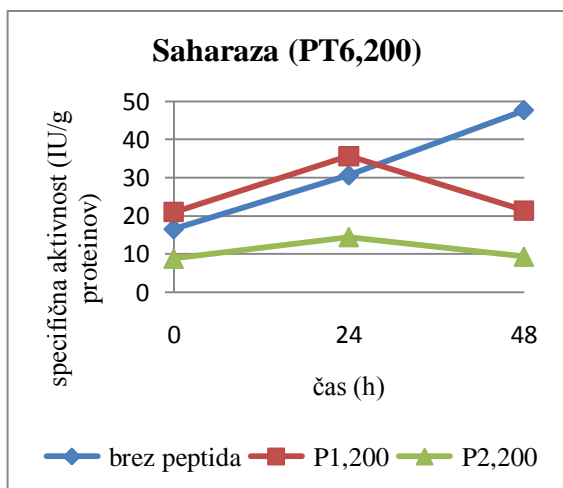
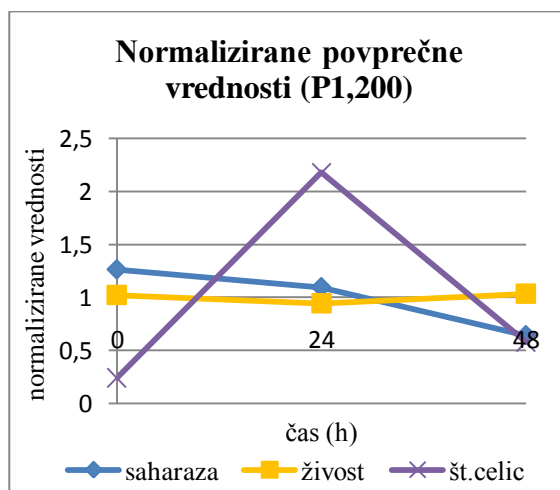
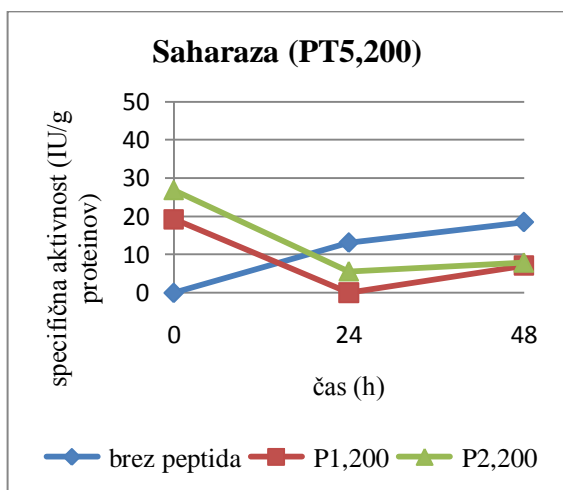
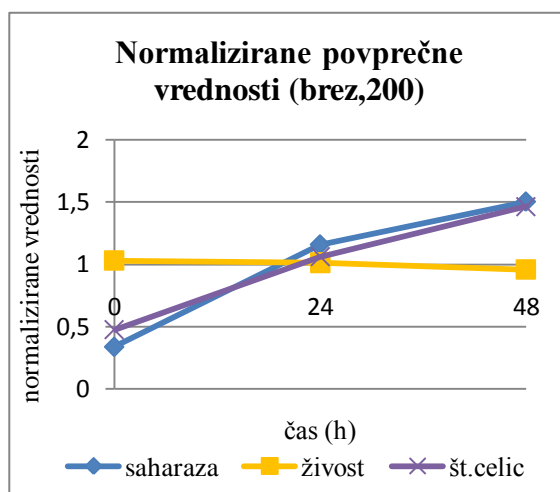
kultura	Aktivnost saharaze (IU/g proteinov)								
	Brez peptida			P1,200			P2,200		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
PT4	0	13,47	8,10	21,18	17,57	2,67	16,70	11,50	7,58
PT5	0	13,10	18,44	19,22	0	7,07	26,89	5,59	7,87
PT6	16,60	30,65	47,70	20,97	35,64	21,43	8,88	14,47	9,39
Povp	5,53	19,07	24,75	20,46	17,74	10,39	17,49	10,52	8,28
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
SD	9,59	10,03	20,54	1,08	17,82	9,81	9,03	4,52	0,97

Iz grafa 18 vidimo, da aktivnost saharaze v vseh treh kulturah PT4, PT5, PT6 brez peptida po 24h naraste in ta porast je pri 5% tveganju tudi statistično značilen ($p=0,0004 < 0,05$). Do zvišane aktivnosti saharaze pride zaradi ugodnega okolja kultiviranja, kjer ni prisotnih pankreatičnih encimov. Po 48h aktivnost še naprej narašča v kulturah PT5 in PT6, v kulturi PT4 pa rahlo pade. Zanimivo je, da se že začetne vrednosti aktivnosti saharaze, takoj ko smo dodali P1/200 in P2/200, razlikujejo znotraj posamezne kulture. Npr. aktivnost saharaze v PT4 in PT5 brez peptida je 0 IU/g proteinov, medtem ko je v istih kultur z dodanima P1 in P2 približno 20 IU/g proteinov. Razlog verjetno ni takojšen učinek peptidov, ampak naša premalo homogena razdelitev kultur na več delov. Tako smo ponekod zavzeli več, drugje pa premalo enterocitov, ki so nosilci disaharidaznih aktivnosti. V kulturi PT4 z P1/200 aktivnost ves čas pada, medtem ko pri kulturi PT5 začetnemu padcu aktivnosti sledi porast, obratno pa se zgodi pri kulturi PT6. Enak trend obnašanja posameznih kultur z P1/200 zasledimo tudi v kulturah z dodanim P2/ 200.

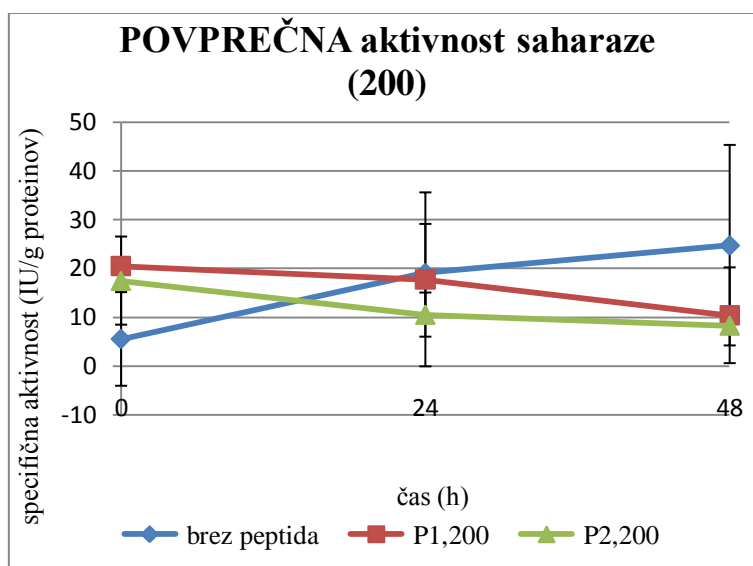
Graf 18: Spreminjanje aktivnosti saharaze v posameznih kulturah podganih epitelijskih celic (kulture PT4, PT5, PT6) ozkega črevesa s P1 in P2 konc. 200 µg/mL in brez peptida



Graf 19: Normalizirano povprečno spreminjanje aktivnosti saharaze med kultiviranjem podganih epitelijskih celic ozkega črevesa s P1 in P2 konc. 200 µg/mL in brez peptida



Graf 20: Dejansko povprečno spreminjanje aktivnosti saharaze med kultiviranjem podganjih epiteljskih celic ozkega črevesa s P1 in P2 konc. 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in brez peptida



Graf 20 nam prikazuje, da aktivnost saharaze v kulturah brez peptidov tekom 48urnega kultiviranja narašča, medtem ko v kulturah z P1/200 in P2/200 pada. Po 24h razlike med njimi niso statistično značilne, so pa po 48h. Povprečna vrednost razlik aktivnosti saharaze med 48h in 0h pri kulturah brez peptida je 19,21 IU/g proteinov, medtem ko je pri kulturah z P1/200 -10,07 IU/g proteinov in pri kulturah z P2/200 -9,21 IU/g proteinov. Iz teh števil je razvidno, da tako P1 kot P2 pri koncentraciji 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ po 48h povzročita padec aktivnosti saharaze, medtem ko le-ta v kulturah brez peptida naraste. Rezultati testa enofaktorske Anove in testa Bonferoni, nam to domnevo tudi potrjujejo ($p(\text{Anova})=0,022$; $p(\text{Bonferoni, brez peptida in P1,200})=0,04$; $p(\text{Bonferoni, brez peptida in P2,200})=0,045$). S 5% tveganjem torej lahko trdimo, da P1 in P2 pri koncentraciji 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ po 48h kultiviranja znižata aktivnost saharaze.

Grafi normaliziranih povprečnih vrednosti se ujemajo z grafi dejanskih povprečnih vrednosti. Naraščanje aktivnosti saharaze v kulturah brez peptida tudi usklajeno sledi naraščanju števila celic. Takšne skladnosti pa ni opaziti v kulturah z dodanima P1/200 in P2/200 po 24h kultiviranja, kar lahko pripišemo verjetno manjšemu deležu enterocitov.

Vpliv na aktivnost tkivne transglutaminaze

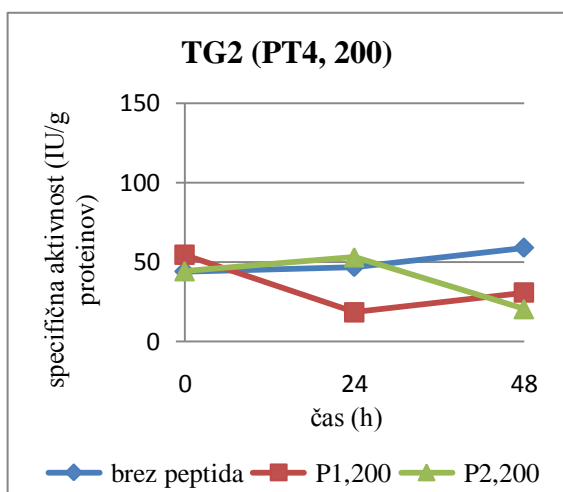
Tabela 15: Aktivnost TG2 v podganjih epitelijskih celicah ozkega črevesa tekom 48 urnega kultiviranja s pentapeptidoma P1 in P2 konc. 200 µg/mL in brez peptida

kultura	Aktivnost TG2 (IU/g proteinov)								
	Brez peptida			P1,200			P2,200		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
PT4	44,19	46,98	59,15	54,72	18,56	30,97	44,51	53,25	20,65
PT5	25,05	31,30	18,02	14,77	66,00	40,33	18,11	31,93	28,34
PT6	16,05	73,24	35,15	38,91	141,69	0	0,17	30,10	66,35
Povp	28,43	50,51	37,44	36,14	75,42	23,77	20,93	38,43	38,45
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
SD	14,37	21,19	20,66	20,12	62,10	21,11	22,31	12,87	24,47

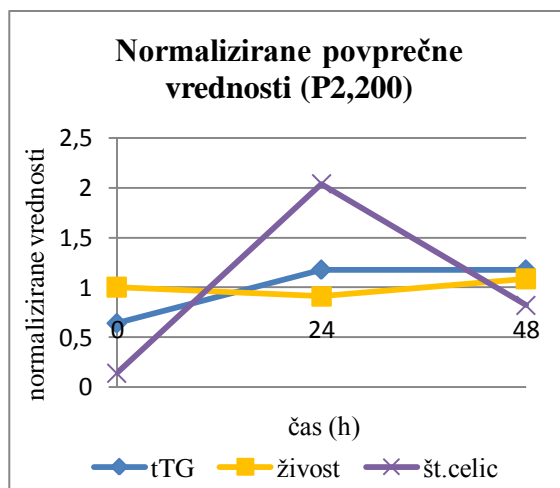
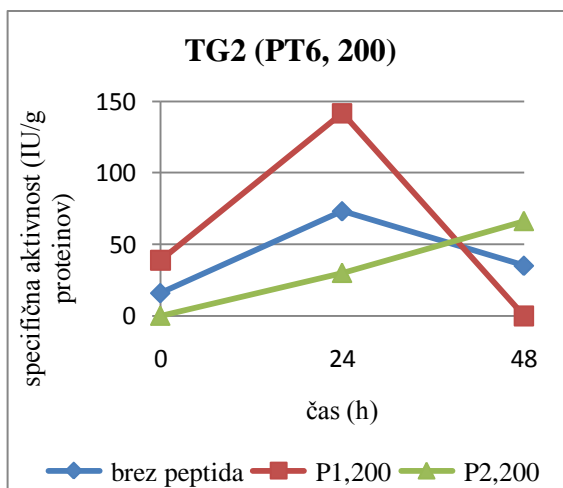
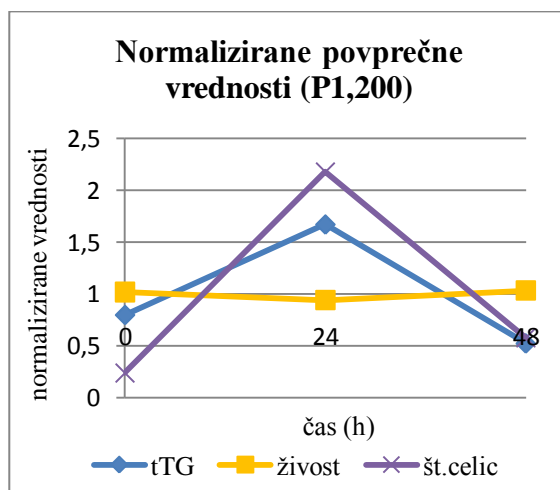
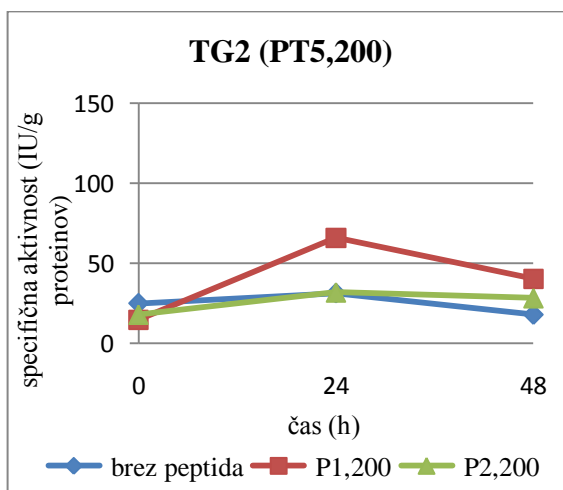
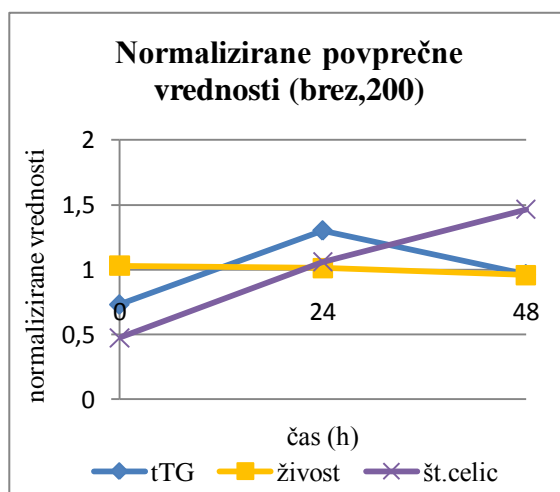
Grafi 21 nam kažejo, da v vseh treh kultur brez peptida po 24h aktivnost TG2 naraste, vendar ne statistično značilno. V nadaljnih 24h nato aktivnost TG2 pri PT5 in PT6 pade, pri kulturi PT4 pa še vedno narašča. V kulturah PT5 in PT6 z P1/200 po 24h pride do močnega povišanja aktivnosti TG2, ki pa nato začne padati. V kulturi PT4 z P1/200 se zgodi ravno obratno. V kulturah, ki smo jim dodali P2/200, po 24h pride do zvišane aktivnosti TG2, vendar pri 5% tveganju ta porast ni statistično značilen. V kulturah PT4 in PT5 pride nato do padca aktivnosti TG2, v kulturi PT6 pa po 48h še vedno narašča.

