

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TJAŠA RAJH

**SPREMLJANJE VPLIVA TOKSIČNEGA GLIADINSKEGA PEPTIDA
 p_{31-43} NA PRIMARNO KULTURO PODGANJIH EPITELIJSKIH CELIC
TANKEGA ČREVESA**

**FOLLOW UP OF INFLUENCE OF TOXIC GLIADIN p_{31-43} PEPTIDE ON
PRIMARY CULTURE OF RAT EPITHELIAL CELLS OF SMALL
INTESTINE**

DIPLOMSKA NALOGA

LJUBLJANA, 2010

Diplomsko nalogu 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 prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm., spec. med. biokem.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Jani Lukač Bajalo, univ. dipl. kem., spec. med. biokem. za posredovanje strokovnega znanja in svojih izkušenj, usmerjanje pri eksperimentalnem delu, pomoč pri pisanju diplomske naloge in za uspešno sodelovanje.

Hvala somentorju prof. dr. Borutu Božiču, mag. farm., spec. med. biokem. za koristne nasvete in pomoč pri nastajanju končne oblike diplomske naloge.

Zahvaljujem se vsem, ki so mi pomagali pri izvedbi eksperimentalnega dela in me usmerjali s številnimi koristnimi nasveti, še posebej tehničnima sodelavkama, asistentom ter mladim raziskovalcem s Katedre za klinično biokemijo.

Iskrena hvala moji družini za vso podporo, razumevanje in spodbudo ter zaupanje vame.

Izjava:

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

Tjaša Rajh

Ljubljana, 2010

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Aleš Mrhar, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Bojan Doljak, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

| | | |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | UVOD | 1 |
| 1.1 | GLUTEN IN TOKSIČNI PEPTIDI | 1 |
| 1.2 | VNETNE ČREVESNE BOLEZNI..... | 2 |
| 1.2.1 | Celiakija | 2 |
| 1.2.2 | Kronična vnetna črevesna bolezen..... | 6 |
| 1.3 | IN VITRO TESTNI MODELI ZA PROUČEVANJE CELIAKIE..... | 8 |
| 1.3.1 | Gojenje celic in vitro..... | 8 |
| 1.3.2 | Kultiviranje epitelijskih celic ozkega črevesa..... | 9 |
| 1.3.3 | Učinki toksičnih peptidov glutena v celičnih kulturah | 11 |
| 1.4 | OZKO ČREVO | 11 |
| 1.4.1 | Anatomska in histološka zgradba ozkega črevesa..... | 11 |
| 1.4.2 | Epitelij ozkega črevesa | 14 |
| 1.5 | DISAHARIDAZE OZKEGA ČREVESA | 17 |
| 1.5.1 | Znižanje aktivnosti disaharidaz in njihova vloga pri celiakiji | 18 |
| 1.6 | TKIVNA TRANSGLUTAMINAZA | 19 |
| 1.6.1 | Vloga tkivne transglutaminaze pri celiakiji | 20 |
| 2 | NAMEN DELA..... | 21 |
| 3 | MATERIALI IN METODE | 22 |
| 3.1 | MATERIALI | 22 |
| 3.1.1 | Biološki material | 22 |
| 3.1.2 | Materiali in kemikalije ter priprava delovnih reagentov | 22 |
| 3.1.3 | Laboratorijski pribor | 23 |
| 3.1.4 | Aparature | 24 |
| 3.2 | METODE | 25 |
| 3.2.1 | Živalski model | 25 |
| 3.2.2 | Postopek odmrzovanja podganjih epitelijskih celic..... | 25 |
| 3.2.3 | Kultiviranje podganjih epitelijskih celic..... | 26 |
| 3.2.4 | Spremljanje števila celic, deleža enterocitov in celične živosti s tripanskim modriliom..... | 27 |
| 3.2.5 | Priprava celičnega lizata | 29 |
| 3.2.6 | Merjenje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi | 30 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.7 Merjenje aktivnosti maltaze in saharaze po Dahlqvistovi metodi | 31 |
| 3.2.8 Merjenje aktivnosti tkivne transglutaminaze | 33 |
| 3.2.9 Statistične metode za analizo rezultatov | 35 |
| 4 REZULTATI IN RAZPRAVA | 36 |
| 4.1 KULTIVIRANJE PRIMARNIH KULTUR PODGANJIH EPITELIJSKIH CELIC Z GLIADINSKIM PEPTIDOM p₃₁₋₄₃----- | 36 |
| 4.2 SPREMLJANJE VPLIVA GLIADINSKEGA PEPTIDA p₃₁₋₄₃ NA ŠTEVILO CELIC, ŽIVOST CELIC IN DELEŽ VILUSNIH ENTEROCITOVS ----- | 38 |
| 4.3 SPREMLJANJE VPLIVA GLIADINSKEGA PEPTIDA p₃₁₋₄₃ NA AKTIVNOST MALTAZE, SAHARAZE IN TKIVNE TRANSGLUTAMINAZE ----- | 45 |
| 4.3.1 Spremljanje specifične aktivnosti maltaze..... | 46 |
| 4.3.2 Spremljanje specifične aktivnosti saharaze | 51 |
| 4.3.3 Spremljanje specifične aktivnosti tkivne transglutaminaze | 56 |
| 5 SKLEPI | 60 |
| 6 LITERATURA | 63 |
| 7 PRILOGE | 70 |
| 7.1 ŠTEVILO CELIC, ŽIVOST IN DELEŽ ENTEROCITOVS V POSAMEZNIH KULTURAHS----- | 70 |

POVZETEK

Celiakija je kronična vnetna bolezen ozkega črevesa, ki jo spremljajo različni zunajčrevesni simptomi, številni zapleti in pridružene bolezni. Pri razvoju bolezni ima najpomembnejšo vlogo gluten, ki pri genetsko predispoziranih osebah sproži prekomeren imunski odziv ter povzroči histološke, morfološke in funkcionalne spremembe sluznice ozkega črevesa. Dosedanje študije kažejo, da tako gliadinski kot tudi gluteninski peptidi glutena lahko sprožijo imunski odgovor ali delujejo direktno toksično na sluznico ozkega črevesa. V zadnjih letih je bilo sintetiziranih in testiranih predvsem mnogo različnih gliadinskih peptidov, pri čemer so ocenjevali njihovo toksičnost oziroma imunogenost, ter ugotavljali kateri fragmenti in aminokislinska zaporedja teh peptidov imajo učinke na črevesne epitelijske celice. Za proučevanje patoloških dogajanj in mehanizmov toksičnih vplivov glutenskih peptidov se uporablajo številni *in vitro* testni modeli, predvsem primarne suspenzijske kulture epitelijskih celic ozkega črevesa.

Namen našega raziskovalnega dela je bil proučevanje učinkov sintetičnega gliadinskega peptida p₃₁₋₄₃, za katerega je dokazano, da ima toksični vpliv na črevesne epitelijske celice bolnikov s celiakijo. Tokom 96 ur smo kultivirali podganje epitelijske celice ozkega črevesa z gliadinskim peptidom p₃₁₋₄₃ v dveh različnih koncentracijah 200 µg/mL in 300 µg/mL, del vsake kulture pa smo kultivirali brez peptida. Vpliv peptida na primarne kulture podganjih črevesnih epitelijskih celic smo spremljali preko števila celic, celične živosti in deleža enterocitov ter aktivnosti maltaze, saharaze in tkivne transglutaminaze.

Ugotovili smo, da gliadinski peptid p₃₁₋₄₃ nima značilnega vpliva na morfologijo, število in živost "zdravih" podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa, niti na delež diferenciranih vilusnih enterocitov. Peptid prav tako ni značilno vplival na aktivnost maltaze in saharaze, je pa povzročil značilen porast aktivnosti tkivne transglutaminaze. Učinek gliadinskega peptida p₃₁₋₄₃ na "zdrave" podganje epitelijske celice ozkega črevesa je torej viden le preko aktivnosti tkivne transglutaminaze, ki je vpletena v imunološki zaplet pri celiakiji in je zato dober pokazatelj toksičnih vplivov. Izsledki študije na podganjem modelu so pomembni za optimizacijo in prenos metode na kultiviranje humanih enterocitov, prispevajo pa tudi k razvoju novih terapevstkih pristopov za zdravljenje celiakije.

Ključne besede: celiakija, glutenski peptidi, primarne suspenzijske kulture epitelijskih celic ozkega črevesa, podganji enterociti, maltaza, saharaza, tkivna transglutaminaza, celična živost

ABSTRACT

Coeliac disease is a chronic inflammatory disease of the small intestine, accompanied by different extraintestinal symptoms, difficulties and related diseases. The most important part in the development of this disease is gluten which, in genetically predisposed persons, provokes excessive reactions of the immune system and causes histological, morphological and functional changes of the mucous membrane of the small intestine. The studies conducted so far have shown that gliadin and glutenin peptides of gluten can cause an immune reaction or work directly toxically on the mucous membrane. Lately many different gliadin peptides were tested to determine which of the fragments and amino acid sequences affect the epithelial cells of the intestine. In the study of the mechanisms of the toxic effects of the gluten peptides many *in vitro* test models are used, mostly primary suspension cultures of the epithelial cells of the small intestine.

The purpose of our research was to study the effects of the synthetic gliadin peptide p₃₁₋₄₃ which proves to have an effect on the epithelial cells of the intestine in coeliac patients. Within 96 hours we cultivated epithelial cells of the small intestine of rats with peptide p₃₁₋₄₃ in two different concentrations 200 µg/mL in 300 µg/mL, part of each culture was cultivated without the peptide. The effect that the peptide made on the primary culture of the intestine epithelial cells was monitored by the number of cells, cellular viability, the portion of enterocytes and the activity of maltase, sucrase and tissue transglutaminase. We have concluded that the gliadin peptide p₃₁₋₄₃ does not have a distinctive influence on morphology, the number and the viability of the “healthy” epithelial cells of the small intestine of rats, nor does it have an effect on the number of the differentiated enterocytes. Peptide has not had a distinctive influence on the maltase and sucrase activity, but it did however cause a visible increase of the tissue transglutaminase activity. The effect that the gliadin peptide p₃₁₋₄₃ had on the “healthy” epithelial cells of the small intestine of rats is therefore noticeable only by the activity of the tissue transglutaminase which is involved in the immune response concerning celiac disease, and has thereby proven to be good indicator of the toxic effects. The results of the research made on the rat model are important in the optimizing and transferring method to the cultivation of the human enterocytes, and importantly contribute to the development of the new therapeutic ways in treating the coeliac disease.

Key words: coeliac disease, gluten peptides, primary suspension cultures of the epithelial cells of the small intestine, rats' enterocytes, maltase, sucrase, tissue transglutaminase