Že iz grafa 23 vidimo, da se skupine kultur brez in z P1/200 in P2/200 ne razlikujejo bistveno. Po 24h pri vseh pride do porasta aktivnosti, v nadaljnih 24h pri skupini z P1/200 pride do najbolj izrazitega znižanja aktivnosti TG2, pri skupini kultur brez peptida pa do manjšega padca aktivnosti. Aktivnost pri skupini z P2/200 do 48h še vedno narašča. Rezultati testa enofaktorska Anova so nam potrdili naše domneve: nobeden izmed dodanih pentapeptidov P1 in P2 pri koncentraciji 200 µg/mL ne vpliva na aktivnost TG2.

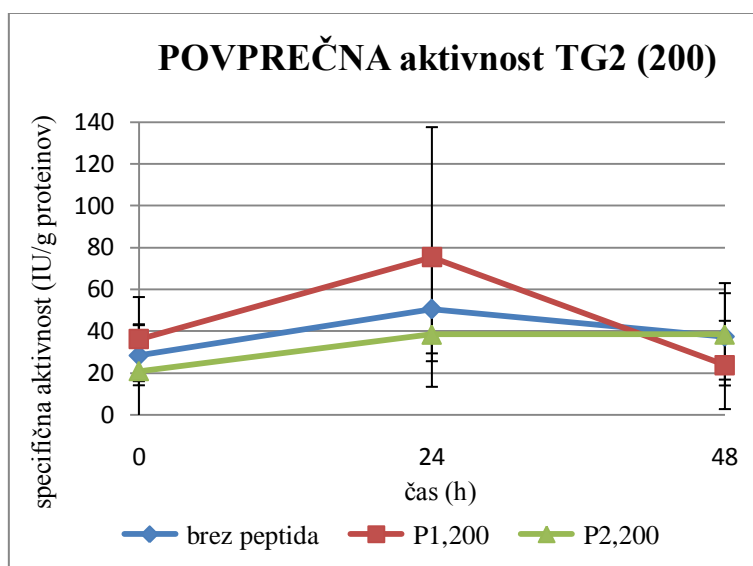
Graf 21: Spreminjanje aktivnosti TG2 v posameznih kulturah podganih epiteljskih celic (kulture PT4, PT5, PT6) ozkega črevesa s P1 in P2 konc. 200 µg/mL in brez peptida



Graf 22: Normalizirano povprečno spreminjanje aktivnosti TG2 med kultiviranjem podganih epiteljskih celic ozkega črevesa s P1 in P2 konc. 200 µg/mL in brez peptida



Graf 23: Dejansko povprečno spreminjanje aktivnosti TG2 med kultiviranjem podganjih epiteljskih celic ozkega črevesa s P1 in P2 konc. 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in brez peptida



4.2 Kultiviranje primarnih kultur humanih epiteljskih celic dvanajstnika

Biopte dobljene pri biopsiji ozkega in široke črevesa smo izolirali po opisanem postopku izolacije in jih nato shranili v tekočem dušiku. Nekatere vzorce dobljene iz dvanajstnika smo nato odmrznili in jih kultivirali z toksičnim peptidom p31-43 (TP) in brez peptida. Kultiviranje humanih epiteljskih celic dvanajstnika je zaradi lažjega dela potekalo v dveh delih. Pri prvem smo kultivirali vzorce H1, H8, H19, H29, v drugem delu pa vzorce H5, H10, H16, H24, H28 in H31. Ker je vzorec H1 dobljen iz bolnika s celiakijo, vzorca H5 in H10 pa iz bolnikov s Crohnovo boleznijo, smo te tri vzorce obravnavali posebej. Za vzorce H8, H19, H29, H16, H24, H28 in H31 smo predpostavili, da so dobljeni iz zdravega dvanajstnika, vendar se je potrebno zavedati njihove pogojne normalnosti, saj sta izključeni le celiakija in Crohnova bolezen, ne pa tudi druga črevesna obolenja.

4.2.1 Spremljanje vpliva toksičnega peptida p31-43 (TP) na »zdrave« humane epiteljske celice dvanajstnika

Vsako kulturo dobljeno iz vzorcev H8, H19, H29, H16, H24, H28 in H31 smo razdelili na dva dela. Enemu nismo dodali ničesar in smo ga obravnavali kot kontrolo, drugemu pa smo dodali p31-43 (TP) v koncentraciji 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Nato smo ob času 0h (takoj po dodatku TP) in 48h spremljali živost in število celic ter aktivnosti maltaze, saharaze in

tkivne transglutaminaze. Vpliv TP so že preučevali pri mišjih in podganjih enterocitih, kjer so spremljali iste parametre. Naše rezultate bomo torej primerjali z njimi in poskušali ugotoviti primernost mišjih in podganjih modelov z humanimi. Potrebna pa je pazljivost pri rezultatih dobljenimi z mišjimi enterociti, saj tam niso uporabili kontrolnih kultur in tudi uporabljeni testi statistike se razlikujejo od naših. V teh pogledih pa ni razlik z podatki dobljenimi pri kultiviranju podganjih enterocitov z TP.

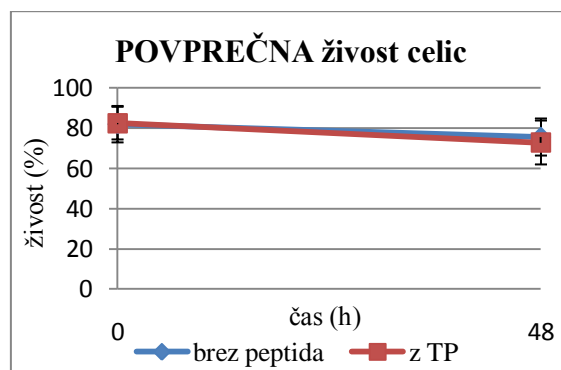
Vpliv na živost in število celic humanih enterocitov

Tabela 16: Živost v kulturah humanih "zdravih" epiteljskih celicah dvanajstnika tekom 48 urnega kultiviranja z TP in brez peptida

Kulture	Živost celic (%)			
	Brez peptida		Z toksičnim peptidom	
	0h	48h	0h	48h
H8	71	68	72	69
H16	71	71	72	72
H19	86	71	86	59
H24	94,7	90	93,4	93
H28	82	77	82	66
H29	79	66	83	71
H31	90	86	89	80
Povp ± SD	81,96 ± 9,06	75,57 ± 9,22	82,49 ± 8,11	72,86 ± 10,92

H8/16/19/24/28/29/31 (oštevilčeni humani biopti dvanajstnika preiskovancev)

Graf 24: Povprečno spreminjanje živosti celic v posameznih kulturah "zdravih" humanih epiteljskih celic dvanajstnika s TP in brez peptida



Iz grafov ⁵vidimo, da živost celic v vseh kulturah po 48h pade, izjema je le kultura H16 z in brez peptida, kjer se ne spremeni. Ta padec živosti je tudi statistično značilen ($p(\text{brez peptida}) = 0,02$; $p(\text{z TP}) = 0,04$), zato lahko s 5% tveganjem rečemo, da živost v kulturah z

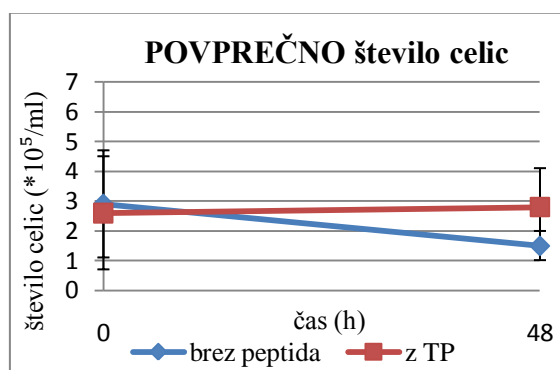
⁵ Živost celic za posamezne kulture humanih epiteljskih celic dvanajstnika med 48 urnim kultiviranjem prikazuje graf 50, Priloge, str. III.

dodanim TP in brez peptida po 48h pade. Iz grafa 24 razberemo, da se živost skupin kultur, ki smo jim dodali TP, ne razlikuje od živosti celic v skupini kultur, ki jim nismo dodali ničesar. To domnevo nam potrdi tudi t-test za neodvisne vzorce. Dodan toksičen peptid ob daljšem času kultiviranja torej ne vpliva na živost celic, kar so ugotovili že pri mišjih in podganjih enterocitih (76, 82).

Tabela 17 : Število celic v kulturah humanih "zdravih" epiteljskih celicah dvanajstnika tekom 48 urnega kultiviranja z TP in brez peptida

Kulture	Število celic (celice/ml)			
	Brez peptida		Z toksičnim peptidom	
	0h	48h	0h	48h
H8	$1,6 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^5$	$3,3 \cdot 10^5$
H16	$2,1 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	$4,7 \cdot 10^5$
H19	$4,8 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^5$	$3,2 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^5$
H24	$3,3 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^5$	$3,3 \cdot 10^5$
H28	$2 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^5$
H29	$5,8 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^5$	$6,7 \cdot 10^5$	$3,6 \cdot 10^5$
H31	$9 \cdot 10^4$	$7 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^5$	$7 \cdot 10^4$
Povp ± SD	$2,9 \cdot 10^5 \pm 1,8 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^5 \pm 4,9 \cdot 10^4$	$2,6 \cdot 10^5 \pm 1,9 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^5 \pm 1,3 \cdot 10^5$

Graf 25: Povprečno spreminjanje števila celic v posameznih kulturah "zdravih" humanih epiteljskih celic dvanajstnika s TP in brez peptida



*⁶Število celic v vseh kulturah brez peptida, razen H28, po 48h pade. Ta padec pri 5% tveganju ni statistično značilen, lahko pa pri 10% tveganju rečemo, da število celic statistično značilno pade po 48h v kulturah brez peptida ($p=0,08$). Tudi v štirih kulturah (H19, H28, H29, H31) z TP število celic po 48h pade, v preostalih pa se poveča. Na grafu 25 vidimo, da število celic v kulturah brez peptida v povprečju pade, medtem ko v kulturah z dodanim TP rahlo naraste, vendar ta razlika ni statistično značilna, kar pomeni, da TP ne vpliva na število celic. Do iste ugotovitve so prišli tudi pri kultiviranju podganjih epiteljskih celic z TP (82).

⁶ Število celic za posamezne kulture humanih epiteljskih celic dvanajstnika med 48 urnim kultiviranjem prikazuje graf 51, Priloge, str. IV.

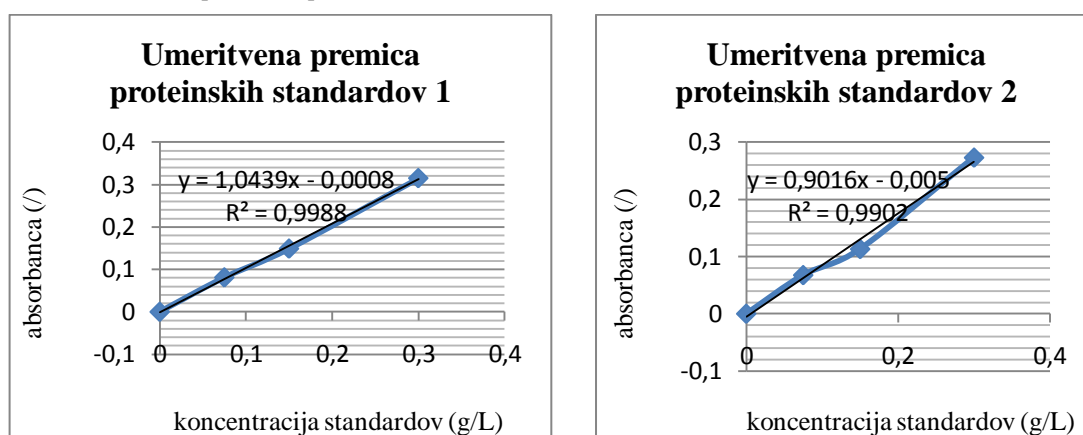
Vpliv na aktivnost maltaze in saharaze humanih enterocitov

Za izračun specifičnih aktivnosti maltaze in saharaze je potrebno vedeti koncentracije proteinov. Ker smo z humanimi vzorci delali v dveh delih, smo torej imeli dve umeritveni premici, po katerih smo izračunali koncentracije proteinov.

Tabela 18 : Absorbance proteinskih standardov (humani albumin)

Koncentracija standardov (g/L)	Ast(1)	Ast(2)	Ast(1)-Asl(1)	Ast(2)-Asl(2)
0,3	0,50745	0,4778	0,31495	0,2729
0,15	0,34145	0,318	0,14895	0,1131
0,075	0,27355	0,2724	0,08105	0,0675

Graf 26: Umeritvena premica iz proteinskih standardov



Koncentracijo proteinov pri vzorcih iz prvega dela smo računali iz enačbe: $A = 1,0439 \cdot c - 0,000$ ($R^2 = 0,9988$), iz drugega dela pa po enačbi $A = 0,9016 \cdot c - 0,005$ ($R^2 = 0,9902$).

Tabela 19 : Koncentracija proteinov v kulturah humanih "zdravih" epiteljskih celicah dvanajstnika tekom 48 urnega kultiviranja z TP in brez peptida

Kulture	Koncentracija proteinov (g/l)			
	Brez peptida		Z toksičnim peptidom	
	0h	48h	0h	48h
H8	0,017	0,0208	0,0135	0,0208
H16	0,021	0,012	0,017	0,014
H19	0,0167	0,0134	0,0004	0,0043
H24	0,017	0,014	0,021	0,011
H28	0,023	0,017	0,015	0,018
H29	0,0015	0,0097	0,0053	0,0135
H31	0,019	0,0194	0,028	0,016
povp±SD (vse vrednosti)	0,0165 ± 0,0070	0,0152 ± 0,0040	0,0143 ± 0,0093	0,0139 ± 0,0053
povp±SD (brez H29/H19)	0,019 ± 0,0026	0,0161 ± 0,0035	0,0189 ± 0,0058	0,0160 ± 0,0037

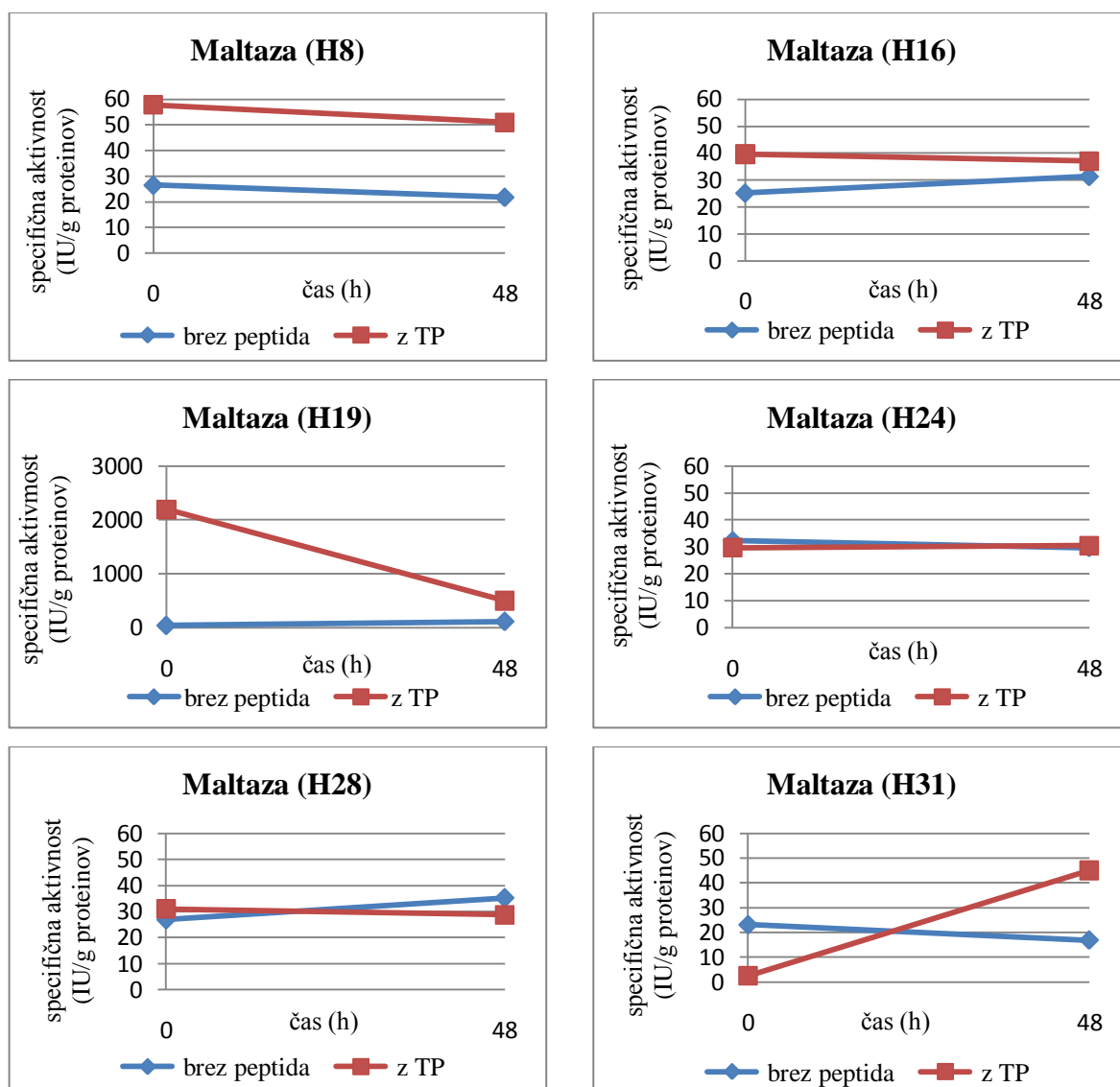
Iz tabele 19 vidimo, da so koncentracije proteinov zelo nizke v kulturi H29 z TP in brez peptida, ter v kulturi H19 z TP. Ker bi tako nizke koncentracije proteinov lažno povišale aktivnosti maltaze, saharaze in TG2, smo te vzorce izključili iz računanja povprečnih aktivnosti in tudi pri statistični obravnavi rezultatov smo jih izvzeli.

Tabela 20: Aktivnost maltaze v kulturah humanih "zdravih" epiteljskih celicah dvanajstnika tekom 48 urnega kultiviranja z TP in brez peptida

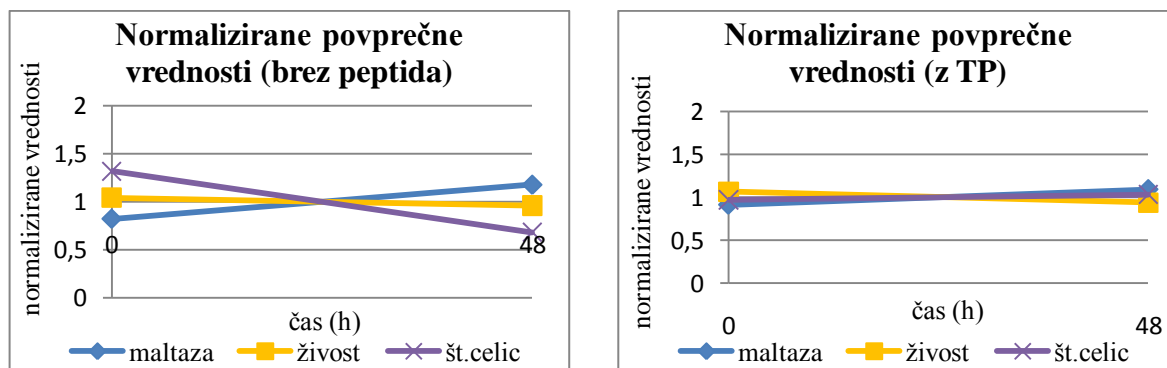
Kulture	Aktivnost maltaze (IU/g proteinov)			
	Brez peptida		Z toksičnim peptidom	
	0h	48h	0h	48h
H8	26,52	21,82	57,85	51,01
H16	25,21	31,39	39,63	37,02
H19	39,70	114,36	2195,45	498,24
H24	32,27	29,67	29,64	30,45
H28	26,92	35,23	31,02	28,80
H29	2351,7	280,11	802,9	190,79
H31	23,13	16,93	2,52	45,07
povp±SD (vse vrednosti)	360,78 ± 877,93	75,64 ± 96,05	451,29 ± 821,16	125,91 ± 173,89
povp±SD (brez H29/H19)	28,96 ± 6,07	41,57 ± 36,28	32,13 ± 20,01	38,47 ± 9,50

Graf kulture H29 ni predstavljen in ta vzorec smo v celoti izključili iz statistične obravnave, saj je vzrok zelo visokih aktivnosti maltaze nizka koncentracija proteinov. Graf kulture H19 je predstavljen, ker so v kulturi brez peptida normalne koncentracije proteinov in zato tudi primerne aktivnosti maltaze. Pri statistični obravnavi smo izključili le vzorec H19 z TP. Grafi 27 nam kažejo, da se v kulturah brez peptida aktivnost maltaze tekom 48urnega kultiviranja ne spreminja dosti, zaznamo le rahle vzpone ali padce. Do izrazitega povečanja aktivnosti maltaze pride le pri kulturi H19. Podobno se dogaja z kulturami, ki smo jim dodali TP. Do izrazito povečane aktivnosti po 48h pride le pri kulturi H31. Do teh razlik prihaja zaradi lastnih endogenih ritmov in verjetno tudi zaradi nehomogene razdelitve posameznih kultur na dva dela, ko smo enemu dodali TP drugemu pa ne. Aktivnosti maltaze se namreč pri kulturah H8, H16 in H31 razlikujejo že ob času 0h, ko bi praviloma morale biti še zelo podobne.

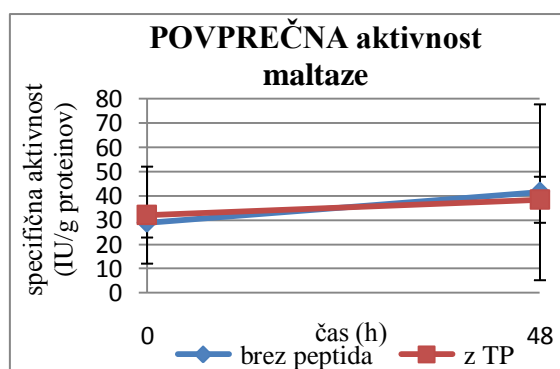
Graf 27: Spreminjanje aktivnosti maltaze v posameznih kulturah "zdravih" humanih epiteljskih celic dvanajstnika s TP in brez peptida tekom 48 urnega kultiviranja



Graf 28: Normalizirano povprečno spreminjanje aktivnosti maltaze v kulturah "zdravih" humanih epiteljskih celic dvanajstnika s TP in brez peptida



Graf 29: Dejansko povprečno spreminjanje aktivnosti maltaze v kulturah "zdravih" humanih epiteljskih celic dvanajstnika s TP in brez peptida

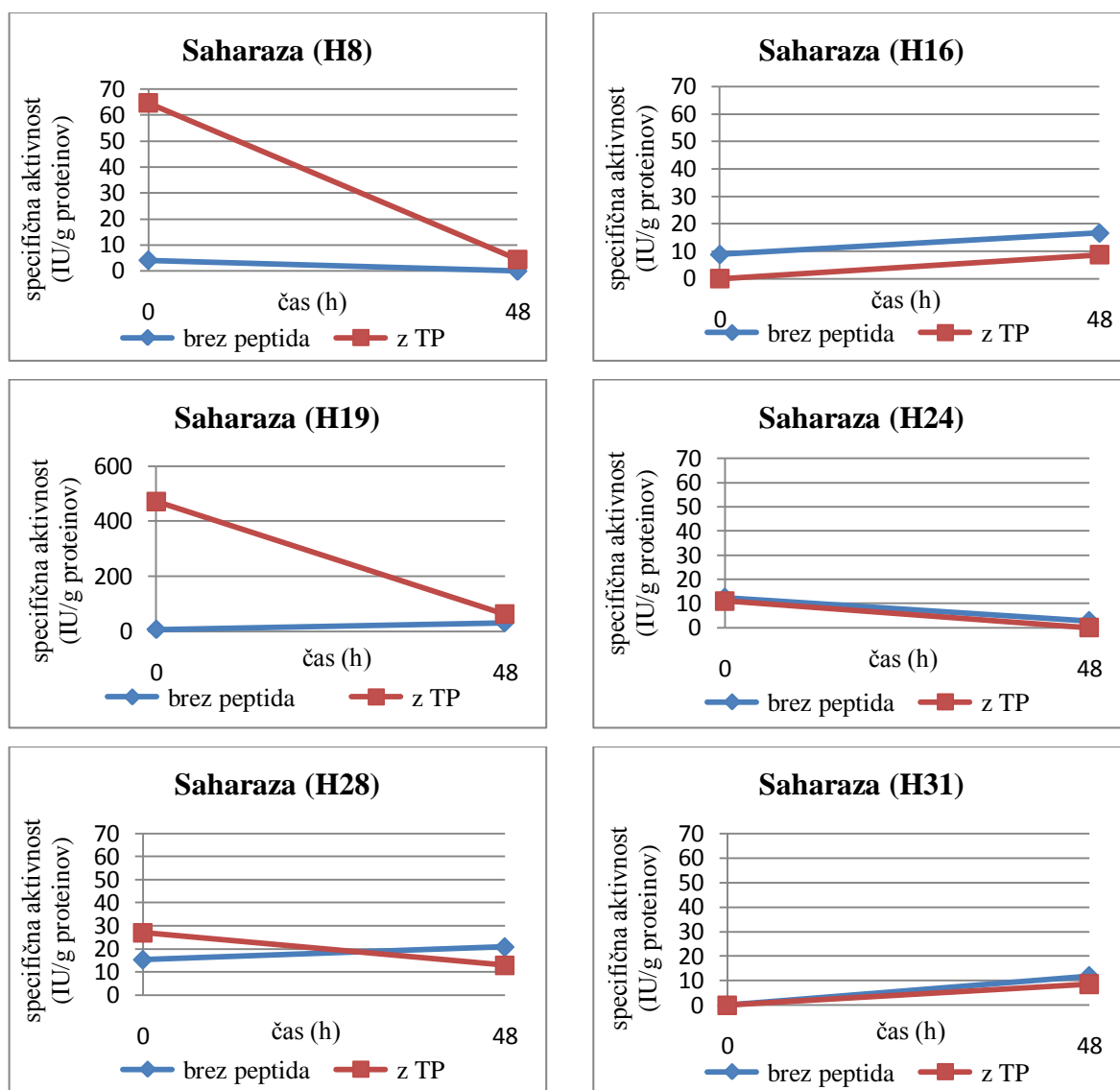


Na grafu 29 vidimo, da v povprečju aktivnost maltaze pri kulturah z in brez TP po 48h naraste. Pri kulturah brez peptida je ta porast sicer večji, vendar ni statistično značilen. Do povečane aktivnosti maltaze po 48h kultiviranja lahko pride zaradi ugodnejšega mikrookolja, kjer smo kultivirali celice, in odsotnosti pankreatičnih encimov. Tudi med skupinami kultur brez in z TP nismo ugotovili statistično značilnih razlik, zato lahko zaključimo, da TP nima vpliva na aktivnost maltaze v kulturah »zdravih« humanih epiteljskih celic dvanajstnika, kar so ugotovili že pri mišjih in podganjih enterocitih (76, 82). Graf normaliziranih povprečnih vrednosti se ujema z grafom dejanskih povprečnih vrednosti. V kulturah z TP se majhen dvig aktivnosti maltaze ujema z majhnim dvigom števila celic. V kulturah brez peptida temu ni tako, saj znižanju števila celic sledi povečana aktivnost maltaze. Odgovor zakaj je aktivnost maltaze, kljub znižanju števila celic narasla je lahko v tem, da med temi celicami prevladujejo enterociti.