SEZNAM OKRAJŠAV

| | |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Ab/Am | antibiotik/antimikotik |
| CaCo-2 | celična linija iz humanega adenokarcinoma kolona |
| CB | Crohnova bolezen (angl.: Crohn's Disease) |
| CD4 | membranski glikoprotein na citotoksičnih limfocitih T |
| CD8 | membranski glikoprotein na celicah T pomagalkah (limfociti T) |
| DMSO | dimetil sulfoksid |
| DNES | difuzni nevroendokrini sistem (angl.: Diffuse Neuro-Endocrine System) |
| DTT | ditiotreitol |
| EC | encimski razred (angl.: Enzyme Class) |
| EDTA | etilendiamintetraocetna kislina (angl.: ethylenediaminetetraacetic acid) |
| EMA | antiendomizijska protitelesa |
| F | fenilalanin |
| FBS | fetalni goveji serum (angl.: Fetal Bovine Serum) |
| G | glicin |
| GALT | s črevesom povezano limfoidno tkivo (angl.: gut-associated lymphoid tissue) |
| GOD | glukoza-oksidaza |
| Hep-2 | celična linija iz humanega karcinoma grla |
| HEPES | 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetan-sulfonska kislina |
| HLA DQ | humani levkocitni antigen DQ (angl.: human leukocyte antigen DQ) |
| HMW | visoka molekulska masa (proteinov) (angl.: High Molecular Weight) |
| HT-29 | celična linija iz humanega adenokarcinoma kolona |
| IEC | intestinalna epitelijska celična linija (angl.: Intestinal Epithelial Cell line) |
| IEL | intraepitelijski limfociti |
| IFN- γ | interferon γ |
| IgA/IgG | imunoglobulin A/imunoglobulin G |
| IK | intermediarni kolitis (angl.: Indeterminate Colitis) |
| IL | interlevkin |
| IU | enota katalitične aktivnosti encima (angl.: International Unit) |

| | |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| KVČB | kronična vnetna črevesna bolezen |
| L | levcin |
| LMW | nizka molekulska masa (proteinov) (angl.: Low Molecular Weight) |
| Lovo | celična linija iz humanega adenokarcinoma kolona |
| MHC | poglavitni histokompatibilnostni kompleks (angl.: major histocompatibility complex) |
| MMW | srednja molekulska masa (proteinov) (angl.: Medium Molecular Weight) |
| MOPS | 3 - (N-morfolino) propansulfonska kislina |
| NOD2 | nukleotidni oligomerizirajoči predel 2 (angl.: nucleotide oligomerization domain 2) |
| P | prolin |
| PAS | Schiffova reakcija (angl.: Periodic Acid-Schiff) |
| PBS-T | fosfatni pufer s Tween 20 (angl.: Phosphate Buffered Saline with Tween 20) |
| POD | peroksidaza |
| p ₃₁₋₄₃ | sintežni gliadinski peptid (H – LGQQQPFPPQQPY – OH · HCl) |
| Q | glutamin |
| RPMI | osnovni medij za celične kulture (angl.: Roswell Park Memorial Institute) |
| S | serin |
| SB | sladkorna bolezen |
| SD | standardna deviacija |
| TG2 | tkivna transglutaminaza |
| TGO | Tris glukoza-oksidazni reagent |
| TMB | 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin |
| TNF-α | tumor nekrotizirajoči faktor α (angl.: tumor necrosis factor α) |
| Tris | tri(hidroksimetil)aminometan |
| UK | ulcerozni kolitis (angl.: Ulcerative Colitis) |
| Y | tirozin |

1 UVOD

1.1 GLUTEN IN TOKSIČNI PEPTIDI

Beljakovine rastlinskega izvora imajo v prehrani zdravih ljudi zelo pomembno mesto. Popolnoma drugačna pa je njihova vloga v prehrani bolnika s celiakijo, kjer prav sestavine istih beljakovin, predstavlajo toksične snovi, ki vplivajo na sluznico tankega oziroma ozkega črevesa in jih zato v prehrani teh bolnikov ne sme biti. (1) Najpomembnejši dejavnik za razvoj celiakije je beljakovina gluten, ki jo vsebujejo žitarice. (2) Gluten pri genetsko predispoziranih osebah sproži imunski odgovor ter povzroči histološke spremembe sluznice ozkega črevesa. Bolezensko stanje se izboljša ob prenehanju uživanja glutena, ki pa mora biti doživljenjsko, saj lahko že manjša količina glutena v hrani ponovno poslabša stanje črevesne sluznice. (3, 4)

Gluten se nahaja v večini žit: pšenici, piri, ječmenu, rži in ovsu. Največji delež glutena je v pšenici (10 %), najmanjši pa v ovsu (v sledeh). Gluten je skupno ime za več kot 50 različnih elastičnih in v vodi netopnih proteinov, ki jih delimo glede na topnost v dve skupini. (3, 4, 5) Prvo skupino predstavlajo v alkoholu topni proteini (prolamini), ki jih v pšenici imenujemo **gliadini**, v rži *sekalini*, v ječmenu *hordeini* in v ovsu *avenini*. Vsi prolamini imajo določena sorodna aminokislinska zaporedja, ki lahko pri bolniku s celiakijo sprožijo imunski odgovor. (1, 3, 6) Vsebujejo veliko glutamina (okoli 35 %), prolina (okoli 15 %) in hidrofobnih aminokislin ter malo lisina (pod 2 %). Glede na mobilnost pri elektroforezi ločimo α/β , γ in ω gliadine. Nizkomolekulski gliadini se lahko povežejo z disulfidnimi vezmi in tvorijo visokomolekulske gliadine. Drugo skupino glutenskih proteinov predstavlajo v kislinah topni proteini (glutelini), ki jih v pšenici imenujemo **glutenini**. Delijo se na glutenine z nizko molekulsko maso (LMW) in glutenine z visoko molekulsko maso (HMW). (1, 3, 4, 6, 7) Obstaja tudi klasifikacija, ki deli proteine glutena glede na molekulsko maso v tri skupine:

1) Skupina proteinov z nizko molekulsko maso (LMW)

V tej skupini najdemo α in γ gliadine ter glutenine z nizko molekulsko maso. Sestavljeni so iz 250 do 300 aminokislin.

2) Skupina proteinov s srednjo molekulsko maso (MMW)

V to skupino spadajo ω gliadini. Zanje je značilno, da ne vsebujejo tiolnih aminokislin (metionin in cistein). Sestavljeni so iz 400 do 500 aminokislin.

3) Skupina proteinov z visoko molekulsko maso (HMW)

Skupino z visoko molekulsko maso sestavljata dva različna tipa proteinov, in sicer x-HMW in y-HMW. Za to skupino je značilna relativno visoka vsebnost glicina in tirozina. Sestavljeni so iz 600 do 800 aminokislin. (4)

Dosedanje študije kažejo, da različni glutenski peptidi lahko sprožijo imunski odgovor ali delujejo direktno toksično na sluznico ozkega črevesa. Najbolje raziskani so gliadini, medtem ko so za glutenine dolgo časa predvidevali, da so neškodljivi. V kasnejših raziskavah so odkrili imunostimulatorne peptide tako med α -gliadini in γ -gliadini kot tudi med LMW in HMW glutenini. Zaenkrat največjo toksičnost pripisujejo α -gliadinu. (6, 7, 8, 9) Znano je že celotno aminokislinsko zaporedje več glutenskih peptidov, v zadnjih letih pa raziskujejo predvsem kateri fragmenti oziroma aminokislinska zaporedja teh peptidov so odgovorni za razvoj celiakije. (4, 6) Posebnost, opažena pri glutenskih epitopih, je visoka vsebnost prolinskih (P) in glutaminskih (Q) ostankov. Za toksičnost glutenskih peptidov naj bi bili odgovorni predvsem dve aminokislinski zaporedji: glutamin-glutamin-glutamin-prolin (QQQP) in prolin-serin-glutamin-glutamin (PSQQ). Takšni zaporedji vsebujejo fragmenta p31-43 in p44-55, ki pripadajo α -gliadinu, in za katera je dobro znano, da *in vitro* ter *in vivo* povzročata poškodbe črevesne sluznice pri bolnikih s celiakijo. Peptid p31-43 je sposoben izzvati prirojen imunski odziv v epiteliju sluznice tako, da stimulira ekspresijo vnetnega mediatorja IL-15. Sekvenco QQQP pa vsebuje tudi peptid p31-49, ki je prav tako toksičen za bolnike s celiakijo in je verjetno pomemben pri aktivaciji prirojenega imunskega sistema. Pomembno je bilo tudi odkritje 33-mernega fragmenta α -gliadina (p57-89), ki vsebuje kar šest epitopov in je zelo imunogen. (6, 8, 9, 10) V zadnjih letih je bilo sintetiziranih in testiranih mnogo različnih gliadinskih peptidov, pri čemer so ocenjevali njihovo toksičnost oziroma imunogenost, najpogosteje na *in vitro* sistemih različnih izoliranih tkiv in celic. (6, 11) Pojavljajo pa se tudi ugibanja ali niso morda isti peptidi glutena vpleteni tudi v etiopatogenezo drugih črevesnih bolezni, kot sta ulcerozni kolitis in Crohnova bolezen. (12)

1.2 VNETNE ČREVESNE BOLEZNI

1.2.1 Celiakija

Celiakija ali glutenska enteropatija je kronična vnetna bolezen ozkega črevesa, ki nastane kot posledica neustreznega imunskega odziva limfocitov T na zaužiti gluten žitaric pri genetsko predispoziranih osebah. (13, 14, 15, 16) Za celiakijo so značilne trajna

(doživljenjska) intoleranca na gluten, različne morfološke in funkcionalne spremembe sluznice ozkega črevesa, širok spekter kliničnih znakov ter številni asimptomatski primeri. (16) Gre za sistemsko bolezen z različnimi zunajčrevesnimi znaki, zapleti in pridruženimi boleznimi. (17) Celiakija se lahko pojavi že v otroštvu ali šele v odrasli dobi in je ena najpogostejših genetsko pogojenih in kroničnih bolezni prebavnega trakta. Njena pogostost je v Evropi in ZDA ocenjena na 1:100-200 prebivalcev. (13, 16, 18)

Osnova zdravljenja celiakije je popolna odstranitev glutena iz prehrane, ki mora biti doživljenjsko. Odsvetujejo se izdelki iz pšenice, pire, rži in ječmena. Po uvedbi brezglutenske diete pri večini bolnikov hitro pride do izboljšanja kliničnih znakov in histoloških sprememb na sluznici ozkega črevesa, zmanjša pa se tudi tveganje za pojav zapletov bolezni. (16, 19, 20)

Pojavne oblike in klinična slika celiakije

Klinična slika pri celiakiji je zelo raznolika in je odraz starosti bolnika, trajanja bolezni in obsega sprememb na sluznici črevesja. Glede na klinično sliko ločimo več pojavnih oblik celiakije: tipična ali klasična celiakija, atipična celiakija, asimptomatske oblike celiakije (*tiha, latentna in potencialna celiakija*) in refraktorna celiakija. (13, 16, 20, 23)

Različne klinične znake celiakije pri otrocih in odraslih bolnikih prikazuje Preglednica 1. Poleg značilnih črevesnih simptomov se lahko pojavljajo tudi številni zunajčrevesni znaki. (3, 13, 16, 20, 23, 24)

Preglednica 1: Klinični znaki celiakije pri otrocih in odraslih bolnikih.

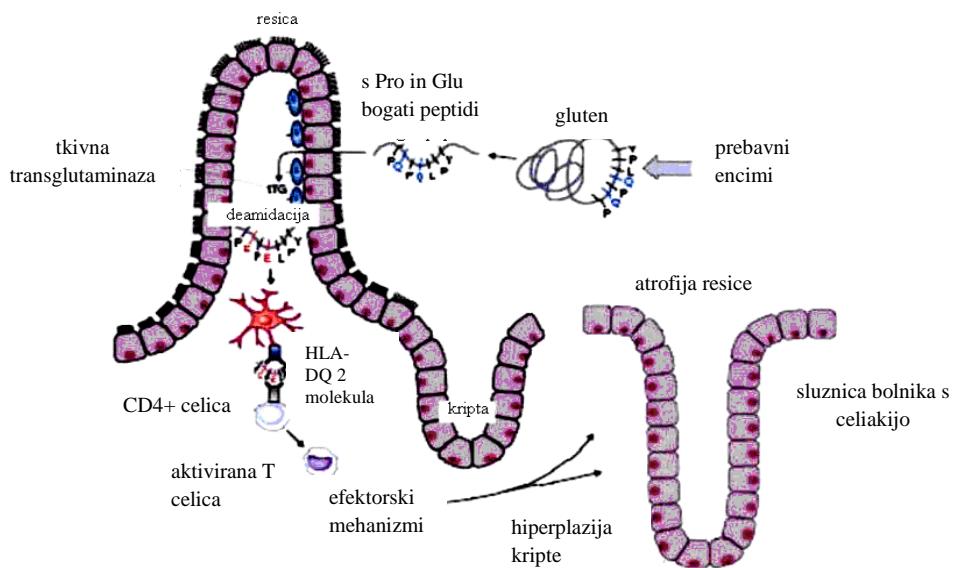
| Mesto izražanja bolezni | Simptomi |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Prebavni trakt | driska, penasto, svetlo, obilno in smrdeče blato, napihnjen trebuh, slabost/bruhanje, izguba telesne teže, anoreksija, bolečine v trebuhu, steatoreja, zaprtje |
| Krvožilni sistem | anemija (posledica malabsorpcije železa, folatov in vitamina B ₁₂), pomanjkanje vitamina K, levkopenija, trombocitopenija |
| Kosti | osteoporoza ali osteopenija (posledica malabsorpcije kalcija in vitamina D), bolečine v kosteh in sklepih, rahitis, hipoplazija zobne sklenine, arthritis |
| Mišice | mišična atrofija, mišični krči |
| Nevrološki sistem | periferna nevropatična, epilepsija, ataksija, demenca, depresija, anksioznost |
| Endokrini sistem | nizka rast, zapozneta puberteta, neplodnost, ponavljajoči splavi, neredne menstruacije |
| Koža | dermatitis herpetiformis Duhring, alopecija, vaskulitis, ponavljajoč aftozni stomatitis |
| Drugo | utrujenost, povišani jetrni encimi, edemi, hiposplenizem, nočna slepota, sekundarna laktozna intoleranca |

Etiopatogeneza celiakije

Pri nastanku celiakije igrajo pomembno vlogo trije dejavniki: dejavniki okolja, genetski dejavniki in imunološki dejavniki. (2, 21, 22)

Dejavniki okolja so različna žita v prehrani, ki vsebujejo gluten. (3, 16) Celiakija se pogosteje pojavlja pri otrocih, ki niso bili dojeni, povečano tveganje pa predstavlja tudi infekcijske bolezni. Pri genetsko predispoziranih osebah lahko celiakijo sproži okužba z adenovirusom. V organizmu se sproži reakcija na gluten zaradi navzkrižne reaktivnosti med virusnimi proteini in antigeni v glutenu. (23)

Celiakija je genetsko pogojena bolezen. Prevalenca bolezni med ožjimi sorodniki se ocenjuje med 5 in 10 %. (2, 22, 24, 25) Geni, ki jih danes povezujejo s celiakijo, so predvsem HLA geni razreda I in II. Ti geni tvorijo površinske glikoproteine glavnega histokompatibilnega kompleksa (MHC), ki so ključni za imunski odziv, saj omogočajo, da limfociti T prepoznajo antigen (pri celiakiji peptide glutena). (21, 24) Zapis za HLA-DQ2 heterodimer najdemo pri 95 % bolnikov s celiakijo, 5 do 10 % bolnikov pa ima zapis za HLA-DQ8 heterodimer. Natančnejše genetske analize so pokazale, da je v predispozicijo za razvoj celiakije verjetno vključenih še več genov na različnih kromosomih. Ocenjujejo, da so geni HLA razreda II odgovorni za približno 40 % genetskega prispevka k razvoju bolezni, medtem ko so za ostalo odgovorni drugi funkcijski geni na ne-HLA lokusih. (13, 17, 22, 23, 26)



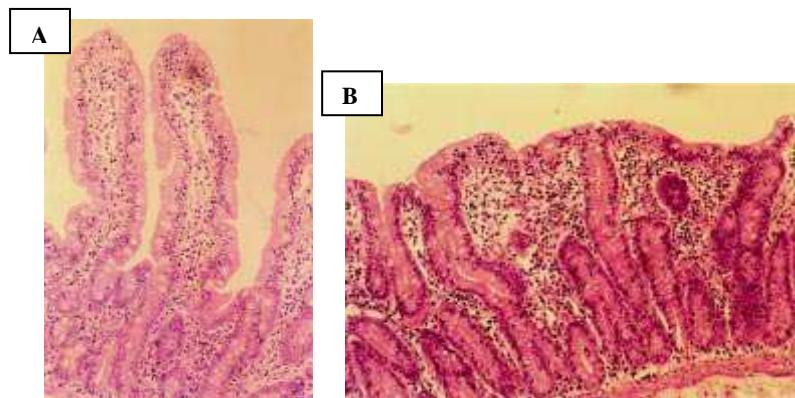
Slika 1: Hipotetična shema povezanosti glutena in avtoimunskega odgovora pri celiakiji. (8)

V nastanek celiakije so vpleteni tudi celični in humoralni imunski mehanizmi. (16) Peptidi glutena se v črevesju ne prebavijo popolnoma, saj so zaradi visoke vsebnosti prolina

odporni na delovanje prebavnih encimov. Produkti delne razgradnje glutena pri bolnikih s celiakijo ne vstopajo v epitelijske celice, temveč v sluznico. Med akutno fazo celiakije je namreč povečana ekspresija zonulina, ki regulira prepustnost tesnih stikov med enterociti. Preko okvarjenih tesnih stikov lahko manjši peptidi glutena paracelularno prehajajo v lamino proprio. Prehod se verjetno vrši tudi transcelularno skozi poškodovane črevesne epitelijske celice. (16, 27, 28, 29) V lamini propriji sluznice so peptidi glutena izpostavljeni tkivni transglutaminazi (TG2), ki deamidira glutamin do negativno nabite glutaminske kisline. Spremenjeni peptidi glutena se vežejo na HLA-DQ2 ali HLA-DQ8 molekule, ki jih nato predstavijo celicam imunskega sistema. V lamini propriji se aktivirajo CD4+ limfociti T, pri čemer sodeluje pridobljen imunski sistem. Posledica tega je humoralni imunski odgovor z zorenjem limfocitov B do plazmatk in s tvorbo IgA in IgG protiteles (antigliadinska – AGA, antiendomizijska – EMA, protitelesa proti TG2 – anti-tTG) ter celični imunski odgovor s tvorbo vnetnih citokinov, zlasti IFN- γ , TNF- α in IL, ki povzročijo poškodbo črevesne sluznice ter apoptozo epitelijskih celic. (8, 16, 23, 26, 30) V epiteliju se aktivirajo CD8+ limfociti T, pri čemer sodeluje prirojen imunski sistem. Poveča se število intraepitelijskih limfocitov (IEL), pride pa tudi do citotoksičnega učinka na epitelijske celice, za kar naj bi bil odgovoren citokin IL-15, vendar še ni pojasnjeno, kakšna je povezava med njim in glutenom. (16, 19, 24, 26) Hipotetično shemo avtoimunskega odziva pri celiakiji prikazuje Slika 1.

Patološke spremembe sluznice ozkega črevesa

Imunski odziv na peptide glutena povzroči značilno spremembo sestave imunskih celic v lamini propriji, morfološke spremembe v epitelijskih celicah ter značilne histološke spremembe sluznice ozkega črevesa. Prisotna je popolna ali delna atrofija črevesnih resic, hiperplazija kript in povečano število IEL. (13, 16, 24, 25) Celice postanejo kubične ali ploščate oblike in epitelij se spremeni v večskladni izoprizmatski. V najtežjih primerih je vidna popolnoma sploščena površina sluznice ozkega črevesa, kar ima za posledico zmanjšanje absorpcijske površine in malabsorpcijo hranilnih snovi. (18, 19, 25, 26) Poveča se propadanje enterocitov, okrnjena pa je tudi njihova funkcija, kar se odraža v znižanju aktivnosti disaharidaz, peptidaz in drugih encimov. (3, 26) Spremembe so običajno najbolj izražene v dvanajstniku in proksimalnem jejunumu, v distalnem delu pa se zmanjšujejo. Najizrazitejše so na vrhovih črevesnih gub. (16, 21, 25) Histološko sliko normalne sluznice ozkega črevesa in sluznice ozkega črevesa pri bolniku s celiakijo prikazuje Slika 2.



Slika 2: (A) Histološka slika normalne sluznice ozkega črevesa. (B) Histološka slika sluznice ozkega črevesa pri bolniku s celiakijo, kjer je prisotna popolna atrofija črevesnih resic, hiperplazija črevesnih kript in izrazita infiltracija z intraepitelijskimi limfociti. (13)

1.2.2 Kronična vnetna črevesna bolezen

Kronična vnetna črevesna bolezen (KVČB) je vnetno obolenje črevesa, za katerega je značilen kroničen potek z akutnimi zagoni ter vmesnimi krajsimi ali daljšimi remisijami. Bolezen je posledica nenormalnega imunskega odziva obrambnega sistema na črevesno floro, zaradi česar se razvijejo vnetne spremembe črevesne sluznice. Glavni oblici KVČB sta ulcerozni kolitis (UK) in Crohnova bolezen (CB). Bolezni sta si podobni v kliničnem poteku, simptomih ter v morfoloških značilnostih. Pri nekaterih bolnikih (10-15 %) razmejitev med boleznjima ni možna in takrat govorimo o intermediarnem ozziroma nedoločenem kolitisu (IK). (16, 31, 32, 33) Epidemiologi so ugotovili, da v razvitih deželah pojavnost obeh bolezni vztrajno narašča. (34) Vrh pojavljanja UK je med 25. in 35. letom, CB pa se najpogosteje pojavi med 15. in 25. letom starosti. (33) Kljub številnim raziskavam etiopatogeneza KVČB še ni popolnoma razjasnjena. Za začetek in potek bolezni so poleg vnetnih in imunskih dejavnikov ter dejavnikov okolja najpomembnejši genetski dejavniki. (16, 33, 34). Raziskave se osredotočajo predvsem na številne gene, katerih beljakovinski produkti sodelujejo v imunskem in vnetnem odgovoru organizma, ali pa so del sluznične zaščite prebavne cevi. Mednje sodijo geni za HLA kompleks, TNF- α , antagonist IL-1 receptorja in drugi. Pred kratkim so odkrili gen NOD2, katerega polimorfizem je jasno povezan s pojavom Crohnove bolezni. (31, 33, 35)

Ulcerozni kolitis

Ulcerozni kolitis praviloma prizadene debelo ozziroma široko črevo in v 95 % primerov tudi rektum. Vnetje poteka enakomerno in neprekinjeno vzdolž celotnega prizadetega segmenta. Običajno se začne v rektumu in se nato širi proksimalno po širokem črevesu. Vnetni proces primarno prizadene samo sluznico in le v manjši meri sega še v podsluznico.

Značilne so degenerativne histološke spremembe s propadanjem črevesnega epitelija in izgubo epitelijskih celic ter številne drobne pikčaste ulceracije. pride tudi do hiperplazije žilja v sluznici, zaradi česar se poveča nagnjenost h krvavitvam. (16, 31) Tipični znaki bolezni so driska, prisotnost krvi v blatu, bolečine v spodnjem delu trebuha, krči in pogost občutek nujnega odvajanja blata. Pogosto so prisotni tudi zunajčrevesni znaki, kot so povisana telesna temperatura, nočno znojenje, utrujenost, neješčnost, izguba telesne teže, anemija, spremembe na koži in na očeh, arthritis... (16, 31, 32) Bolniki z vnetjem celotnega širokega črevesa imajo težje akutne zaplete, kot so obilna krvavitev, toksični megakolon (toksična razširitev črevesa) ali predrtje stene črevesa. Pri teh bolnikih je večje tveganje za razvoj raka širokega črevesa in danke. (33)

Crohnova bolezen

Pri Crohnovi bolezni lahko vnetni proces zajame vse dele prebavnega sistema, od sluznice v ustni votlini do anusa, najpogosteje sta prizadeta terminalni ileum in široko črevo. Značilno je menjavanje vnetno spremenjenih in zdravih predelov prebavne cevi, vnetje pa običajno zajame vse sloje črevesne stene. Sluznica postane nepravilno zadebeljena, pojavijo se ognojki, svetlina se zoži, značilne pa so tudi globoke ulceracije. Pojavijo se lahko fistule, povezave med dvema različnima deloma črevesa ali črevesom ter organi v okolini (koža, nožnica, mehur). Če bolezen prizadene ozko črevo, imajo bolniki pogosteje obstruktivno obliko bolezni z zožitvami črevesa in ovirami prehoda vsebine črevesa, pojavijo se driska, bolečine v trebuhu, neješčnost, malabsorpcija in izguba telesne teže. Pri prizadetosti širokega črevesa so pogostejši simptomi vnetja ali krvavitve. Prisotni so krči, kronične driske ter sluzasto in krvavo blato. Pojavijo se lahko še zunajčrevesni znaki, kot so vnetje v sklepih, osteoporoza, vnetje beločnic, anemija, kronična oslabelost, razjede v ustih, kožne spremembe... Bolniki s CB imajo večje tveganje za razvoj raka širokega črevesa in danke. (16, 31, 33, 36)

UK in CB zaenkrat nista ozdravljeni, kajti vzrok za pojav obej bolezni še ni popolnoma poznan. Zdravljenje poteka le simptomatsko, kjer se poskuša vzdrževati izboljšano stanje ter obvladovati zagone bolezni. V eni izmed študij so ugotovili, da imajo bolniki s celiakijo in njihovi ožji sorodniki večjo predispozicijo za CB in druge vnetne črevesne bolezni kot ostala populacija. Obe bolezni namreč prizadenata prebavni sistem ter povzročita vnetno reakcijo in imunski odziv, kjer pride do patoloških sprememb črevesne stene, za obe je

značilna prisotnost protiteles proti TG2 in povečana prepustnost tesnih stikov. Dejstva torej kažejo na morebitno povezanost med KVČB in celiakijo. (12, 33, 34)