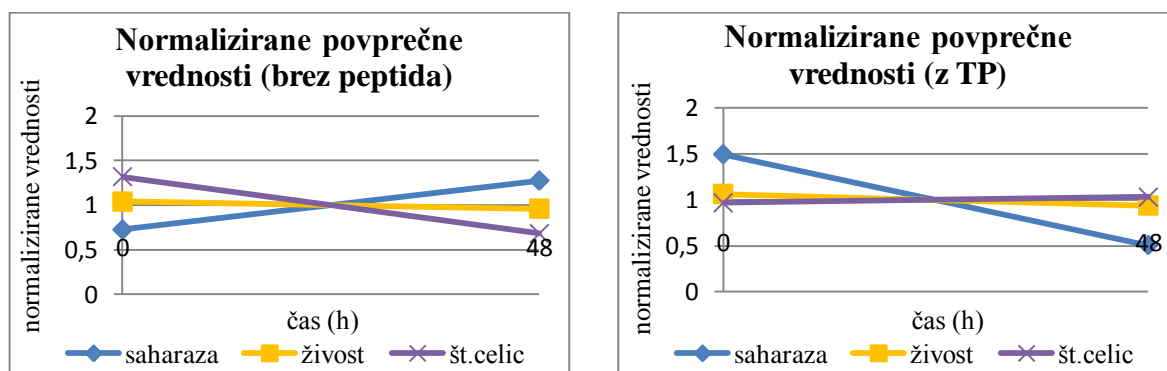
Tabela 21: Aktivnost saharaze v kulturah humanih "zdravih" epiteljskih celicah dvanajstnika tekom 48 urnega kultiviranja z TP in brez peptida

Kulture	Aktivnost saharaze (IU/g proteinov)			
	Brez peptida		Z toksičnim peptidom	
	0h	48h	0h	48h
H8	4,16	0	64,61	4,53
H16	8,86	16,63	0	8,74
H19	7,05	31,67	471,51	63,05
H24	12,46	2,76	11	0
H28	15,34	20,83	26,95	12,88
H29	565	59,55	206,84	56,79
H31	0	11,95	0	8,59
Povp ± SD (vse vrednosti)	87,55 ±210,60	20,48 ± 20,30	111,56 ±174,65	22,08 ±26,21
Povp ± SD (brez H29/H19)	7,98 ± 5,55	13,97 ± 11,77	20,51 ± 27,01	6,95 ± 4,88

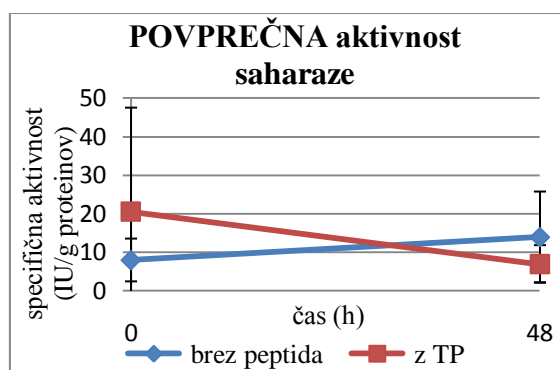
Graf 30: Spreminjanje aktivnosti saharaze v posameznih kulturah "zdravih" humanih epitelijskih celic dvanajstnika s TP in brez peptida med 48 urnim kultiviranjem



Graf 31: Normalizirano povprečno spreminjanje aktivnosti saharaze v kulturah "zdravih" humanih epitelijskih celic dvanajstnika s TP in brez peptida



Graf 32: Dejansko povprečno spreminjanje aktivnosti saharaze v kulturah "zdravih" humanih epiteljskih celic dvanajstnika s TP in brez peptida



Tudi tukaj smo izključili kulturi H29 z TP in brez peptida ter kulturo H19 z TP. Grafi 30 nam prikazujejo, da aktivnost saharaze v kulturah H8 in H24 brez peptida po 48h pade, v ostalih štirih pa se poveča. V kulturah, ki smo jim dodali TP po 48h pride do povečane aktivnosti saharaze v kulturi H16 in H31, medtem ko v ostalih treh pade. Znotraj posamezne skupine kultur z TP in brez peptida po 48h ne pride do statistično značilnega padca ali porasta aktivnosti saharaze. Nihanja aktivnosti saharaze so le posledica endogenih bioloških ritmov, ki jih disaharidaze izkazujejo tudi po izolaciji enterocitov v in vitro pogojih, razlike med posameznimi kulturami pa so le posledica biološke variabilnosti med kulturami. Pri kulturi H8 je velika razlika v vrednosti saharaze v kulturi z TP in brez peptida že ob času 0h, ko bi praviloma morali biti podobni. Vzrok tej razliki je nehomogena razdelitev vzorca H8 na začetku kultiviranja in tako smo v delu, ki smo mu nato dodali TP, zavzeli več enterocitov, kot v delu, ki mu nismo dodali peptida.

Na grafu 32 vidimo, da aktivnost saharaze v kulturah brez peptida po 48h naraste, medtem ko v kulturah z TP pade. Pri ugotavljanju ali ima TP kakšen vpliv na aktivnost saharaze smo z t-testom za neodvisne vzorce med sabo primerjali razliko v aktivnosti saharaze 48h-0h pri kulturah z TP in brez peptida. Izračunan $p=0,07$ (enostransko tveganje: zanj smo se odločili, ker je že bilo dokazano, da TP povzroči znižanje aktivnosti saharaze) pomeni, da pri 5% tveganju ne moremo govoriti o statistično značilni razliki. Lahko pa z 10% tveganjem rečemo, da TP po 48h vpliva na znižanje aktivnosti saharaze. Takšen je tudi vpliv TP na mišje enterocite, vendar že pri 5% tveganju (76). Tukaj pa je potrebno spomniti na dejstvo, da pri tej diplomski nalogi niso imeli kontrolnih vzorcev, prav tako so uporabili drugačno statistično metodo. Ni pa imel TP vpliva na aktivnost saharaze podganjih enterocitov (82). Tukaj so uporabili iste statistične teste in tudi kontrolne vzorce, zato so naši rezultati bolj primerljivi z njihovimi.

Vpliv na aktivnost tkivne transglutaminaze humanih enterocitov

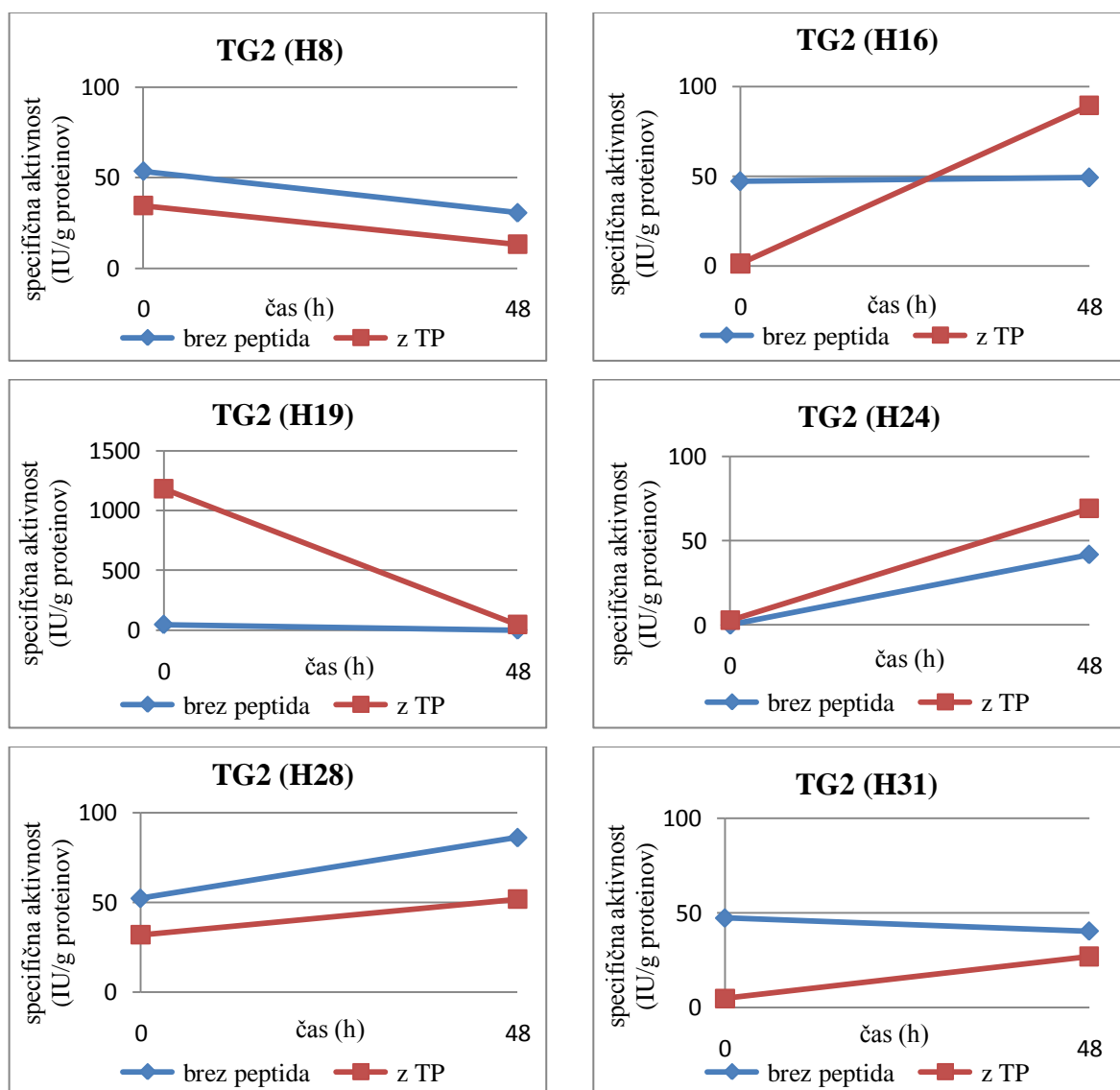
Tabela 22 : Aktivnost TG2 v kulturah humanih "zdravih" epitelijskih celicah dvanajstnika tekom 48 urnega kultiviranja z TP in brez peptida

Kulture	Aktivnost tkivne transglutaminaze (IU/g proteinov)			
	Brez peptida		Z toksičnim peptidom	
	0h	48h	0h	48h
H8	53,67	30,70	34,70	13,41
H16	47,24	49,28	1,35	89,40
H19	46,43	0	1182,38	47,01
H24	0	41,83	2,85	69,14
H28	52,46	86,35	32,17	52,01
H29	796,08	4,62	101,85	12,21
H31	47,51	40,56	4,88	27,10
povp±SD (vse vrednosti)	149,06 ± 285,92	36,19 ± 29,08	194,31 ± 437,11	44,33 ± 28,86
povp±SD (brez H29/H19)	41,22 ± 20,41	41,45 ± 27,97	15,19 ± 16,73	50,21 ± 30,77

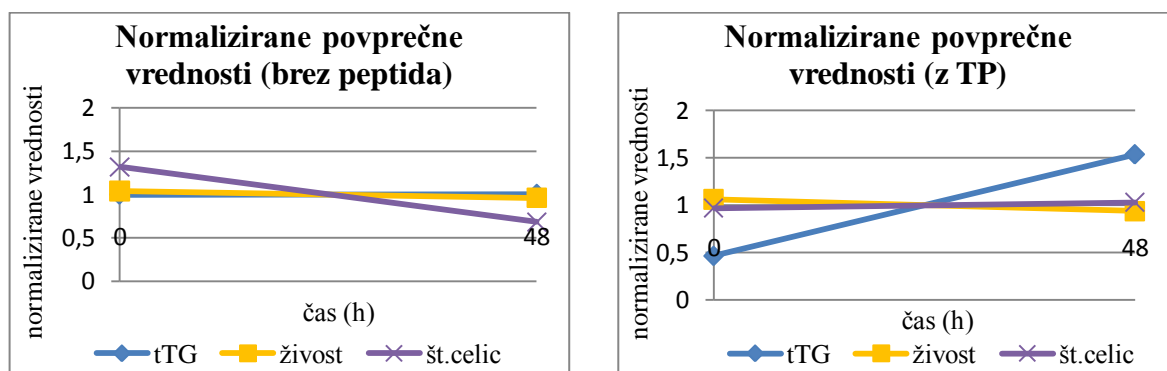
Tudi pri obravnavi aktivnosti TG2 smo izključili kulture H29 z TP in brez peptida ter H19 z TP. V kulturah brez peptida se aktivnost TG2 po 48h izrazito poveča le pri H24 in H28, medtem ko v kulturah H8, H19 in H31 pade. Kulturam, ki smo jim dodali TP, pa pride do znižanja aktivnosti TG2 le v eni kulturi H8, v vseh ostalih štirih H16, H24, H28 in H31 se aktivnost TG2 po 48h poveča. Ta porast je tudi statistično značilen, vendar pri 10% tveganju (p (enostransko tveganje) = 0,07).

Graf 35 nam prikazuje, da se aktivnost TG2 v kulturah z TP po 48h v povprečju dvigne za 35 IU/g proteinov, medtem ko se v kulturah brez peptida ne spremeni. Iz tega bi lahko sklepali, da TP povzroči povečano aktivnost TG2. Rezultat t-testa za neodvisne vzorce (p (enostransko tveganje) = 0,08 pomeni, da o statistično značilni razliki med skupinami kultur brez in z TP, lahko govorimo šele pri 10% tveganju. V prejšnjih diplomskih nalogah so že ugotovili, da TP povzroči povečano aktivnost TG2 pri mišjih in podganjih enterocitih po 48h (76, 82). Če vzamemo 10% tveganje lahko tudi mi rečemo, da TP po 48h poveča aktivnost TG2 v humanih enterocitih. Ti trije zaključki pa nasprotujejo dejstvu, da bi naj bila TG2 povečana le pri bolnikih celiakije, ne pa tudi pri zdravih posameznikih. Vendar je treba poudariti, da so humani vzorci le pogojno zdravi. Vprašanje pa je, zakaj se aktivnost TG2 poveča tudi pri mišjih in podganjih enterocitih, ki v bistvu predstavljajo normalen fiziološki model.

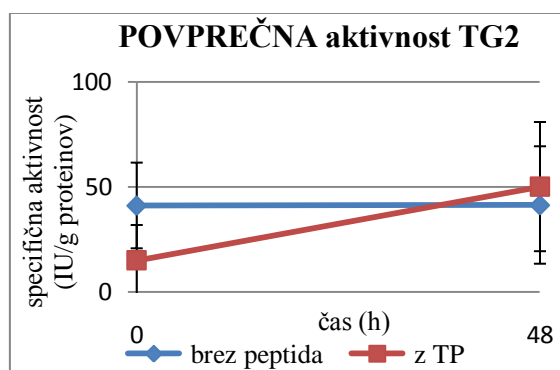
Graf 33: Spreminjanje aktivnosti TG2 v posameznih kulturah "zdravih" humanih epiteljskih celic dvanajstnika s TP in brez peptida med 48 urnim kultiviranjem



Graf 34: Normalizirano povprečno spreminjanje aktivnosti TG2 v kulturah "zdravih" humanih epiteljskih celic dvanajstnika s TP in brez peptida



Graf 35: Dejansko povprečno spreminjanje aktivnosti TG2 v kulturah "zdravih" humanih epiteljskih celic dvanajstnika s TP in brez peptida



4.2.2 Spremljanje vpliva toksičnega peptida p31-43 (TP) na humane epiteljske celice dvanajstnika bolnikov s Crohnovo boleznijo in celiakijo

Med humanimi biopiti smo dva dobili pri biopsiji bolnikov s Crohnovo boleznijo (CB), en vzorec pa pri biopsiji bolnika s celiakijo. Tudi te tri vzorce smo kultivirali na enak način kot »zdrave« ter spremljali iste parametre.

Vpliv na živost in število celic

Tabela 23 : Živost v kulturah humanih "bolnih" epiteljskih celicah dvanajstnika tekom 48 urnega kultiviranja z TP in brez peptida

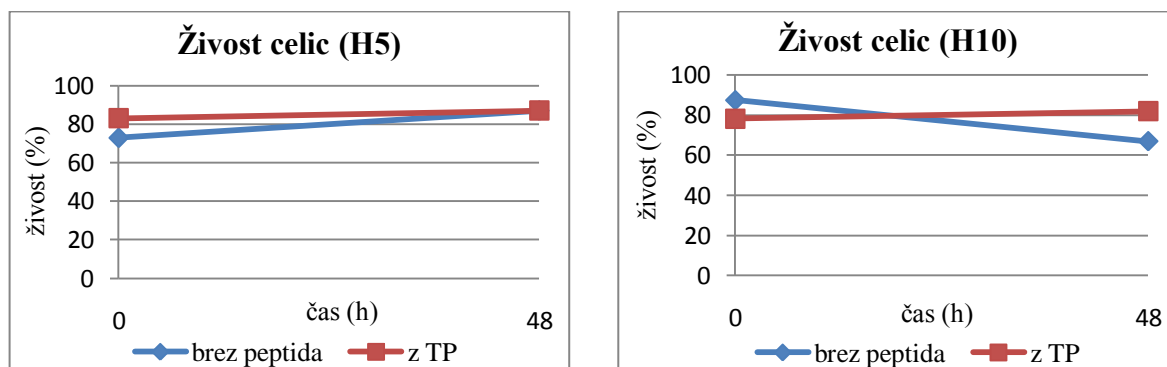
Kulture	Živost (%)			
	Brez peptida		Z toksičnim peptidom	
	0h	48h	0h	48h
H5 (CB)	73	87	83	87
H10 (CB)	87,5	67	78,3	82
H1(celiakija)	71	75	82	68

H1/5/10 (oštevilčeni humani biopiti dvanajstnika bolnikov s celiakijo oz. Crohnovo boleznijo)

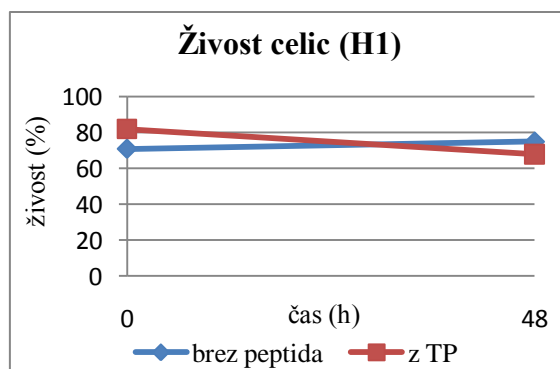
Na grafih 36 vidimo, da živost celic v kulturah H5 in H10 z TP po 48h naraste, enako se zgodi v kulturi H5 brez peptida, medtem ko v kulturi H10 brez peptida živost po 48h pade. Iz teh dejstev bi lahko sledilo, da TP ne vpliva na živost celic v kulturah humanih epiteljskih celic dvanajstnika bolnikov s Crohnovo boleznijo. Že prej smo prišli tudi do zaključka, da znotraj posamezne skupine kultur z in brez TP po 48h pride do značilnega padca živosti celic, ni pa bilo razlik med skupinama, kar pomeni, da TP ne vpliva na živost

»zdravih« epiteljskih celic dvanajstnika in kot je videti iz grafov 36 tudi ne vpliva na humane epiteljske celice bolnika s Crohnovo boleznijo.

Graf 36: Spreminjanje živosti celic med 48 urnim kultiviranjem v posameznih kulturah humanih epiteljskih celic dvanajstnika s TP in brez peptida pri **Crohnovi boleznijo**



Graf 37: Spreminjanje živosti celic med 48 urnim kultiviranjem v kulturi humanih epiteljskih celic dvanajstnika s TP in brez peptida pri **celiakiji**

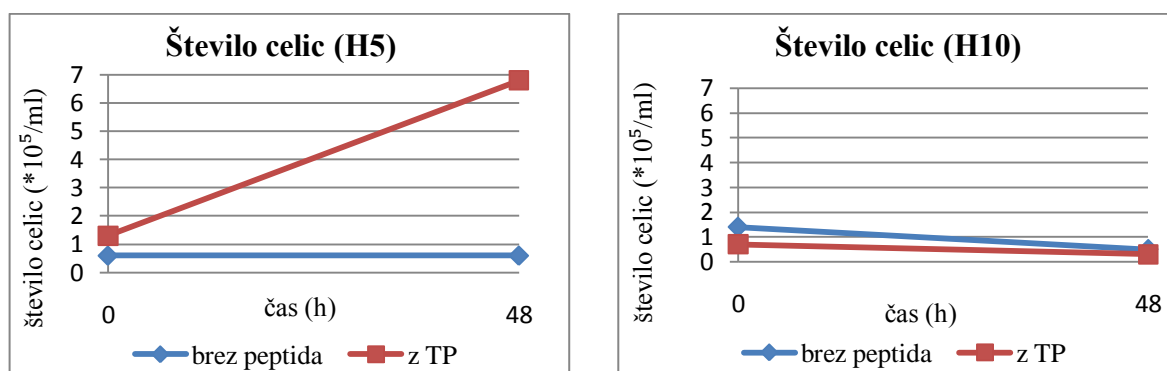


V kulturi H1 brez peptida je živost po 48h narastla, kar je sicer v nasprotju z dobljenimi rezultati humanih »zdravih« enterocitov, kjer je padla. Kljub temu živost po 48h ni večja od povprečne živosti »zdravih« celic. Mogoče bi ta dvig živosti lahko pripisali temu, da so celice prišle v ugodnejše okolje, kjer so lahko nadaljevale proces proliferacije. Za razliko od kulture H1 brez peptida je v kulturi H1 z TP po 48h prišlo do znižanja živosti. Pri celiakiji je znano, da so celice zaradi nenehnega odmiranja bolj podvržene proliferaciji, da nadomestijo pomanjkanje živih celic. Zato je možna razlaga, da v prisotnosti TP, odmiranje celic prevlada nad proliferacijo, kar povzroči padec živosti celic, medtem ko se v njegovi odsotnosti zgodi ravno obratno. Vendar pa iz rezultatov enega vzorca ne moremo trditi, da TP zniža živost celic v kulturah humanih epiteljskih celic dvanajstnika s celiakijo.

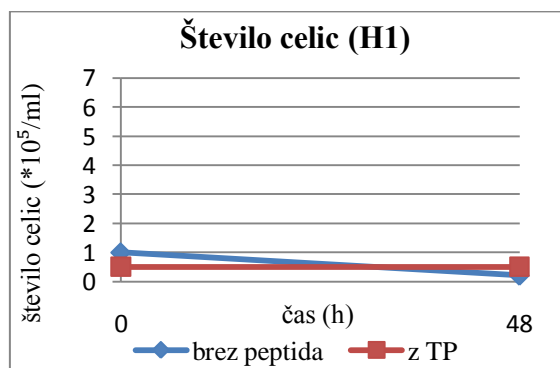
Tabela 24: Število celic v kulturah humanih "bolnih" epitelijskih celicah dvanajstnika tekom 48 urnega kultiviranja z TP in brez peptida

Kulture	Število celic (celice/ml)			
	Brez peptida		Z toksičnim peptidom	
	0h	48h	0h	48h
H5 (CB)	$6 \cdot 10^4$	$6 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^5$	$6,8 \cdot 10^5$
H10 (CB)	$1,4 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^4$	$7 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^4$
H1 (celiakija)	$1 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$

Graf 38: Spreminjanje števila celic med 48 urnim kultiviranjem v posameznih kulturah humanih epitelijskih celic dvanajstnika s TP in brez peptida pri Crohnovi bolezni



Graf 39: Spreminjanje števila celic med 48 urnim kultiviranjem v kulturi humanih epitelijskih celic dvanajstnika s TP in brez peptida pri celiakiji



Število celic v kulturah H5 in H10 brez in z TP po 48h pade oz. se ne spremeni. Do povečanja števila celic pride le v kulturi H5 z TP. Da se število celic po 48h zniža pri »zdravih« kulturah brez peptida smo sicer ugotovili z 10% tveganjem, vendar tega ne moremo trditi za vzorce Crohnove bolezni, čeprav v eni kulturi število celic pade v drugi pa se ne spremeni. Tudi o kakršnemkoli vplivu TP na število celic v kulturah epitelijskih celic dvanajstnika pri bolnikih s Crohnovo boleznijo ne moremo govoriti, saj pri kulturi H5 število celic poraste, pri H10 pa pade. Na grafu 39 vidimo, da v kulturi H1 brez peptida po 48h pride do padca števila celic, kar se zgodi tudi pri »zdravih« kulturah. Enako se zgodi v

kulturi z TP, vendar je znižanje števila celic manjše. Lahko bi torej rekli, da TP nima vpliva na število epiteljskih celic dvanajstnika pri bolnikih celiakije.

Vpliv na aktivnost maltaze in saharaze

Za izračun specifične aktivnosti maltaze in saharaze ter TG2 potrebujemo koncentracijo proteinov, ki jo izračunamo iz umeritvene premice dobljeno na osnovi absorbanc proteinskih standardov.

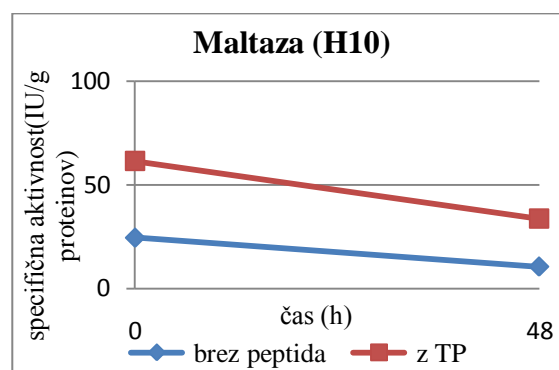
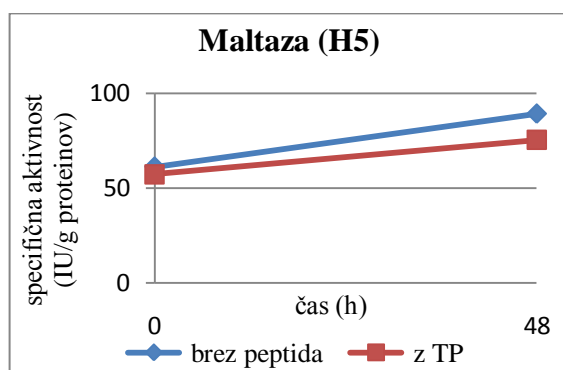
Tabela 25 : Koncentracija proteinov v kulturah humanih "bolnih" epiteljskih celicah dvanajstnika tekom 48 urnega kultiviranja z TP in brez peptida

Kulture	Koncentracija proteinov (g/l)			
	Brez peptida		Z toksičnim peptidom	
	0h	48h	0h	48h
H5 (CB)	0,008	0,012	0,009	0,011
H10 (CB)	0,025	0,022	0,007	0,0123
H1 (celiakija)	0,0211	0,0117	0,0174	0,008

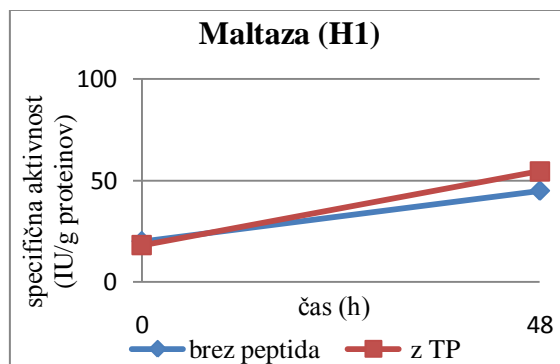
Tabela 26 : Aktivnost maltaze v kulturah humanih "bolnih" epiteljskih celicah dvanajstnika tekom 48 urnega kultiviranja z TP in brez peptida

Kulture	Aktivnost maltaze (IU/g proteinov)			
	Brez peptida		Z toksičnim peptidom	
	0h	48h	0h	48h
H5 (CB)	61,36	89,30	57,39	75,54
H10 (CB)	24,51	10,5	61,42	33,65
H1 (celiakija)	20,11	45,09	18,29	54,57

Graf 40: Spreminjanje aktivnosti maltaze med 48 urnim kultiviranjem v posameznih kulturah humanih epiteljskih celic dvanajstnika s TP in brez peptida pri **Crohnovi bolezni**



Graf 41: Spreminjanje aktivnosti maltaze med 48 urnim kultiviranjem v kulturi humanih epiteljskih celic dvanajstnika s TP in brez peptida pri celiakiji



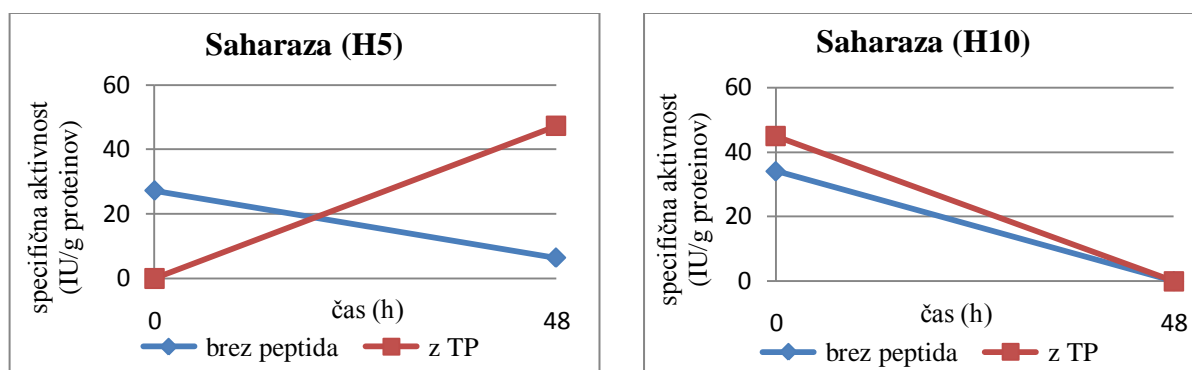
Grafa 40 nam prikazujeta ravno obratno situacijo dveh različnih vzorcev. V kulturah H5 z in brez TP po 48h pride do približno enakega porasta aktivnosti maltaze, medtem ko se v kulturah H10 brez in z TP aktivnost maltaze zniža za približno polovico začetne vrednosti. Iz teh rezultatov bi lahko sklepali, da TP ne vpliva na aktivnost maltaze pri bolnikih s Crohnovo boleznijo, kar smo že ugotovili tudi pri »zdravih« humanih vzorcih.

Iz grafa 41 je razvidno, da se aktivnost maltaze v kulturi brez in z TP po 48h precej poveča in doseže vrednost podobno povprečni vrednosti aktivnosti maltaze v »zdravih« vzorcih brez oz. z TP. To pomeni, da TP verjetno ne vpliva na aktivnost maltaze pri bolnikih celiakije. TP prav tako ni imel vpliva na aktivnost maltaze pri »zdravih« humanih vzorcih. Začetna vrednost aktivnosti maltaze pri bolniku celiakije je le za približno 9 IU/g proteinov nižja od povprečne aktivnosti maltaze v kulturah »zdravih« humanih epiteljskih celicah dvanajstnika, kar smo tudi pričakovali, saj je znano, da so pri celiakiji znižane aktivnosti maltaze. Se je pa po že 48h kultiviranja vrednost »normalizirala«. Iz tega bi lahko sklepali, da je bolnik že na brezglutenski dieti in se je sluznica črevesja že začela obnavljati.