1.3 IN VITRO TESTNI MODELI ZA PROUČEVANJE CELIAKIE

Za raziskovanje in spoznavanje ozadja nastanka celiakije in proučevanje vpliva toksičnih peptidov glutena se najpogosteje uporablajo številni *in vitro* testni modeli. Pri *in vivo* študijah obstajajo določene omejitve, predvsem zaradi številnih etičnih dilem, *in vitro* testni modeli pa so lažje dostopni za opazovanje in eksperimentiranje. Med *in vitro* testne sisteme uvrščamo celične, tkivne in organske kulture različnega izvora. S tovrstnimi testnimi modeli posnemamo okolje, ki je prisotno v živem organizmu. Prednost dela s celicami v kulturi, v primerjavi z delom s celicami v organizmu, pa je predvsem v tem, da lažje zagotovimo enake in definirane eksperimentalne pogoje za vse celice in da eksperimentalne razmere lažje spremojemo. (37, 38, 39)

1.3.1 Gojenje celic *in vitro*

V *in vitro* pogojih je mogoče kultivirati celoten organ, del organa, tkivo ali posamezne celice. **Organska kultura** so nerazbiti koščki tkiva, ki *in vitro* ohranjajo tridimenzionalno strukturo in vse histološke značilnosti tkiva *in vivo*. V sredini kulture pogosto pride do nekroze tkiva zaradi pomanjkanja hrane in kisika. Zato moramo za vsak poskus pripraviti sveže kulture, kar pa povzroči slabšo ponovljivost. (38, 40) **Tkivna kultura** ali **kultura primarnega eksplanta** so razrezani koščki tkiva, ki se pritrdijo na podlago hranilnega gojišča, iz njih pa začnejo izraščati žive celice. Ob rednem menjavanju gojišča lahko tkivna kultura preživi tudi več tednov. **Celična kultura** je homogena ali heterogena populacija celic, ki živijo in se razmnožujejo v hranilnem gojišču. Pridobi se lahko iz tkivne kulture ali pa tako, da se v koščku tkiva prekinejo medcelične povezave s pomočjo proteolitičnih encimov (tripsin, kolagenaza) ali mehansko, pri čemer nastane suspenzija posameznih celic, ki se nato nasadi v posode s hranilnim medijem. Uporabljajo se lahko tekoča ali trdna gojišča. Celične kulture, ki so pripravljene na tak način, neposredno iz tkiva, imenujemo **primarne kulture**. Normalne celice v kulturi rastejo in se delijo le toliko časa, dokler ne zapolnijo celotne površine posode v eni sklenjeni plasti (konfluentna kultura). Med celicami se vzpostavijo medcelični stiki. Na tej stopnji se zaradi kontaktne inhibicije gibanje in delitev celic ustavi. Nekatere transformirane in tumorske celice pa nimajo kontaktne inhibicije, zato so bolj gibljive in lahko rastejo druga čez drugo v več

plasteh. Pri gojenju celic *in vitro* je pomembno, da se vzdržuje nizka gostota celic, ki pomaga ohranjati normalen fenotip v kulturi. Ob povečanju števila celic v primarni kulturi je celice potrebno razredčiti in nasaditi v nova gojišča. Po prvi pasaži postane primarna kultura že **celična linija**, ki se z nadaljnimi pasažami selekcionira, nato postane stabilnejša in nespremenjena skozi številne generacije, potem pa po 40-50 pasažah propade. (37, 38, 40) Izjema so le zarodne in genetsko spremenjene celice, ki imajo zmožnost neskončne delitve in se lahko ohranjajo v kulturi dolgo časa, zato jih imenujemo **trajne celične linije**. Te celice se morfološko in fiziološko razlikujejo od celic, iz katerih izvirajo. Ohranjene imajo predvsem osnovne lastnosti, ki celici omogočajo preživetje v kulturi. Pri nastanku trajnih celičnih linij pride do *in vitro* transformacije, ki se zgodi spontano ali pa je kemično ali virusno povzročena. (37, 40)

Prednosti gojenja celic *in vitro* so lažje zagotavljanje enakih pogojev za vse celice, relativno konstantni fiziološki pogoji, homogenost vzorca, ekonomičnost (potrebne so manjše količine reagentov) in etičnost. Problemi gojenja celic v kulturi pa so izguba specifičnih lastnosti in celičnih funkcij, proliferacija, spremeni se tridimenzionalna struktura tkiva, zaradi česar se prekinejo interakcije med celicami in medceličnino, manjkata tudi živčni in endokrini sistem. Kulture so genetsko slabše stabilne, pogosto pride tudi do dediferenciacije. (40)

1.3.2 Kultiviranje epitelijskih celic ozkega črevesa

Začetki kultiviranja tkiva ozkega črevesa segajo že v leto 1969, ko sta Browning in Trier prva uspešno kultivirala humane intestinalne biopte. Organsko kulturo sta uspela ohraniti v *in vitro* pogojih 24 ur. (41) Browning-Trierjeva metoda je bila kasneje uspešno uporabljena za kultiviranje tkiva ozkega črevesa različnih živalskih vrst, a je bila neuspešna za kultiviranje ozkega črevesa podgane. Podganje epitelijske celice imajo namreč krajšo življenjsko dobo kot humane epitelijske celice, zato je težje vzpostaviti dolgoživečo kulturo podganjega ozkega črevesa. Leta 1987 je Lukač Bajalo in sod. uspelo ohraniti integríteto in funkcijo podganjega ozkega črevesa skozi 48 ur z modificirano Browning-Trierjevo metodo. (42, 43, 44) Kultiviranje je uspelo zaradi boljše oksigenacije tkiva med kultiviranjem. Znano je namreč, da je potreba tkiv po kisiku obratno sorazmerna s površino organizma, kar pomeni, da je za kultiviranje tkiv malih živali, kot je npr. podgana, potrebno dosti več kisika za ohranitev živosti, kot pri kultiviranju humanega tkiva. (40, 43, 45) Ista raziskovalna skupina je modificirano Browning-Trierjevo metodo kasneje

uporabila tudi za proučevanje ritmičnih oscilacij aktivnosti disaharidaz in kontrolnih mehanizmov teh ritmov. (43, 44, 46)

Na organskih kulturah so se začela tudi prva proučevanja patogeneze celiakije. Trier in Browning sta leta 1970 prva uporabila svojo metodo za kultiviranje biopsijskih vzorcev sluznice ozkega črevesa bolnikov s celiakijo in ugotovila, da sta proliferacija in migracija epitelijskih celic pri bolnikih s celiakijo pospešeni za več kot dvakrat v primerjavi z zdravimi celicami. (47) Organske in tkivne kulture humanega in živalskega ozkega črevesa se zaradi hitre nekroze in razgradnje ohranijo le kratek čas, v povprečju 24-72 ur in so primerne le za kratkotrajne študije. (43, 47) Pogosteje se uporablajo celične kulture, kjer so celice posamezne. (4, 10) Kultiviranje epitelijskih celic ozkega črevesa je izjemno zahtevno, saj celice potrebujejo ustrezno medcelično komunikacijo, stik z zunajceličnim matriksom in primerne rastne dejavnike za diferenciacijo v heterogene celice črevesnega epitelija. Ob neustreznih pogojih hitro nastopi apoptoza in celična smrt. (47) Z uporabo modificirane Browning-Trierjeve metode so tako poskušali razviti dolgožive primarne suspenzijske kulture epitelijskih celic ozkega črevesa miši in podgane, v katerih bi lahko identificirali posamezne vrste celic s pomočjo specifičnih celičnih označevalcev: disaharidaz, lizocima, kromogranina, mucina... (48, 49) Ista metoda je bila uporabljena tudi z namenom proučevanja vplivov različnih testnih snovi (gliadinskih peptidov, zdravilnih učinkovin, probiotikov in drugih snovi) na posamezne celice živalskega testnega fiziološkega modela, ter za kultiviranje in testiranje "zdravih" humanih epitelijskih celic in celic bolnikov s celiakijo in Crohnovo boleznijo. (50, 51) V primarni kulturi imajo celice omejeno število delitev. Čas preživetja črevesnih epitelijskih celic se glede na uporabljeni metodo giblje med 2 in 7 tedni. Homogene celične linije pa imajo sposobnost daljšega preživetja v *in vitro* pogojih. Te celične linije se običajno pridobijo iz ozkega črevesa podgane (primer so IEC linije), obstajajo pa tudi maligno transformirane črevesne celične linije (Caco-2, HT-29...), izpeljane iz humanega adenokarcinoma kolona. Največ se uporablja Caco-2 celice, ki izkazujejo izredno morfološko in biokemijsko podobnost z epitelijem ozkega črevesa ter imajo lastnosti diferenciranih enterocitov. Kljub temu ostajajo določene omejitve pri uporabi teh kultur - celice so namreč maligno transformirane in imajo verjetno drugačne kontrolne mehanizme kot normalne celice. (45, 52, 53, 54) Pri *in vitro* študijah patogeneze celiakije je potreben celični model, ki čim bolj ponazarja fiziološke pogoje, zato se poraja vprašanje ali so maligno spremenjene celice primerne za ponazarjanje *in vivo* razmer. (45, 53) Maligno transformirane celične linije so

zaradi spremenjenih lastnosti tudi bolj občutljive na gluten. (39) Kljub številnim črevesnim celičnim linijam pa še vedno ni povsem primernih *in vitro* modelov, kjer bi bile prisotne popolnoma diferencirane in normalne (netransformirane) epitelijske celice. (54, 55)

1.3.3 Učinki toksičnih peptidov glutena v celičnih kulturah

Leta 1976 je Hudson prvi opisal nekatere direktne citotoksične učinke gliadina na humane celične linije (kulture humanih intestinalnih celic, Hep-2 celic (trajna linija celic humanega karcinoma grla) ter celic pljuč in ledvic). Sledila so proučevanja vpliva različnih peptidov glutena na epitelijske celice, ki so jih izvedli na humanih in živalskih intestinalnih celičnih linijah, kot so IEC-6 (celična linija iz celic ozkega črevesa podgane), Caco-2 in Lovo celične linije (obe liniji sta izpeljani iz humanega adenokarcinoma kolona)... ter na primarnih kulturah epitelijskih celic ozkega črevesa miši ali podgane. (10, 39) Vse pogosteje pa se uporabljojo tridimenzionalne celične kulture, ki za razliko od običajnih monoslojev ohranjajo specifične morfološke in biokemijske lastnosti, ki ustrezajo *in vivo* tkivu. (39) Pri spremeljanju vpliva glutenskih peptidov na črevesne epitelijske celice se opazujejo histološke spremembe na črevesni sluznici (določanje višine resic in globine kript, določanje višine enterocitov in sprememb mikroresic, spremeljanje črevesne prepustnosti...), povečanje imunskega odziva v sluznici (štetje IEL, določanje specifičnih protiteles...) in biokemijske spremembe na sluznici (spremljanje aktivnosti encimov resaste površine enterocitov...). Raziskave so pokazale, da glutenski peptidi inhibirajo rast celic ter povzročijo upad živosti, spremembe v celični obliki, zmanjšanje velikosti celic in pojav vakuol v citoplazmi. Preko interakcije s površinskim receptorji naj bi povečali sproščanje zonulina in s tem povzročili okvaro tesnih stikov ter povečano prepustnost črevesne sluznice. Glutenski peptidi tudi oslabijo oksidativno ravnotežje (zmanjša se vsebnost glutationa in proteinskih –SH skupin, poveča se lipidna peroksidacija...). *In vitro* študije toksičnosti peptidov glutena so pomembne tako za razumevanje patogenetskih mehanizmov celiakije, kot tudi za iskanje domnevno netoksičnih peptidov glutena, kar bi morebiti pripomoglo tudi k razvoju novih terapevtskih možnosti. (10, 39)

1.4 OZKO ČREVO

1.4.1 Anatomska in histološka zgradba ozkega črevesa

Ozko črevo je tisti del prebavne cevi, ki je pri celiakiji najbolj prizadet. Predstavlja največji del prebavnega sistema in je pri odraslem človeku dolgo 6-7 m (56), pri podgani pa okrog