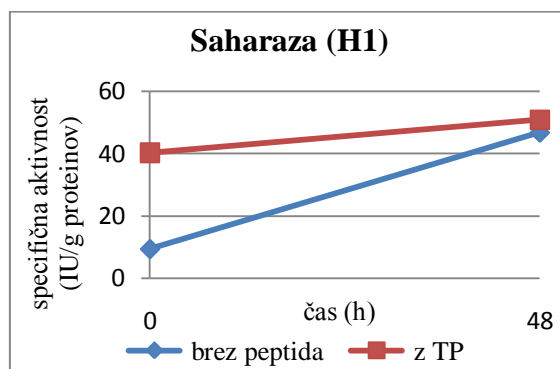
Tabela 27 : Aktivnost saharaze v kulturah humanih "bolnih" epiteljskih celicah dvanajstnika tekom 48 urnega kultiviranja z TP in brez peptida

Kulture	Aktivnost saharaze (IU/g proteinov)			
	Brez peptida		Z toksičnim peptidom	
	0h	48h	0h	48h
H5 (CB)	27,27	6,42	0	47,25
H10 (CB)	34,14	0	44,92	0
H1 (celiakija)	9,50	46,85	40,31	50,93

Graf 42: Spreminjanje aktivnosti saharaze med 48 urnim kultiviranjem v posameznih kulturah humanih epiteljskih celic dvanajstnika s TP in brez peptida pri **Crohnovi bolezni**



Graf 43: Spreminjanje aktivnosti saharaze med 48 urnim kultiviranjem v kulturi humanih epiteljskih celic dvanajstnika s TP in brez peptida pri **celiakiji**



Ob pogledu na grafa 42 razberemo, da se kultura H10 glede na aktivnost saharaze obnaša enako, če je v njej TP ali pa ga ni- obakrat namreč pride do padca aktivnosti saharaze, kar se je že zgodilo tudi pri maltazi. Tudi v kulturi H5 brez peptida se aktivnost saharaze po 48h zniža, medtem ko se v kulturi z TP poveča. Iz tega lahko zaključimo, da TP verjetno ne vpliva na aktivnost saharaze pri bolnikih s Crohnovo boleznijo in so nihanja aktivnosti saharaze le posledica endogenih bioloških ritmov.

Na grafu 43 vidimo, da aktivnost saharaze v kulturi H1 brez in z TP po 48h naraste in to na vrednost, ki je veliko večja od povprečne aktivnosti saharaze v »zdravih« vzorcih. Porast aktivnosti saharaze je v kulturi brez peptida kar 4krat večji kot v kulturi z TP. To bi mogoče lahko povezali z dejstvom, da se je v kulturi brez peptida povečala živost celic, kar pomeni, da je poleg proliferacije prišlo tudi do diferenciacije v enterocite in s tem do povečane aktivnosti saharaze (enterociti so nosilci disaharidazne aktivnosti). In čeprav je v kulturi H1 z TP živost celic padla, se je aktivnost saharaze kljub temu povečala mogoče zaradi kompenzacijskega odziva na toksičen peptid. Živost celic in aktivnost saharaze bi

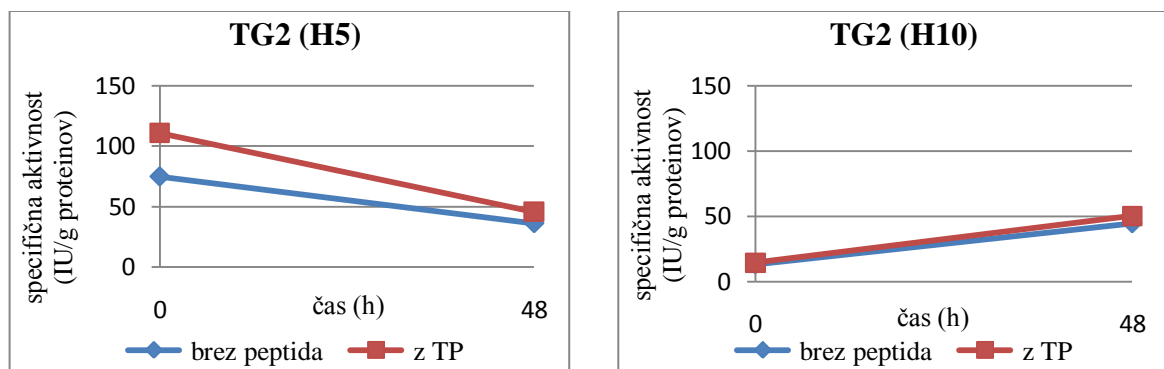
bilo zanimivo spremljati tudi po 72 urah, ko bi se praviloma moral izkazati toksičen vpliv dodanega peptida in bi aktivnost saharaze morala padati. Na osnovi enega vzorca pa ne moremo reči, da ima TP vpliv na aktivnost saharaze pri bolnikih s celiakijo. Prav tako so vrednosti aktivnosti saharaze v kulturi humanih epiteljskih celicah dvanajstnika s celiakijo po 48h veliko večje kot v kulturah »zdravih« celic in zato bi lahko sklepali enako kot pri aktivnosti maltaze, da je bolnik že na brezglutenski dieti.

Vpliv na aktivnost tkivne transglutaminaze

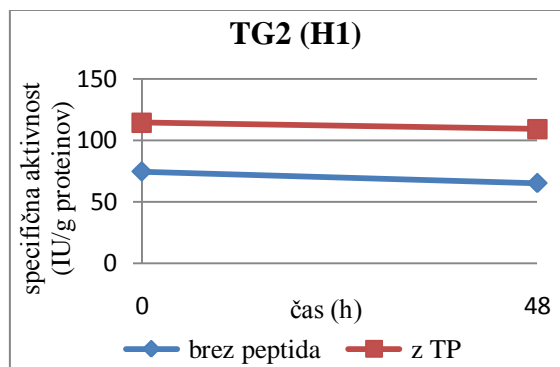
Tabela 28: Aktivnost TG2 v kulturah humanih "bolnih" epiteljskih celicah dvanajstnika tekom 48 urnega kultiviranja z TP in brez peptida

Kulture	Aktivnost TG2 (IU/g proteinov)			
	Brez peptida		Z toksičnim peptidom	
	0h	48h	0h	48h
H5 (CB)	75,05	36,30	110,85	45,95
H10 (CB)	13,61	44,83	14,74	50,36
H1 (celiakija)	74,89	65,35	114,73	109,34

Graf 44: Spreminjanje aktivnosti TG2 med 48 urnim kultiviranjem v posameznih kulturah humanih epiteljskih celic dvanajstnika s TP in brez peptida pri Crohnovi bolezni



Graf 45 : Spreminjanje aktivnosti TG2 med 48 urnim kultiviranjem v kulturi humanih epiteljskih celic dvanajstnika s TP in brez peptida pri celiakiji



Obnašanje aktivnosti TG2 v kulturah vzorcev bolnikov s Crohnovo boleznijo je ravno obratno, v kulturi H5 brez in z TP po 48h aktivnost TG2 pade, medtem ko se v kulturi H10 poveča. Aktivnost TG2 v kulturi H5 z in brez TP je bila ob času 0h sicer visoka, nato pa je padla na vrednost podobno povprečni vrednosti TG2 »zdravih« vzorcev brez peptida. V kulturah H10 brez in z TP pa je začetna aktivnost TG2 bila nizka, po 48h pa se je približala povprečni vrednosti TG2 »zdravih« humanih vzorcev z peptidom. Rečemo lahko, da TP najverjetneje nima vpliva na aktivnost TG2 v kulturi humanih epiteljskih celic dvanajstnika pri bolnikih s Crohnovo boleznijo. Zanimivo pa je, da pri kulturi H10 brez in z TP po 48h pride do znižane aktivnosti saharaze in maltaze ter do povečanja aktivnosti TG2. Ravno obratno pa se zgodi pri vzorcu H5 brez in z TP, razen saharaza brez peptida pade. Pri biopsiji so od istega bolnika, ki so mu odvzeli vzorec H10, odvzeli tudi vzorec kolona (H9), ki so ga nato prav tako kultivirali brez in z TP. Ugotovili so, da aktivnost TG2 pri kultiviranju z TP po 48h naraste nad povprečno vrednostjo »zdravih« kolonocitov kar pa se ne zgodi v kulturi brez TP. Prav tako so opazili morebiten vpliv TP na aktivnost saharaze, ki se je v kulturi brez peptida povečala, v kulturi z TP pa padla (81). Ali bi torej lahko sklepali, da ima pri Crohnovi bolezni TP večji vpliv na aktivnost TG2 in saharaze v kulturi humanih kolonocitov kot pa humanih enterocitov dvanajstnika. In glede na razlike kulture H5 in H10, ali lahko predvidevamo, da je pri bolniku, kjer smo dobili H10 in H9 prizadet tako dvanajstnik ozkega črevesa kot kolon in je Crohnova bolezen v svoji najbolj aktivni obliki, pri bolniku od katerega smo dobili H5 pa je dvanajstnik manj prizadet ali pa je Crohnova bolezen v remisiji. Prav tako se poraja vprašanje, če so razlike med kulturama H5 in H10 posledica njihovih lastnih endogenih bioloških ritmov in ne stopnje aktivnosti oz. težavnosti bolezni. Če hočemo odgovoriti na vsa ta vprašanja, bo potrebno opraviti raziskave na večjem številu vzorcev obolelih za Crohnovo boleznijo.

Na grafu 45 vidimo da v obeh kulturah aktivnost TG2 po 48h pade, v kulturi z TP bolj kot v kulturi brez peptida. Je pa njihova aktivnost tako ob času 0h kot 48h precej višja kot v kulturah »zdravih« humanih epiteljskih celic dvanajstnika. To nam torej potrjuje dejstvo, da je aktivnost TG2 povišana pri bolnikih s celiakijo in da se tudi po 48h kultiviranja brez TP ne normalizira. O vplivu TP na aktivnost TG2 na kulturo humanih epiteljskih celic dvanajstnika bolnika s celiakijo ne moremo govoriti, saj aktivnost TG2 po 48h kultiviranja celo rahlo pade, medtem ko smo z 10% tveganjem ugotovili, da TP povzroči porast aktivnosti TG2 po 48h v kulturah »zdravih« humanih epiteljskih celic dvanajstnika. Je pa res, da je še vedno skoraj enkrat večja od aktivnosti TG2 v kulturi H1 brez peptida, zato je mogoče to znižanje le odraz njenega biološkega nihanja in bi mogoče v naslednjih 24h spet porasla. Da bi to ugotovili, pa bi bilo potrebno daljše kultiviranje. Zato je mogoče smiselno, da bi pri kulturah humanih epiteljskih celic dvanajstnika spremljali le aktivnost TG2 in to pri večjem številu vzorcev ob času 0h, 24h, 48h in 72h. Vrednosti in obnašanje aktivnosti maltaze v kulturah humanih epiteljskih celic dvanajstnika bolnika s celiakijo so namreč podobne kot v kulturah epiteljskih celic »zdravega« dvanajstnika. To pa ne velja čisto za aktivnost saharaze. Vendar je še vedno to le en primer celiakije in zato do nekih splošnih zaključkov ne moremo priti- obstajajo samo domnevanja ter manjše in večje verjetnosti, ki pa nakazujejo smiselnost nadaljnega raziskovanja.

5 SKLEPI

Pri našem raziskovalnem delu smo ugotavljali vpliv dveh gliadinskih pentapeptidov p39-43 (P1) in p51-55 (P2) pri koncentracijah 100 µg/mL (P1/100, P2/100) in 200 µg/mL (P1/200, P2/200) na podganje epiteljske celice ozkega črevesa preko spremljanja živosti in števila celic ter aktivnosti maltaze, saharaze in tkivne transglutaminaze (TG2). Poleg teh dveh peptidov smo uporabili tudi toksičen peptid p31-43 (TP) pri koncentraciji 200 µg/mL in ugotavljali njegov vpliv na »zdrave« humane epiteljske celice dvanajstnika ter humane epiteljske celice dvanajstnika bolnikov s Crohnovo boleznijo in celiakijo. Izsledki naših raziskav pa so sledeči:

- Nobeden od dodanih pentapeptidov P1/100 in P2/100 tekom 48urnega kultiviranja ne vpliva na morfologijo in živost ter število podganih epiteljskih celic ozkega črevesa.
- Z dvema različnima statističnima pristopoma smo dokazali, da P1/100 in P2/100 po 48h kultiviranja ne vplivata na aktivnosti maltaze in saharaze v kulturah podganih epiteljskih celicah dvanajstnika
- Med kulturami brez peptida in z dodanima P1/100 ter P2/100 po 48h pride do razlik v aktivnosti TG2, vendar je vzorec premajhen, da bi se pokazale statistično značilne razlike med posameznimi skupinami. Videti je kot, da P1/100 zniža aktivnost TG2, P2/100 pa jo poveča.
- P1 in P2 tudi pri koncentraciji 200 µg/mL ne vplivata na morfologijo, živost in število podganih epiteljskih celic ozkega črevesa.
- P1/200 in P2/200 po 48h ne vplivata na aktivnost maltaze v kulturah podganih epiteljskih celicah dvanajstnika. Glede na dobljene rezultate pa lahko trdimo, da v kulturah z dodanima P1/200 in P2/200 pride do znižanja aktivnosti saharaze, medtem ko v kulturah brez peptida naraste. Ta razlika je tudi statistično značilna, kar pomeni, da imata P1/200 in P2/200 vpliv, ki se kaže preko znižanja aktivnosti saharaze. Nobeden od dodanih peptidov pri tej koncentraciji pa ne vpliva na aktivnost TG2.

- V kulturah »zdravih« humanih epiteljskih celicah dvanajstnika z in brez TP živost po 48h pade. Sicer pa glede živosti ni razlik med skupinami kultur brez in z TP. Prav tako pri 5% tveganju ne moremo govoriti o vplivu TP na aktivnost maltaze, saharaze in TG2.
- Na podlagi rezultatov dobljenih iz dveh vzorcev bolnikov s Crohnovo boleznijo sklepamo, da TP verjetno nima vpliva na nobenega izmed spremljanih parametrov v kulturah humanih epiteljskih celic dvanajstnika bolnika s Crohnovo boleznijo.
- V kulturi humanih epiteljskih celic dvanajstnika bolnika s celiakijo ob prisotnosti TP pride do padca živosti celic, vendar na osnovi enega vzorca ne moremo reči, da jo povzroči TP. Število celic se ni spremenilo, prav tako nismo zaznali vpliva na aktivnost maltaze.
- V kulturi humanih epiteljskih celic dvanajstnika bolnika s celiakijo smo opazili veliko večji porast aktivnosti saharaze po 48h v kulturah brez TP, kot z TP, vendar sta vrednosti aktivnosti po 48h v obeh kulturah podobni. Medtem pa aktivnost TG2 v obeh kulturah rahlo pade, a je še vedno v kulturi z dodanim TP po 48h precej višja od vrednosti aktivnosti TG2 v kulturah »zdravih« humanih epiteljskih celic dvanajstnika. TP torej kaže nekakšen vpliv preko aktivnosti saharaze in TG2, kar nakazuje smiselnost nadaljnjega raziskovanja učinka TP na kulture humanih epiteljskih celic dvanajstnika bolnikov s celiakijo.

Iz prvega dela, kjer smo delali z kulturami podganjih epiteljskih celic ozkega črevesa, lahko zaključimo, da med peptidoma P1/200 in P2/200 pri 5% tveganju ni statistično značilnih razlik tekom 48urnega kultiviranja. Ima pa P1/100 drugačen vpliv na aktivnost TG2 kot P2/100, kar nakazuje na različen vpliv različnih gliadinskih pentapeptidov. Te ugotovitve tudi utemeljujejo smiselnost nadaljnjih raziskav.

Pri drugem delu raziskovanja smo naredili pomemben korak od živalskega do humanega modela epiteljskih celic ozkega črevesa, ki je pokazal, da je metoda kultiviranja primerna tudi za humane celice. Ker pri biopsiji dobimo zelo malo vzorca, bi bilo v prihodnosti bolj optimalno v več časovnih točkah spremljati le TG2, na katero bi naj imel TP največji vpliv. Tukaj smo začeli tudi delo z vzorci bolnikov, pri katerih smo predvideli, da bi težo Crohnove bolezni in celiakije lahko vrednotili preko aktivnosti TG2, kar pomeni, da bi bilo smiselno nadaljevati raziskave o vplivu TP na kulture humanih epiteljskih celic ozkega črevesa pri bolnikih s celiakijo in Crohnovo boleznijo.

6 LITERATURA

- 1) <http://drustvo-celiakija.si/>
- 2) Schuppan D: Current concepts of Celiac Disease Pathogenesis. *Gastroenterology* 2000; 119: 234-242
- 3) Prolamin, gluten, gliadin; za kaj pravzaprav gre?: http://drustvo-celiakija.si/strokovni_prispevki/32/prolamin_gluten_gliadin_za_kaj_pravzaprav_gre/
- 4) Koning F, Gilissen L, Wijmenga C: Gluten: a two edged sword. *Immunopathogenesis of coeliac disease. Springer Semin Immun* 2005;27: 217-232
- 5) Sabatino A, Corazza GR: Coeliac disease. *Lancet* 2009; 373: 1480-1493
- 6) Howdle PD: Gliadin, glutenin or both? The search for the Holy Grail in coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18:703-706
- 7) Schuppan D, Esslinger B, Dieterich W: Innate immunity and coeliac disease. *The Lancet* 2003; 362: 3-4
- 8) Silano M, Vincenzi M: In vitro screening of food peptides toxic for coeliac and others gluten-sensitive patients: a review. *Toxicology* 1999; 132: 99-110
- 9) Martin F, Kagnoff: Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J Clin Invest* 2007;117: 41-49
- 10) Schuppan D, Junker Y, Barisani D: Celiac disease: From Pathogenesis to Novel Therapies. *Gastroenterology* 2009; 137: 1912-1933
- 11) Celiakija pri odraslih: http://drustvo-celiakija.si/strokovni_prispevki/31/celiakija_pri_odraslih/
- 12) Kocijančič A, Mravlje E, Štajer D: *Interna medicina*, 3.izdaja, Littera picta, Ljubljana, 2005: 510-512, 519-526
- 13) Diosdado B, Oort E, Wijmenga C: »Coelionomics«: towards understanding the molecular pathology of coeliac disease. *From Human genetic Variations to Prediction of Risks and Responses to Drugs and to the Environment* 2004; 4: 35-42
- 14) Kocijančič B: Kronična vnetna črevesna bolezen. *Farm. vest.* 2008; 59: 43-45
- 15) Kumar Vinay, Abbas Abul K, Fausto Nelson, Mitchell Richard, Robbins, Stanley L: *Robbins basic pathology*, Saunders/Elsevier Philadelphia 2007: 572-577
- 16) Bratkovič T: Biološke učinkovine pri zdravljenju Crohnove bolezni in ulceroznega kolitisa. *Farm. vest.* 2008; 59: 47-49

- 17) Burtis, Carl A, Ashwood, Edward R: Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. W.B.Saunders, Philadelphia 2001: 788-790
- 18) Masachs M, Casellas F, Malagelada JR: Inflammatory bowel disease in celiac patients. Abstract. Rev Esp Enferm Dig 2007; 99: 446-450
- 19) Leeds Js, Höroldt BS, Sidhu R, Hopper AD, Robinson K, Toulson B, Dixon L, Lobo AJ, McAlindon ME, Hurlstone DP, Standers DS: Is there an association between coeliac disease and inflammatory bowel disease? A study of relative prevalence in comparison with population controls. Abstract. Scand J Gastroenterol. 2007; 42: 1214-1220
- 20) Tola M, Sabbatella L, Anania MC, Viscido A, Caprilli R, Pica R, Paoluzi P, Picarelli A: Anti-tissue transglutaminase antibodies of inflammatory bowel disease: new evidence. Abstract. Clin Chem Lab Med. 2004; 42: 1092-1107
- 21) Browning TH, Trier JS: Organ culture of mucosal biopsies of human small intestine. J Clin Invest 1969; 48(8): 1423-1432
- 22) Trier JS, Browning TH: Epithelial-cell renewal in cultured duodenal biopsies in celiac sprue. New Eng J Med 1970; 283: 1245-1250
- 23) 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: 243-248
- 24) 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. Chronobiolo 1987; XIV/2: 199-200
- 25) Perreault N, Beaulieu JF: Primary Cultures of Fully Differentiated and Pure Human Intestinal Epithelial Cells. Experimental Cell Research 1998; 245: 34-42
- 26) Meunier V, Bourrie M, Berger Y, Fabre G: The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetics applications. Abstract. Cell Biol Toxicol. 1995; 11 (3-4): 187-194
- 27) Nollevaux G, Deville C, Moualij B, Zorzi W, Deloyer P, Schneider YJ, Peulen O, Danrifosse G: Development of a serum-free co-culture of human intestinal epithelium cell lines (Caco-2/HT29-5M21). BMC Cell Biol. 2006; 7:
- 28) 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

- 29) Stacey GN, Doyle A, Ferro M: Cell Culture Methods for in vitro Toxicology. Issues 4&5 Vol.17, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 2001: 97-102
- 30) Elli L, Dolfini E, Bardella M: Gliadin cytotoxicity and in vitro cell cultures. Toxicology Letters 2003; 146: 1-8
- 31) Silano M, Benedetto R, Maialetti F, Vincenzi A, Calcaterra R, Trecca A, Vincenzi M: A 10-residue peptide from durum wheat promotes a shift from a Th1-type response toward a Th2-type response in celiac disease. Am J Clin Nutr 2008; 87: 415-423
- 32) Ross M: Histology a text and atlas, Williams&Wilkins, Baltimore 1982: 430- 444
- 33) Zorc-Pleskovič R: Histologija, Visoka šola za zdravstvo, Ljubljana 2006: 173-178
- 34) Kocijančič A, Mravlje F, štajer D: Interna medicina, 3.izdaja, Littera picta, Ljubljana, 2005: 493-500
- 35) Anderson, Shaunna C: Clinical chemistry: concepts and applications, McGraw-Hill, New York 2003: 559
- 36) The small intestine, Hystology: http://www.courseweb.uottawa.ca/medicine-histology/English/Gastrointestinal/gastro_small_intest.htm#Fig.%2030
- 37) What Is an Enterocyte: <http://www.wisegeek.com/what-is-an-enterocyte.htm>
- 38) Bry L, Falk P, Huttner K, Ouellette A, Midtvedt T: Paneth cell differentiation in the developing intestine of normal and transgenic mice. Cell Biology 1994; 91: 10335
- 39) Kraehenbuhl JP, Neutra MR: Epithelial M cells: differentiation and function. Annual Review of Cell and Developmental Biology 2000; 16; Abstract
- 40) M cell: http://en.wikipedia.org/wiki/M_cell
- 41) Larson LI: Distribution of E-cadherin and β -catenin in relation to cell maturation and cell extrusion in rat and mouse small intestines. Histochem Cell Biol 2006; 126:575-582
- 42) Radtke F, Cleuers H, Riccio O: From Gut Homeostasis to Cancer. Current Molecular Medicine 2006; 6: 275-278
- 43) Villi, Crypts and the Life Cycle of Small Intestinal Enterocytes: <http://arbl.cvmb.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/smallgut/lifecycle.html>
- 44) Carethers JM: Cell checkpoint and enterocyte differentiation: a recipe for sequential stages Focus on »Caco-2 intestinal cell differentiation is associated with G1 arrest and suppresion of CDK2 and CDK4«. Am J Physiol Cell 1998; 275: 1191-1192
- 45) Krinke GJ: The laboratory rat, Academic Press, San Diego 2000: 292-293, 371

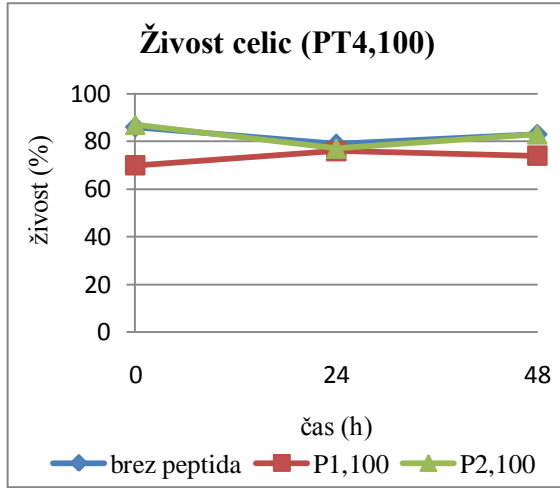
- 46) http://highered.mcgraw-hill.com/sites/0073031216/student_view0/exercise47/digestive_systems.html
- 47) Suckow M, Weisbroth H, Franklin C: The Laboratory Rat, Elsevier Inc, USA 2006: 103-105, 140
- 48) Forrester JM: The number of villi in rats jejunum and ileum: effect of normal growth, partial enterectomy, and tube feeding. J. Anat. 1972; 2: 283-291
- 49) Ganong W: Digestion and absorption. Review of Medical Physiology 2th Ed. San Francisco, California: 384-387
- 50) Prebava ogljikovih hidratov in lipidov: <http://www.medenosrce.net/pogled.asp?ID=42>
- 51) Anderson, Shaunna C: Clinical chemistry: concepts and applications, McGraw-Hill, New York 2003: 561
- 52) Levin RJ: Digestion and absorption of carbohydrates-from molecules and membranes to humans. Am J Clin Nutr 1994; 59: 690S-698S
- 53) Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Enzyme Nomenclature. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>
- 54) Lutkić A, Votava A: Enzymic deficiency and malabsorption of food disaccharidases. (Lee CK, Lindley MG): Developments in food carbohydrate-3, Disaccharidases 1982; 183-207
- 55) Skovbjerg H, Koch C, Anthonsen D, Sjöström H: Deamidation and cross-linking of gliadin peptides by transglutaminases and the relation to celiac disease. BBA 2004; 1690: 220-230
- 56) Langman JM, Rowland R: Activity of duodenal disaccharidases in relation to normal and abnormal mucosal morphology. Clinical Pathology 1990; 43: 537-540
- 57) Lukač-Bajalo J, Hekkens JM, Ungerer R, Rietveld WJ: Influence of a dorsomedial hypothalamus lesion on the circadian changes in the enzyme development and activity if intestinal brushborder membranes in the rat. Chronobiology International 1985;2; 103-108
- 58) Swallow DM, Poulter M, Hollox EJ: Intolerance to lactose and dietary sugars. DMD 2001; 29: 513-516
- 59) Kleinmat, Gaulet, e tal: Walkers Pediatric gastrointestinal disease, BC Decker, Hamilton 2008: 275-285

- 60) Jacob R, Zimmer KP, Schmitz J, Naim HY: Congenital sucrase- isomaltase deficiency arising from cleavage and secretion of a mutant form of the enzyme. JCI 2000; 106: 281-287
- 61) Nichols BL, Avery S, Sen P, Swallow DM, Hahn D, Sterchi E: The maltase-glucoamylase gene: common ancestry to sucrase isomaltase with complementary starch digestion activities. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 1432-1437
- 62) Calvillo R, Sim L, Ao Z, Hamaker BR, Quaroni A, Brayer R, Sterchi E, Torres C, Rose D, Nichols B: Luminal Starch Substrate »Brake« on Maltose-Glucoamylase Activity Is Located within The Glucoamylase subunit. J.Nutr. 2008; 138: 685-692
- 63) Mayne, Philip D: Clinical chemistry and diagnosis and treatment. E.Arnold, London 1994: 246
- 64) CK Lee: Disaccharidase Deficiency and malabsorption of carbohydrates. Singapore Medical Journal 1984; 25: 6-13
- 65) Disaccharidases: <http://en.wikipedia.org/wiki/Disaccharidase>
- 66) Nieminen U, Kahri A, Savilahti E, Färkkilä: Duodenal disaccharidase activities in the follow-up of villous atrophy in coeliac disease. Scand J Gastroenterol 2001; 36(5): 507-10
- 67) Protitelesa proti tkivni transglutaminazi: http://drustvo-celiakija.si/strokovni_prispevki/23/protitelesa_proti_tkivni_transglutaminazi/
- 68) Dolinšek J, Urlep-Žužej D, Mičetić-Turk D: Sodobni principi diagnostike celiakije. Zdrav. Vest.2006; 75: 89-97
- 69) http://en.wikipedia.org/wiki/Tissue_transglutaminase
- 70) Koning F: A Tertiary Twist to the Transglutaminase Tale. PloS Biology 2007; 5
- 71) Esposito C, Paparo F, Caputo I, Porta R, Salvati V, Mazzarella G, Auricchio S, Troncone R: Expression and enzymatic activity of small intestinal tissue transglutaminase in celiac disease. Abstract. Am J Gastroenterol 2003; 98: 1813-1820
- 72) Briana C, Samaroo D, Alaedini A: Celiac disease: From gluten to autoimmunity. Autoimmunity Reviews 2008;7: 644-650
- 73) Lukač-Bajalo J, Boštjančič L, Hadžija M, Majdič G, Orel R, stražar M, Božič B: Long-term culture of mouse small intestinal epithelial cells as a study model. The 1st South-Eastern European Pediatric Gastroenterology (SEEPEG) Meeting : Ljubljana 2009, Medicinski razgledi, Supplement, Letn. 48, 3 str. 118