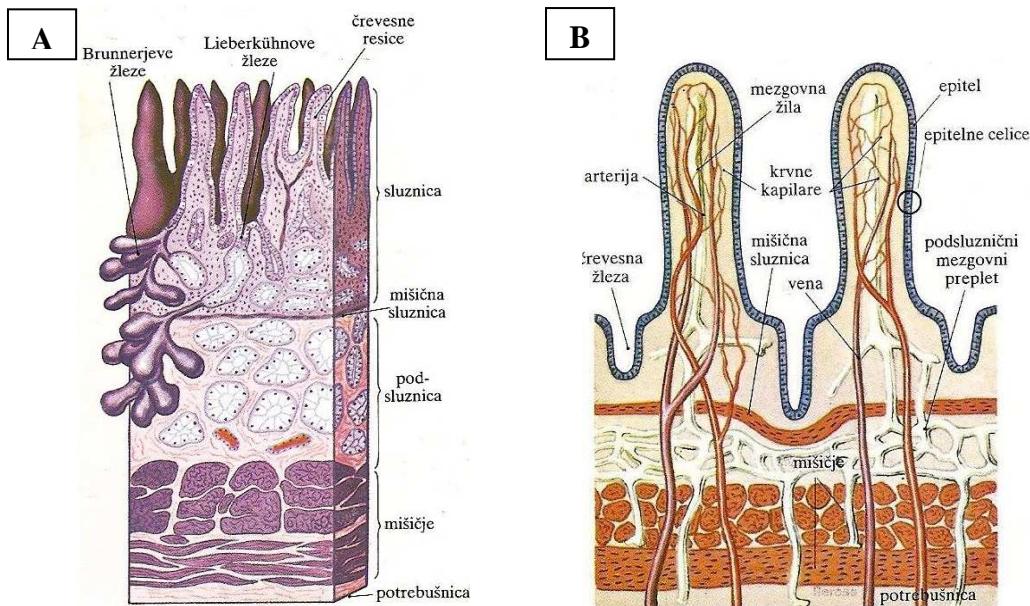
95-140 cm. (60, 62) Razteza se od pilorusa želodca do ileocekalnega stika, kjer ileum preide v slepo črevo. (57) Njegova glavna fiziološka funkcija je prebava hrane in absorpcija hranil, elektrolitov ter vode, ima pa tudi pomembno sekretorno, metabolno, endokrino (tvorba hormonov), živčno (tvorba nevrotransmiterjev) in imunsko (obramba pred bakterijami, endotoksini in antigeni) funkcijo. (56, 58, 59) Pri podgani je prebavni trakt dolg in precej zavit, ozko črevo pa je sestavljeno iz enakih segmentov kot pri človeku ter opravlja enake funkcije. Posebnost prebavnega sistema podgane je odsotnost žolčnika, namesto katerega ima le žolčni vod, po katerem se žolč transportira iz jeter v dvanajstnik. Za razliko od človeka ima podgana vrečasto povečano ozko črevo, ki ima pomembno vlogo pri prebavljanju celuloze iz rastlinske hrane. (60, 61)

Glede na lego in zgradbo delimo ozko črevo na tri anatomske odseke:

- **Dvanajstnik** (duodenum) je začetni, najkrajši in najširši del ozkega črevesa. Pri človeku je dolg približno 30 cm ter širok okrog 6 cm, pri podgani pa meri 9,5-10 cm. V sluznici dvanajstnika se nahaja velika dvanajstnikova papila, v katero se izliva skupno izvodilo žolčevoda in trebušne slinavke.
- **Tešče črevo** (jejunum) je srednji in najdaljši odsek ozkega črevesa. Pri človeku meri 2,5 m, medtem ko pri podgani meri 90-135 cm.
- **Vito črevo** (ileum) je končni odsek ozkega črevesa. Pri človeku je dolgo 3,5 m, pri podgani pa meri 2,5-3,5 cm. V primerjavi z jejunumom ima tanjšo steno in je svetlejše barve. (56, 58, 60, 62)

Notranja površina ozkega črevesa je močno povečana, kar olajšuje vsrkavanje hranilnih snovi. Strukture sluznice in podsluznice: gube, resice in številne mikroresice, absorptivno površino ozkega črevesa skupno povečajo za kar 600-krat. (56, 58, 63)

Kerckringove gube (*plicae circulares Kerckring*) so krožne ali spiralaste oblike. Začnejo se v duodenu, najbolj izrazite so v jejunumu ter proksimalnem delu ileuma, v terminalnem ileumu pa izginejo. Kerckringove gube povečajo površino ozkega črevesa za 3-krat, poleg tega pa tudi mešajo zaužito hrano s pomočjo peristaltike. **Črevesne resice** ali vili (*villi intestinales*) so prstom podobni izrastki sluznice, visoki od 0,5 do 1,5 mm, ki segajo v lumen ozkega črevesa. Najgostejše so v duodenu in jejunumu, v ileumu pa se skrajšajo in razredčijo. V sredini resic so gosti prepleti krvnih žilic, slepi konci drobnih limfnih vodov (lakteal), živčna vlakna, gladke mišične celice in rahlo vezivo s številnimi limfociti. Črevesne resice povečajo površino ozkega črevesa za 10-krat. (56, 57, 58, 63, 64) Zgradbo črevesne resice prikazuje Slika 3(B).



Slika 3: (A) Prečni prerez stene ozkega črevesa. (B) Zgradba črevesne resice. (59)

Med in pod črevesnimi resicami se nahajajo preproste jamicam podobne vdolbinice epitelija, imenovane **Lieberkühnove kripte** (*glandulae intestinales*). Njihova funkcija je izločanje črevesnega soka, ki je bazičen in vsebuje veliko količino sluzi ter številne encime, ki so potrebni za razgradnjo hrane. Kripte vsebujejo črevesne izvorne celice, ki tvorijo različne vrste diferenciranih epitelijskih celic. Lieberkühnove kripte povečajo površino ozkega črevesa za 10-krat. Črevesne resice prekriva več tisoč **mikroresic** ali mikrovilusov. Mikroresice so dolge 1 µm in imajo premer 0,1 µm ter dajejo pod mikroskopom krtačast videz (brush border). Prekrite so z glikokaliksom, v katerem so prisotni poglavitni sluznični prebavni encimi – disaharidaze, aminopeptidaze, lipaze ter alkalna fosfataza. Ti encimi dokončno hidrolizirajo določene sestavine hrane v komponente, primerne za absorpcijo. Mikroresice povečajo površino ozkega črevesa za 20-krat. (56, 57, 58, 64)

Steno ozkega črevesa sestavlja širje sloji, kot prikazuje Slika 3(A):

- **Mukoza** (*tunica mucosa*) ali **sluznica** ozkega črevesa je sestavljena iz treh slojev: epiteljske plasti (*epithelium*), ki jo tvorijo enoskladne visokoprizmatske celice, lamine proprije (*lamina propria mucosae*), ki jo tvori rahlo vezivno tkivo in tanke mišične plasti (*lamina muscularis mucosae*), ki jo tvori notranja plast krožnih in zunanjih vzdolžnih gladkih mišičnih celic. Limfatično tkivo v lamini propriji je pomemben del sistema GALT (gut-associated lymphatic tissue), ki deluje kot strjena imunološka bariera in preprečuje vdor patogenih mikroorganizmov.

- **Submukoza** (*tela submucosa*) ali **podsluznica** je sestavljena iz rahlega vezivnega tkiva. V podsluznici se nahajajo kronične vnetne celice in limfatični folikli, ki se v ileumu združujejo v Peyerjeve plošče. V podsluznici duodenuma so prisotne Brunnerjeve žleze. To so mukozne žleze, ki izločajo viskozno tekočino (pH 8,1-9,3) z nevtralnimi in alkalnimi glikoproteini ter bikarbonatnimi ioni, ki ščitijo proksimalni del ozkega črevesa, tako da nevtralizirajo kislo vsebino, ki pride iz želodca.
- **Mišična plast** (*tunica muscularis*) je sestavljena iz notranje krožne in zunanje vzdolžne plasti gladkih mišičnih celic. Kontrakcije mišic omogočajo mešanje črevesne vsebine s prebavnimi sokovi in peristaltiko.
- **Peritonej ali seroza** (*tunica serosa*) je zunanjega plast črevesa. Tvorita jo enoskladni ploščati epitelij in vezivno tkivo. (56, 57, 58, 64, 65)

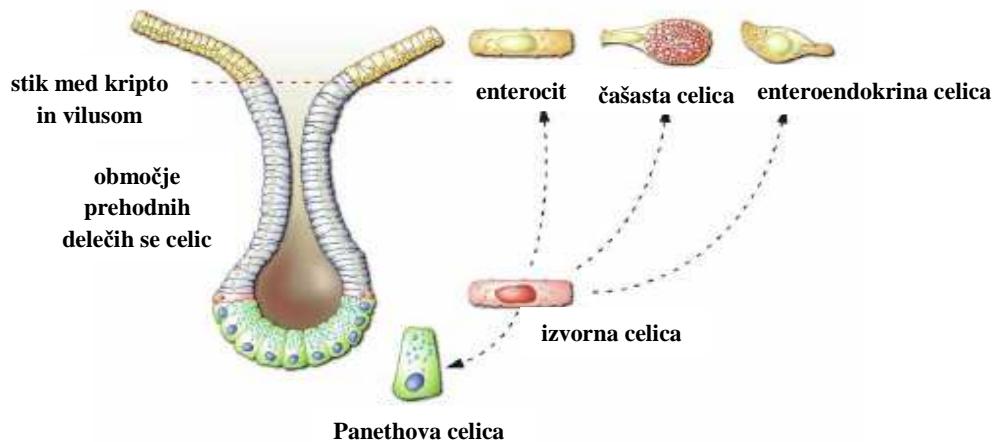
1.4.2 Epitelij ozkega črevesa

Odrasla podgana ima v epiteliju ozkega črevesa okrog 2 milijona Lieberkühnovih kript in 120 tisoč črevesnih resic (66), ki jih sestavljajo epitelijске celice različnih vrst. Vzdolž resic in v površinskem delu kript so nameščeni enterociti, čaštaste in enteroendokrine celice, v bazальнem delu kript pa so prisotne tudi izvorne in Panethove celice. (55, 56, 58) Črevesni epitelij se nenehno obnavlja in tako se pri človeku v tednu dni, pri podgani pa v 3 do 5 dneh popolnoma obnovi in zamenja. Dnevno se zaradi poškodbe ali normalne fiziološke obnove odlušči in izloči blizu 1,7 milijarde epitelijskih celic, ki se nadomestijo z novimi. (42, 56, 67) Vse epitelijске celice sluznice ozkega črevesa nastanejo iz istih izvornih celic, ki ležijo v varnem, bazальнem delu Lieberkühnovih kript, kar je prikazano na Sliki 4. (56, 58, 67, 68)

Izvorne celice in obnavljanje črevesnega epitelija

Vsaka Lieberkühnova kripta ozkega črevesa podgane vsebuje okrog 250 celic, med njimi tudi funkcionalne izvorne celice. Natančno identifikacijo izvornih celic ter njihovega položaja ovira pomanjkanje specifičnih molekulskih kazalcev in genskih označevalcev. Predvidevajo, da naj bi se izvorne celice nahajale na mestu +4 relativno nad dnom kripte, prva tri mesta pa naj bi zasedale dokončno diferencirane Panethove celice. (68, 69, 70, 71) Izvorne celice so relativno nediferencirane celice, ki imajo veliko sposobnost proliferacije. (58, 63, 68, 69, 72) Predvidevajo, da se izvorne celice delijo enkrat na 24 ur. Pri tem nastaneta dve podvrsti hčerinskih celic. Prva hčerinska celica postane hitro deleča se celica, medtem ko druga ostane nespremenjena in nadomesti starševsko izvorno celico

(*asimetrična delitev celic*). Hitro deleče se hčerinske celice, imenovane tudi prehodne deleče se celice (TA, transit-amplifying cell) se delijo vsakih 12-16 ur in vsak dan proizvedejo okrog 300 novih celic na kripto. Podvržene so omejenemu številu delitev, po katerem se dokončno diferencirajo v eno od petih glavnih vrst epitelijskih celic ozkega črevesa. (45, 63, 68, 69)



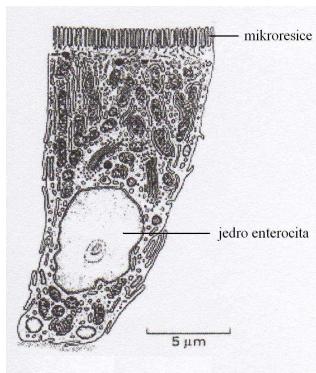
Slika 4: Razvoj različnih tipov diferenciranih epitelijskih celic iz izvorne celice. (68)

Procesi proliferacije, celične migracije, diferenciacije ter apoptoze morajo biti strogo regulirani, sicer lahko pride do resnih črevesnih obolenj. Pri zagotavljanju homeostaze črevesnega epitelija sodelujejo številni hormoni, rastni faktorji in citokini, interakcije med celicami ter interakcije celic z zunajceličnim matriksom. (45, 73) Zelo pomembno vlogo pri obnavljanju črevesnega epitelija ima tudi Wnt signalna pot. (67, 74)

Epitelijske celice ozkega črevesa

Enterociti predstavljajo približno 95 % vseh celic v črevesni resici. (56, 57) Imajo značilno stebričasto obliko z bazalno ležečim jedrom in dva funkcionalno različna predela celične membrane – apikalni in bazolateralni. Na apikalni membrani so številne mikroresice, membranske črpalke, prenašalci ter ionski in vodni kanalčki, ki omogočajo transport hrani, ionov in vode v notranjost enterocita. Na bazolateralni membrani so receptorji za rastne faktorje, imunoglobuline, hormone, peptide in nevrotransmisorje, ter ionske črpalke in prenašalci, ki sodelujejo v prenosu spojin iz enterocita v kri ali limfo. Apikalni in bazolateralni del celice ločujejo tesni stiki, ki igrajo pomembno vlogo pri paracelularni poti absorpcije in pri vzdrževanju črevesne bariere. (56, 57, 58) Dva glavna tipa transmembranskih beljakovin, ki tvorijo celične stike, sta okludin in klavdin. Pomembno vlogo pri delovanju tesnih stikov ima tudi protein zonulin, ki reverzibilno

uravnava prepustnost tesnih stikov in ščiti prebavni trakt pred kolonizacijo mikroorganizmov. Neprimerno reguliran zonulin ima ključno vlogo pri povečani črevesni prepustnosti in tudi v patogenezi nekaterih avtoimunskih bolezni (npr. celiakija, SB tipa 1). (28, 29, 75) Glavna funkcija enterocitov je končna prebava manjših peptidov in disaharidov ter prenos snovi iz lumna črevesa v krvne ali limfne žile. (57, 64) Enterociti imajo tudi sekretorno funkcijo. Sodelujejo pri izločanju velikih količin vode in elektrolitov ter tvorijo prebavne encime. (58) Diferencirani vilusni enterocit prikazuje Slika 5. Življenska doba enterocitov je kratka in traja 5-6 dni. (56, 57, 63)



Slika 5: Diferencirani vilusni enterocit. (65)

Čašaste celice so enocelične mukozne žleze z značilno čašasto obliko in številnimi mucinogenimi granulami. Njihovo število narašča od dvanajstnika preko jejunuma do terminalnega dela ileuma, kjer predstavljajo 12 % vseh epitelijskih celic. (72) Čašaste celice izločajo mukus, viskozno tekočino, sestavljeno iz visoko glikoziliranih proteinov, mucinov. Plast mukusa na površini črevesne sluznice predstavlja zaščitno bariero in preprečuje encimsko razgradnjo stene črevesa. Zaradi lubrikatnega delovanja, ščiti sluznico tudi pred mehanskimi poškodbami in olajša potovanje hrane vzdolž prebavnega trakta. Življenska doba čašastih celic traja 5-6 dni. (56, 57, 58, 63, 64)

Enteroenkrine celice (DNES) se najpogosteje nahajajo na dnu črevesnih kript in predstavljajo 0,5-1 % epitelijskih celic ozkega črevesa. Izločajo številne parakrine in endokrine peptidne hormone ter bioaktivne amine (somatostatin, serotonin, sekretin, holecistokinin, histamin, motilin...), ki sodelujejo pri doseganju črevesnega ravnotesja. Ne izločajo se konstantno, temveč kot odgovor na specifične sprožilne dejavnike in se prenehajo izločati, ko ti stimulusi niso več prisotni. (56, 57, 58, 63, 64) Življenska doba enteroenkrinih celic je okrog 4 dni. (72)

Panethove celice so eksokrine celice, ki ležijo v skupku približno 30 celic v najglobljem delu Lieberkühnovih kript in predstavljajo okrog 5 % epitelijskih celic. So piramidne

oblike in imajo značilne acidofilne granule. V lumen kripte izločajo številne protimikrobnne snovi, kot so lizocim, α -defenzin, sekretorna fosfolipaza A2, ksantinska oksidaza ter TNF- α , zaradi česar igrajo pomembno vlogo pri vzdrževanju gastrointestinalne bariere, v obrambi izvornih celic v kriptah in v naravni obrambi črevesa pred patogenimi mikrobi. (56, 57, 58, 63, 64, 67) Panethove celice tudi fagocitirajo nekatere bakterije ter praživali in imajo verjetno vlogo pri regulaciji črevesne flore. (63, 64, 76) Življenska doba Panethovih celic je približno 3 tedne. (57, 77)

Celice M prekrivajo limfatične Peyerjeve plošče in prenašajo antigene iz lumna ozkega črevesa do makrofagov. Na apikalni strani imajo mikroresicam podobne gube, ki iz lumna črevesa zajemajo makromolekule in mikroorganizme v endocitotske vezikle. Vezikle transportirajo do bazolateralne membrane, kjer pridejo antigeni v stik s celicami imunskega sistema in stimulirajo njihov odziv. (56, 57, 58, 64)

1.5 DISAHARIDAZE OZKEGA ČREVESA

Črevesne disaharidaze so encimi, ki spadajo v skupino hidrolaz, natančneje v skupino glikozidaz (EC 3.2.1), ki hidrolizirajo O- in S- glikozidne vezi in so odgovorni za končno hidrolizo disaharidov v ozkem črevesu. (78, 79) 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). (80)

Glavni nosilci aktivnosti črevesnih disaharidaz so diferencirani vilusni enterociti. Disaharidaze se nahajajo na resasti površini enterocitov, vgrajene v celično membrano in imajo svoje aktivno mesto izpostavljeni v lumen črevesa. (78, 81) So veliki glikoproteini, sestavljeni iz približno 80 % proteinov in 20 % ogljikovih hidratov. Aktivnosti disaharidaz se vzdolž ozkega črevesa spreminja. Največjo specifično aktivnost imajo v zgornjem delu jejunuma, v duodenu je njihova aktivnost nižja, v ileumu pa najnižja, kar je lahko posledica razlik v pH vrednosti v posameznem odseku ozkega črevesa. Na katalitično aktivnost disaharidaz vplivajo tudi cirkadijalni (dnevni) ritmi, ki so kontrolirani endogeno z nevro-endokrinimi komponentami s sedežem v hipotalamu in sinhronizirani z ritmom hranjenja. (43, 80, 82) Ozko črevo podgane ima *in vivo* jasno izražen cirkadijalni ritem encimskih aktivnosti. Eksperimenti na tkivni kulturi podganjega črevesa pa so pokazali, da cirkadijalnega ritma v aktivnosti disaharidaz *in vitro* ne moremo dokazati. Ritem aktivnosti

je sicer deloma kazal na lastnosti ultradialnega ritma, znotraj katerega so se ponekod pojavljala 4-urna nihanja v disaharidazni aktivnosti. Zaznan je bil tudi začetni porast encimske aktivnosti, ki bi se lahko pojasnil z odsotnostjo pankreasne proteaze *in vitro*. (43, 44, 46, 80)

- **Saharaza**

Biokemijsko ime saharaze je saharoza- α -glukozidaza (EC 3.2.1.48). Cepi α -1- β -2 glikozidno vez v disaharidu saharazi na molekulo glukoze in fruktoze. Reakcija poteka v kislem okolju pri pH 6. Saharaza se nahaja v membrani enterocitov v obliki encimskega kompleksa saharaza-izomaltaza (EC 3.2.1.48 in EC 3.2.1.10). (79, 83)

- **Maltaza**

Maltaza katalizira dokončno razgradnjo škroba in glikogena. Njeno biokemijsko ime je α -1,4-glukozidaza (EC 3.2.1.20). Maltaza cepi α -1,4-glikozidno vez v disaharidu maltozi, pri čemer nastaneta dve molekuli α -D-glukoze. Reakcija poteka v kislem okolju pri pH 6. Maltaza se nahaja v membrani enterocitov v obliki dveh encimskih kompleksov – saharaza-izomaltaza (EC 3.2.1.48 in EC 3.2.1.10) in maltaza-glukoamilaza (EC 3.2.1.20 in EC 3.2.1.3). Encimski aktivnosti saharaze-izomaltaze in maltaze-glukoamilaze se pri razgradnji ogljikovih hidratov dopolnjujeta. (78, 79, 81, 84)

1.5.1 Znižanje aktivnosti disaharidaz in njihova vloga pri celiakiji

Znižanje aktivnosti črevesnih disaharidaz je lahko primarno ali sekundarno. **Primarno znižanje** je posledica nekaterih redkih prirojenih bolezni, kjer gre za podedovano napako v genetskem zapisu za določeno disaharidazo ali za zmanjšano sintezo encima (alaktazija, saharozna-izomaltozna intoleranca, trehalozna intoleranca...). Posledice se kažejo kot znižanje ali popolna odsotnost encimske aktivnosti, integriteta črevesne sluznice pa je ohranjena in nespremenjena. **Sekundarno znižanje** aktivnosti disaharidaz je posledica nekaterih sistemskih bolezni in bolezni prebavnega trakta (toksični vplivi zdravil, bakterijske okužbe, virusne infekcije (rotavirusi), celiakija, KVČB...). Pri teh obolenjih se pojavijo različne stopnje atrofije črevesne sluznice, poruši se njena integriteta in funkcija, kar posledično vodi do znižanja aktivnosti disaharidaz in drugih encimov. (80, 81) Zmanjšane aktivnosti črevesnih disaharidaz spremljajo tudi kronične vnetne bolezni črevesa. Pri bolnikih, ki imajo aktivno obliko celiakije, se zaradi povečanega propada epitelijskih celic pojavi značilen upad aktivnosti vseh črevesnih disaharidaz, ki je ireverzibilno povezan s stopnjo okvare črevesne sluznice. Najbolj občutljiv pokazatelj

poškodbe sluznice je laktaza, katere aktivnost se signifikantno zmanjša že pri blagi histološki leziji, medtem ko sta saharaza in maltaza še normalno aktivni. Atrofija črevesne sluznice in večje histološke lezije pa privedejo do znižanja aktivnosti tudi drugih disaharidov. Encimske aktivnosti se lahko ponovno približajo normalnim vrednostim ob uvedbi brezglutenske prehrane. V tem primeru se začne obnova in okrevanje sluznice ozkega črevesa, ki poteka 9 do 19 mesecev. Pri težjih oblikah celiakije pa je lahko okrevanje tudi po dveh do štirih letih še vedno nepopolno. Vzporedno z okrevanjem črevesne sluznice narastejo aktivnosti saharaze in maltaze, medtem ko lahko ostane aktivnost laktaze znižana še nekaj let (posebej pri starejših bolnikih). Merjenje aktivnosti črevesnih disaharidov, predvsem saharaze in maltaze, lahko služi kot kvantitativni pokazatelj stopnje okvare črevesne sluznice in izboljšanja stanja sluznice po uvedbi brezglutenske prehrane. (82, 85)

1.6 TKIVNA TRANSGLUTAMINAZA

Tkvna transglutaminaza (TG2) je od kalcija odvisen encim, ki spada v družino transglutaminaz (EC 2.3.2.13). Družino sestavlja devet izoencimov, ki se nahajajo v številnih tkivih in telesnih tekočinah v različnih predelih telesa, kjer opravljajo pomembne biokemijske funkcije. Transglutaminaze spadajo v skupino transferaz, natančneje v skupino aciltransferaz (EC 2.3.2) in sodelujejo pri prenosu acilne skupine. (14, 79, 86) TG2 katalizira kovalentno križno povezavo med glutaminskim ostankom enega proteina in lisinskim ostankom drugega proteina, lahko pa lizin nadomesti tudi kakšen drug primarni amin (poliamini, histamin...). Pri tem nastane izopeptidna vez znotraj proteina ali med proteinimi. V primeru pomanjkanja ustrezneg amina, pa substrat reagira z vodo in poteče deamidacija glutamina do glutaminske kisline. Reakcija deamidacije je favorizirana v rahlo kislem okolju. (13, 14, 87)