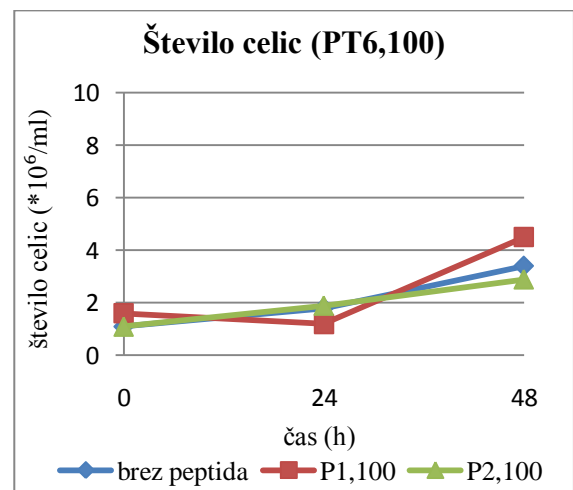
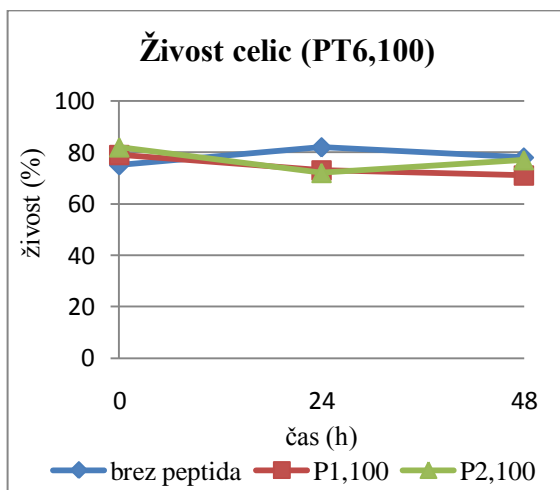
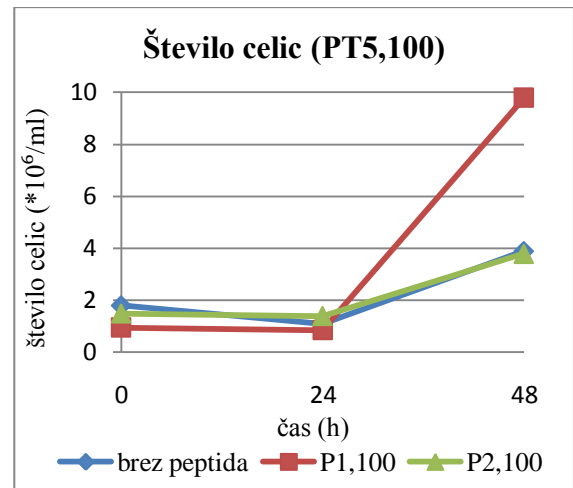
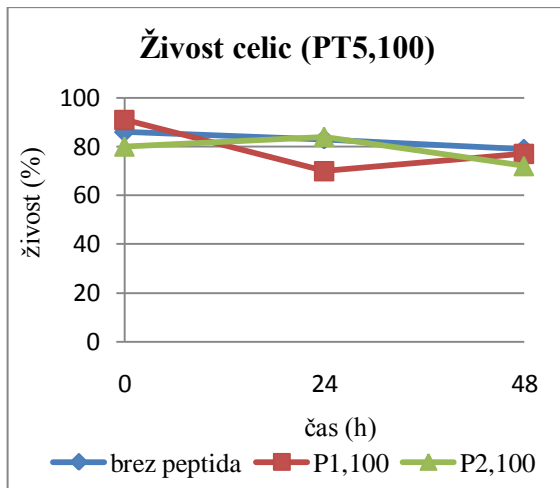
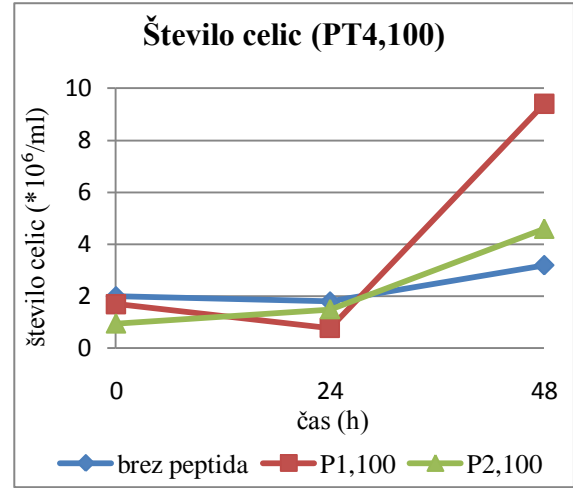
- 74) Lukač-Bajalo J, Lapajne T, Orel R, Perše M, Roglič J, Štrukelj K, Vrtačnik P, Božič B: Long-term culture of rat intestinal epithelial cells as a study model. The 1st South-Eastern European Pediatric Gastroenterology (SEEPEG) Meeting : Ljubljana, 2009, Medicinski razgledi, Supplement, Letn. 48, 3, str. 119
- 75) 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. 7th International Congress on Autoimmunity, Ljubljana, 2010 : final program. [S.l.: s.n.], 2010, str. 133
- 76) 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. The 1st South-Eastern European Pediatric Gastroenterology (SEEPEG) Meeting : Ljubljana 2009, Medicinski razgledi, Supplement, Letn. 48, 3, str. 120
- 77) Lapajne Tina: Spremljanje aktivnosti lizocima kot celičnega označevalca Panethovih celic v kulturah mišjih in podganjih epitelijskih celic tankega črevesa, Diplomska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2009
- 78) Boštjančič Tina: Kultiviranje mišjih enterocitov in proučevanje njihovih funkcij in vitro, Diplomska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2008.
- 79) http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/Cell-Culture/PDFs.Par.81010.File.dat/W-087247-Countess%20App-Tech%20notes_web.pdf
- 80) Catalog no.C10227: Countess TM Automated Cell Counter (invitrogen, Version A, 16. September 2008, MP1022/)
- 81) Mateja Bizjak Anžiček: Proučevanje vpliva gliadinskih peptidov na kulture podganjih in humanih kolonocitov, Diplomska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2010
- 82) Tjaša Rajh: Spremljanje vpliva toksičnega gliadinskega peptida p31-43 na primarno kulturo podganjih epitelijskih celic tankega črevesa, Diplomska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2010
- 83) C.S.Potten, M. Loeffler: Stam cells: attributes, cycles, spirales, pitfalls and uncertainties Lessons for and from the Crypt. Development 1990; 110: 1001-1020

7 PRILOGA

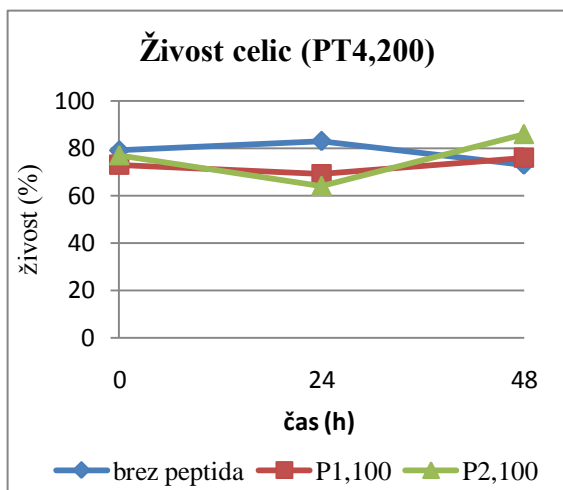
Graf 46: Spreminjanje živosti celic v posameznih kulturah podganjih epiteljskih celic (kulture PT4, PT5, PT6) ozkega črevesa s P1/100, P2/100 in brez peptida



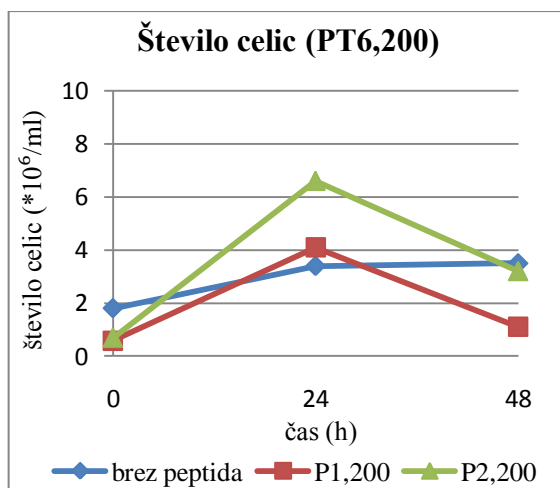
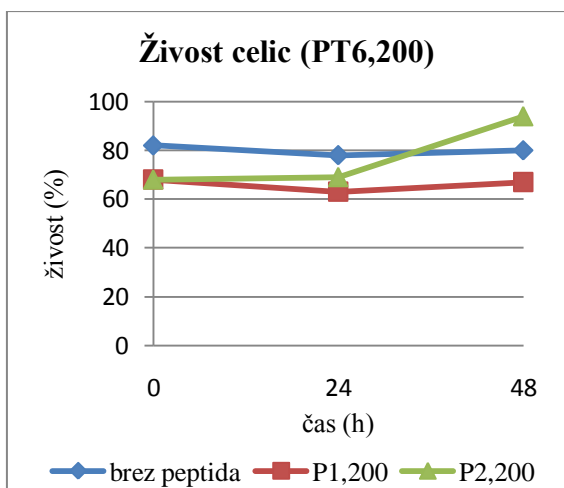
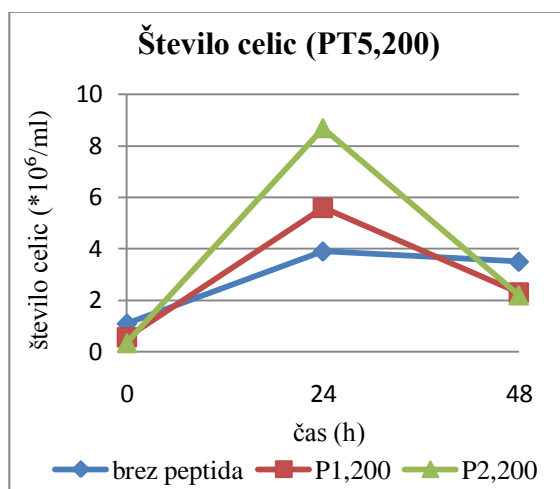
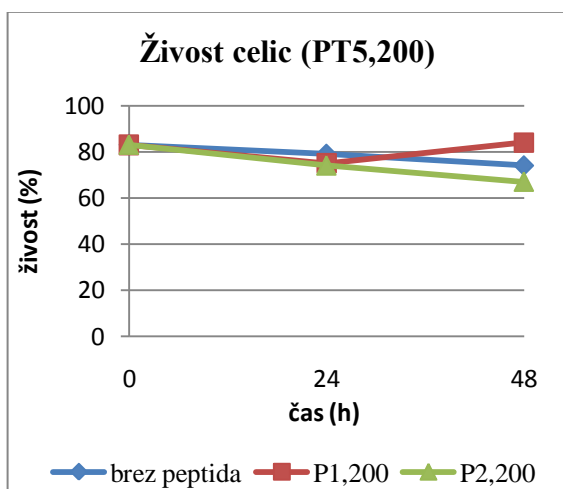
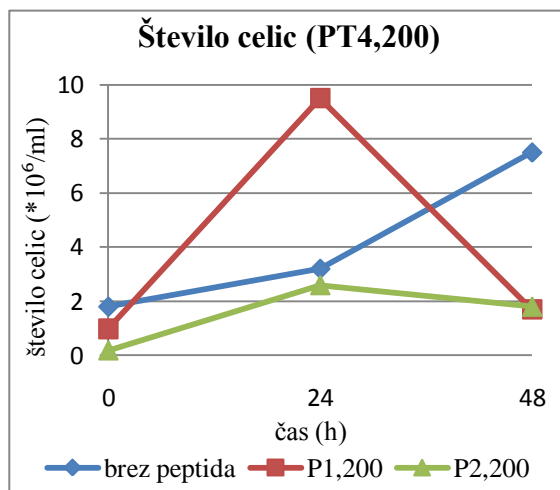
Graf 47: Spreminjanje števila celic v posameznih kulturah podganjih epiteljskih celic (kulture PT4, PT5, PT6) ozkega črevesa s P1/100, P2/100 in brez peptida



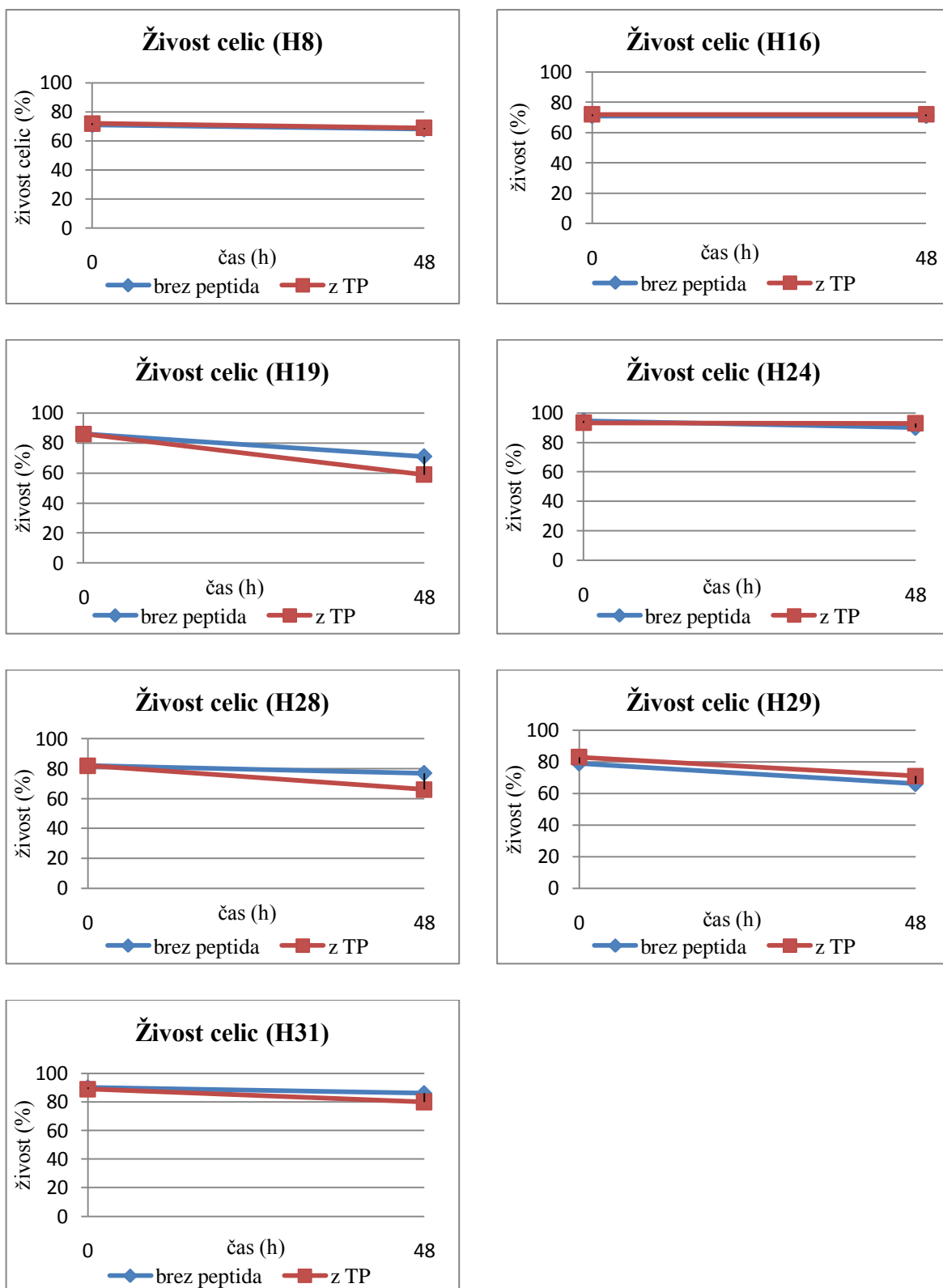
Graf 48: Spreminjanje živosti celic v posameznih kulturah podganjih epitelijskih celic (kulture PT4, PT5, PT6) ozkega črevesa s P1/200, P2/200 in brez peptida



Graf 49: Spreminjanje števila celic v posameznih kulturah podganjih epitelijskih celic (kulture PT4, PT5, PT6) ozkega črevesa s P1/200, P2/200 in brez peptida



Graf 50: Spreminjanje živosti celic v posameznih kulturah "zdravih" humanih epiteljskih celic dvanajstnika s TP in brez peptida



Graf 51: Spreminjanje števila celic v posameznih kulturah "zdravih" humanih epitelijskih celic dvanajstnika s TP in brez peptida