TG2 se nahaja v citoplazmi in jedru celice, lahko pa se nahaja tudi zunaj celice in celo na celični površini. Znotrajcelična TG2 ima pomembno vlogo v procesih celične proliferacije in diferenciacije ter pri apoptozi celic. V zadnjih stopnjah apoptoze pride v celici pod vplivom TG2 do polimerizacije znotrajceličnih proteinov. S tem se stabilizira struktura umirajoče celice preden pride do fagocitoze in se prepreči sproščanje znotrajceličnih komponent, ki bi lahko sprožile vnetne in avtoimunske procese. V medceličnini je TG2 vpletena v regeneracijo poškodovanega tkiva in angiogenezo ter regulacijo celične adhezije. Sodeluje tudi pri povezovanju integrinov in fibronektina, kar omogoča formacijo

in stabilizacijo zunajceličnega matriksa ter vzdrževanje tkivne integritete. V ozkem črevesu zdravih ljudi se TG2 nahaja predvsem v podsluznici, zelo majhne količine encima pa najdemo tudi v epiteliju črevesne sluznice. V večini celic se izražanje TG2 inducira šele ob prisotnosti ustreznih signalov. (14, 86, 87, 88)

1.6.1 Vloga tkivne transglutaminaze pri celiakiji

TG2 ima zelo pomembno vlogo tako v patogenezi, kot tudi pri diagnostiki celiakije. (15, 87, 89) V ozkem črevesu je normalno neaktivna, pri bolnikih s celiakijo pa se njena aktivnost poveča. Določeni peptidi glutena naj bi sprožili prirojen imunski odziv, ki v tkivu inducira blago vnetje in posledično se iz poškodovanega tkiva začne sproščati aktivna TG2. (14, 15) Pri bolnikih s celiakijo se spremeni tudi lokacija encima v tkivu. Več TG2 se pojavi v črevesnem epiteliju, zlasti v vilusnih enterocitih ter v medcelični lamine proprije. (14, 86, 87, 88) Peptidi glutena so zaradi visoke vsebnosti glutaminskih ostankov dober substrat za TG2, ki je odgovorna za deamidacijo glutamina do negativno nabite glutaminske kisline. Deamidirani peptidi imajo tako večjo afiniteto za vezavo na HLA-DQ2 ali HLA-DQ8 molekule antigen-predstavitvenih celic, ki jih predstavijo CD4+ limfocitom T v lamini propriji, kar privede do humoralnega in celičnega imunskega odgovora. (15, 16, 23, 87, 89) V nedavnih študijah so ugotovili, da je za vezavo glutenskih peptidov na TG2 ključnega pomena predvsem razdalja med glutaminom in prolinom. Zelo dober substrat za TG2 predstavljajo peptidi, ki vsebujejo aminokislinsko zaporedje QxP (Q je glutamin, P je prolin, x pa poljubna aminokislina), ne pa tudi zaporedji QP ali QxxP. (87) Nativnih oblik glutenskih peptidov črevesni limfociti običajno ne prepozna, po deamidaciji s TG2 pa postanejo zelo dober antigen za limfocite T. (14, 89) Še vedno ostaja vprašanje, kje deamidacija peptidov sploh poteka in kakšna je vloga enterocitov v patofiziologiji celiakije. Zelo verjetno je, da TG2 pride v stik s peptidi glutena ravno na površini ali v notranjosti enterocitov. (87) TG2 pa se lahko tudi sama križno poveže s peptidi glutena in pri tem tvori večje komplekse, ki so imunogeni ter lahko sprožijo imunski odziv. (13, 14, 15)

Na področju etiopatogeneze celiakije je še vedno veliko nejasnosti, predvsem zaradi težavnosti razvoja ustreznega študijskega modela *in vitro*. Rešitev odprtih vprašanj je pomembna tudi zaradi iskanja novih terapevtskih možnosti, ki bi lahko nadomestile brezglutensko dieto, ki je za bolnika s celiakijo doživljenjska.

2 NAMEN DELA

Celiakija je zelo kompleksna kronična bolezen, pri razvoju katere je poleg genetskih in imunoloških dejavnikov ključnega pomena beljakovina žitaric, gluten. V zadnjih letih raziskujejo predvsem kateri fragmenti in aminokislinska zaporedja glutenskih peptidov so imunogena oziroma delujejo toksično na epitelijske celice bolnikov. *In vitro* metoda izvedena na humanih bioptih odvzetih z endoskopijo, ki bi omogočala vzdrževanje epitelijskih celic črevesa v kulturi skozi daljše časovno obdobje, bi bila zelo pomembna za proučevanje dejavnikov tveganja, vpliva glutenskih peptidov in poteka celiakije ter drugih vnetnih črevesnih bolezni. Zaradi etičnih vidikov, pa je pred poskusi na humanih enterocitih, metode potrebno preveriti in optimizirati na ustreznih živalskih modelih.

Odločili smo se, da bomo kot študijski fiziološki model uporabili podgano, ki omogoča izolacijo velikega števila črevesnih epitelijskih celic in je po fizioloških lastnostih prebavne cevi najbolj podobna človeku. Na primarni kulturi podganjih enterocitov bomo preko spremljanja aktivnosti maltaze, saharaze in tkivne transglutaminaze ter števila celic, celične živosti in deleža vilusnih enterocitov proučevali vpliv gliadinskega peptida p₃₁₋₄₃, za katerega je dokazano, da ima pri bolnikih s celiakijo toksični vpliv.

Eksperimentalno delo bo potekalo v naslednjih korakih:

- odmrznitev predhodno izoliranih epitelijskih celic ozkega črevesa podgane,
- kultiviranje podganjih črevesnih epitelijskih celic s toksičnim gliadinskim peptidom po predhodno razviti metodi,
- mikroskopsko spremljanje celokupnega števila celic s pomočjo Neubauerjeve števne komore, celične živosti s tripanskim modrilom in deleža vilusnih enterocitov glede na njihovo specifično obliko in resasti obrobek,
- priprava celičnega lizata, merjenje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi, merjenje aktivnosti maltaze in saharaze po Dahlqvistovi metodi in merjenje aktivnosti tkivne transglutaminaze.

Na osnovi rezultatov bomo ocenili, ali ima proučevan gliadinski peptid toksičen učinek tudi na "zdrave" podganje enterocite. Izsledki so pomembni za proučevanje vpliva gliadinskega peptida na "zdrave" humane črevesne epitelijske celice in črevesne epitelijske celice bolnikov s celiakijo, kar bo prispevalo tudi k razvoju novih terapevstkih pristopov za zdravljenje bolezni.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Biološki material

- 3 odrasle podgane Wistar moškega spola, stare 12 tednov, s povprečno težo 274,4 g

Podgane so bile hranjene s standardno prehrano za podgane (Altromin, Nemčija) in so imele vodo »*ad libitum*«. Izpostavljene so bile 12 urnemu ciklu svetloba/tema (svetloba med 7:00 in 19:00) pri temperaturi 22-23°C in $55 \pm 10\%$ vlažnosti. Pred usmrtnitvijo so bile 24 ur brez trde hrane, na voljo pa so imele vodo. Usmrčene so bile v stanju fiziološkega mirovanja med 10:30 in 11:40 dopoldan z inhalacijo CO₂. Evtanazija poskusnih živali za izvajanje znanstveno-raziskovalnega dela na tkivu predhodno usmrčenih poskusnih živali je bila odobrena s strani Veterinarske uprave RS dne 03. 02. 2009, pod številko 34401-72/2008/4.

3.1.2 Materiali in kemikalije ter priprava delovnih reagentov

- kompletiran RPMI 1640 medij
- fiziološka raztopina
- NaOH 1M (J.T. Baker, Nizozemska)
- HCl 1M (Merck, Nemčija)
- maltoza (Sigma, Nemčija)
- saharoza (Sigma, Nemčija)
- maleinska kislina (Sigma, Nemčija)
- Tris-baza (Fluka Biochemica, Švica)
- standardna raztopina glukoze (Glucose GOD/PAP, Velika Britanija)
- glukoza-oksidazni reagent (Glucose GOD/PAP, Velika Britanija)
- fosfatni pufer (50 mmol/L, pH 7,0)
- MOPS pufer (50 mmol/L, pH 7,0)
- fenol (11 mmol/L)
- 4-aminofenazon (0,77 mmol/L)
- glukoza-oksidaza ($\geq 1,5$ kU/L)
- peroksidaza ($\geq 1,5$ kU/L)
- destilirana voda

- EDTA 0,5M (Sigma, ZDA)
- Transglutaminase Assay Kit (Sigma, ZDA)
 - reakcijski pufer
 - mikrotitrski ploščici prekriti s kadaverinom – 96 vdolbinic
 - DTT (1 mol/L)
 - transglutaminaza (1 U/vialo)
 - 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) tekoči substrat
 - raztopina za prekinitve reakcije
 - streptavidin – peroksidaza iz *Streptomyces avidinii*
- PBS-T = fosfatni pufer z 0,005 % TWEEN 20 (Sigma, ZDA)

Priprava 100 mL kompletiranega RPMI 1640 medija

- 88 mL RPMI 1640 s HEPES-om (Sigma R5886, München, Nemčija)
- 10 mL FBS (Sigma F4135, ZDA)
- 1 mL 200 mM raztopine L-glutamina (Sigma G7513, München, Nemčija)
- 2 mL raztopine antibiotik/antimikotik, ki vsebuje 10000 U/mL penicilina, 10 mg/mL streptomicina in 25 µg/mL amfotericina B (Sigma A5955, München, Nemčija)
- 100 µL 50 nM raztopine 2-merkaptoetanola v FBS (Sigma M7522, München, Nemčija)
- 100 mg glukoze (Zorka-Šabac, Zagreb, Hrvaška)

Pripravljen kompletiran RPMI medij je potrebno hraniti v hladilniku.

Priprava fiziološke raztopine (0,9 % NaCl)

- 9 g NaCl raztopimo v 1 L destilirane vode.

Pred uporabo je pripravljeno fiziološko raztopino potrebno avtoklavirati.

3.1.3 Laboratorijski pribor

- steklovina: čaše 100 mL, meritne bučke 100 mL in 250 mL, meritne pipete 10 mL in 50 mL (CELSTAR, Nemčija)
- injekcijske brizge 10 mL (BD DiscarditTM II LS, Španija)
- igle za brizge (FINE-JECT, Nemčija)
- centrifugirke 15 mL (TPP, Švica) in 50 mL (CELLSTAR, Nemčija)
- mikrotitrski ploščice z 12 ali 96 vdolbinicami (TPP, Švica)
- polnilna pipeta (Midi Plus; BIOHIT, Finska)

- plastični nastavki za polnilno pipeto 5 mL, 10 mL (TPP, Švica) in 50 mL (CELLSTAR, Nemčija)
- multikanalna pipeta za 8 nastavkov: 10-100 µL (Eppendorf Research pro, Nemčija)
- avtomatske pipete: 0,5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL (Eppendorf, BIOHIT, Finska)
- plastični nastavki za avtomatske pipete (SARSTEDT, Nemčija)
- krioampule 2 mL (TPP, Švica)
- plastične epruvete z zamaškom (0,5 mL, 1,5 mL in 2,0 mL, SARSTEDT, Nemčija)
- stojala za epruvete in centrifugirke
- Neubauerjeva števna komorica (BRAND, Nemčija)
- papirnate brisačke, staničevina in parafilm
- laboratorijska halja
- rokavice za enkratno uporabo
- 70% etanol v pršilki
- škarje
- štoparica
- plinski gorilnik

3.1.4 Aparature

- laminarij (Variolab Waldner, Nemčija)
- inkubator (Kendro, Type BB 6060 O₂, Nemčija)
- inverzni svetlobni mikroskop (Olympus CKX41, Japonska)
- mikroskopski sistem cell R (Olympus IX81, Japonska)
- digitalni fotoaparat (Olympus C-7070, Japonska)
- mikrotitrski čitalec Sunrise (Tecan, Grödig, Avstrija)
- mikrotitrski čitalec Safire² (Tecan, Grödig, Avstrija)
- centrifuga (Tehtnica, Slovenija)
- stresalnik Environmental Shaker – Incubator ES-20 (Biosan, Latvija)
- vibracijsko mešalo Bio Vortex V1 (Biosan, Latvija)
- Dewarjeva posoda s tekočim dušikom
- aparat za pripravo ultračiste vode (PURELAB classic UF, ELGA)
- pH meter (Seven Easy METTLER TOLEDO, Kitajska)
- analitska tehtnica (Acculab-Atilon, ZDA)

3.2 METODE

3.2.1 Živalski model

Kot študijski živalski model za izvedbo eksperimentalnega dela smo uporabili 3 odrasle podgane. Neposredno po usmrтitvi je bila podganam odvzeta sluz, ozko črevo in široko črevo. Ta del eksperimenta je opravilo usposobljeno osebje v Medicinskom eksperimentalnem centru (MEC) Inštituta za patologijo MF UL. Nadaljnje delo je potekalo v celičnem laboratoriju Katedre za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani, kjer je bila opravljena izolacija heterogenih celic iz epitelija ozkega in širokega črevesa podgan, izolacija enterocitov iz sluzi ozkega črevesa ter priprava heterogenih primarnih kultur. Glede na zaporedje izolacij so bile pridobljene suspenzije epitelijskih celic označene po vrstnem redu in sicer kultura 1 za prvo podgano, kultura 2 za drugo in kultura 3 za tretjo podgano. Primarne kulture sluzi, ozkega in širokega črevesa so bile nato zamrznjene v tekočem dušiku. Postopek izolacije in zamrznitve podganjih epitelijskih celic v tekočem dušiku je izvedla predhodna raziskovalna skupina. (90)

3.2.2 Postopek odmrzovanja podganjih epitelijskih celic

- 1) Krioampule z epitelijskimi celicami ozkega črevesa podgan smo vzeli iz tekočega dušika in v vsako dodali 1,0 mL svežega kompletiranega RPMI medija (37°C).
- 2) Ob rahlem stresanju smo krioampule inkubirali na 37°C, da se je njihova vsebina stalila.
- 3) Ko so bile celične kulture odtaljene, smo jih s pipeto iz krioampul hitro (zaradi prisotnosti citotoksičnega DMSO) prenesli v centrifugirke. Krioampule smo sprali še z 1,0 mL svežega kompletiranega RPMI medija (37°C), da smo kvantitativno prenesli celično kulturo in v centrifugirko dodali še 8,0 mL svežega kompletiranega RPMI medija (37°C), da smo razredčili DMSO.
- 4) Centrifugirke smo centrifugirali 10 min pri 1200 vrtljajih/min.
- 5) Odlili in zavrgli smo supernatant. Sedimentu celic pa smo dodali 2,0 mL svežega kompletiranega RPMI medija (37°C), ga resuspendirali in homogeno suspenzijo prenesli na mikrotitrsko ploščico ter dodali primeren volumen svežega kompletiranega RPMI medija (10 mL).

3.2.3 Kultiviranje podganjih epitelijskih celic

Izolirane epitelijske celice podganjega ozkega črevesa smo kultivirali po metodi, ki so jo razvili v predhodnih poizkusih. (48, 49) Pokrovček mikrotitrsko plošče, na kateri smo imeli heterogene primarne suspenzijske kulture podganjih epitelijskih celic, smo razkužili nad plamenom, samo ploščo pa obrisali z etanolom in jo pokrito postavili v plinski inkubator. Kultiviranje je potekalo pri temperaturi $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$, v atmosferi z visoko vlažnostjo in 5-10 % vsebnostjo CO₂. Celične kulture smo en dan pustili v inkubatorju, da so se adaptirale ter jih nato pogledali pod svetlobnim mikroskopom. Ugotovili smo, da so celice pregoste (10^7 celic/mL) in da jih je še veliko združenih v skupke. Dodali smo nekaj svežega kompletiranega RPMI medija, da smo celice razredčili in suspenzije celic prenesli na nova gojišča. Celične kulture smo ponovno postavili v inkubator za 24 ur, da so se nerazgrajeni delci tkiva posedli na dno ter so se celice sprostile iz tkiva. Pri pipetiranju smo se delcem tkiva nato izognili in bolj čiste suspenzije celic še enkrat prenesli na nova gojišča. Celice smo pogledali pod mikroskopom in ugotovili, da smo dosegli ustrezno gostoto celic (10^6 celic/mL) in da je ostankov tkiva manj.

Preglednica 2: Shema kultiviranja podganjih epitelijskih celic na mikrotitrskih ploščicah.

| Kultura 1 | Kultura 2 | Kultura 3 |
|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| Brez peptida 0h, 24h, 48h, 72h, 96h | Brez peptida 0h, 24h, 48h, 72h, 96h | Brez peptida 0h, 24h, 48h, 72h, 96h |
| Kultura 1 | Kultura 2 | Kultura 3 |
| P 200 0h, 24h, 48h, 72h, 96h | P 200 0h, 24h, 48h, 72h, 96h | P 200 0h, 24h, 48h, 72h, 96h |
| Kultura 1 | Kultura 2 | Kultura 3 |
| P 300 0h, 24h, 48h, 72h, 96h | P 300 0h, 24h, 48h, 72h, 96h | P 300 0h, 24h, 48h, 72h, 96h |

Vsako osnovno celično kulturo (12 mL) smo razdelili na tri enake dele po 4 mL. Dodali smo sintetični gliadinski peptid p₃₁₋₄₃ v dveh različnih koncentracijah 200 µg/mL in 300 µg/mL (kulture smo označili kot **P 200** in **P 300**), del vsake kulture (4 mL) pa smo kultivirali brez peptida (oznaka **Brez**). Ta čas smo označili kot čas nič. Celične kulture smo nato spremljali tokom 96 urnega kultiviranja. Iz vsake kulture smo odvzeli po en vzorec ob času 0h, 24h, 48h, 72h in 96h, tako da je bilo odvzetih skupno 45 vzorcev. Preglednica 2 prikazuje shemo kultiviranja na mikrotitrskih ploščicah.

Sintetični gliadinski peptid **p₃₁₋₄₃ (H – LGQQQPFPQQPY – OH · HCl)** sestavlja trinajst aminokislin, oznaka ₃₁₋₄₃ pa označuje mesto tega peptida v gliadinu.

Kot medij za kultiviranje podganjih črevesnih epitelijskih celic smo uporabili kompletiran RPMI 1640. Svež medij je intenzivno rdeče barve, po spremembi pH (pH medija pade) pa se medij razbarva in postane čebulno rdeč oziroma rumenkast. Sprememba barve kaže na iztrošenost medija ali na možnost okužbe celične kulture, zato je kulturi potrebno dodati nekaj svežega medija ali zamenjati medij po postopku menjave medija (pasaža). (90)

Izolirani podganji enterociti imajo največji reproduksijski potencial v prvih 3-4 dneh. Za njihovo uspešno rast je ključnega pomena gostota celic v kulturi, ki ne sme biti prevelika (ne več kot 10^6 celic/mL), prav tako pa ne premajhna (ne manj kot 10^5 celic/mL). V primeru prevelikega števila celic lahko dodamo nekaj svežega medija ali pa vsebino mikrotitrsko plošče razdelimo na dva dela in nato k vsakemu dodamo svež medij. Če je gostota celic premajhna, je potrebno celice kultivirati v manjšem volumnu medija. To naredimo tako, da kulturo centrifugiramo, medij odlijemo, usedlino celic pa resuspendiramo v ustrezno manjšem volumnu medija in kulturo nasadimo na mikrotitrsko ploščo z manjšimi vdolbinicami.

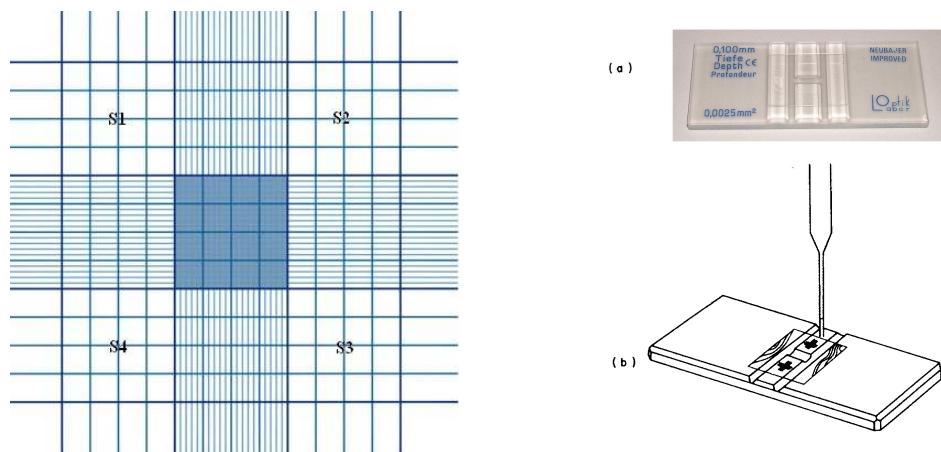
3.2.4 Spremljanje števila celic, deleža enterocitov in celične živosti s tripanskim modrilmom

S pomočjo tripanskega modrila in mikroskopa smo določali delež vilusnih enterocitov in celično živost ter šteli celice v celičnih kulturah, z in brez gliadinskega peptida. Navedene parametre smo določili takoj po dodatku gliadinskega peptida (čas 0) in jih nato spremljali tokom celotnega kultiviranja, na vsakih 24 ur (po 24, 48, 72 in 96 urah). Izvedli pa smo tudi slikanje celic v celičnih kulturah.

Metoda s tripanskim modrilmom temelji na dejstvu, da je pri živi celici integriteta membrane ohranjena, zaradi česar je preprečen vstop barvila v notranjost celice in celica se ne obarva, ampak ostane svetla in pri vrtenju mikro vijaka na mikroskopu rahlo zasveti. Pri mrtvi celici se integriteta membrane poruši, zato barvilo lahko prodre v notranjost celice in celica se obarva modro. Tripansko modrilo je toksično, zato mu celice ne smejo biti predolgo izpostavljene (največ 3-5 minut), saj v tem primeru pride do uničenja živih celic, kar povzroči prevzem barvila tudi v te celice. (91) Pri štetju celic in oceni celične živosti s tripanskim modrilmom smo uporabili Neubauerjevo števno komorico. To je steklena ploščica z dvema števnima ploščadma, ki imata natančno vgravirano mrežico s standardizirano velikostjo kvadratkov. Takšna mrežica je sestavljena iz devetih večjih

kvadratov, velikosti 1 mm x 1 mm. Neubauerjevo števno komorico in mrežico Neubauerjeve komorice prikazuje Slika 6.

Za vsakodnevno pregledovanje celic smo uporabili invertni svetlobni mikroskop (Olympus CKX41). Ta tip mikroskopa omogoča direktno opazovanje celic v posodi, v kateri rastejo, saj so objektivi nameščeni pod mizico in zato višina posode ne ovira izostrovanja slike. Preparat je osvetljen od zgoraj. Uporabljen invertni mikroskop je hkrati tudi faznokontrastni mikroskop, saj omogoča opazovanje celičnih struktur, ne da bi bilo celice potrebno barvati. Struktura, ki je optično gostejša, je na sliki videti temnejša. (37) Slikanje celic smo izvedli na kompleksnejšem mikroskopskem sistemu Cell R (Olympus IX81), ki je računalniško voden mikroskop z digitalizacijo slike.



Slika 6: Mrežica Neubauerjeve komorice in Neubauerjeva števna komorica.

Postopek dela:

- 1) Celično kulturo smo pred odvzemom iz vdolbinice na mikrotitrski ploščici temeljito premešali s pipetiranjem, da smo pripravili čim bolj homogeno suspenzijo celic.
- 2) V plastično epruveto z zamaškom ($V=0,5$ mL) smo prenesli $20 \mu\text{L}$ tripanskega modrila in $20 \mu\text{L}$ celične kulture. Če ocenimo, da je gostota celic za štetje prevelika (več kot nekaj deset celic na polje Neubauerjeve števne komorice), je kulturo potrebno redčiti s kompletiranim RPMI medijem za določen faktor razredčitve.
- 3) Suspenzijo celic in barvila smo temeljito homogenizirali s pipeto.
- 4) V enega izmed števnih prostorov Neubauerjeve komorice smo s pipeto nanesli $10 \mu\text{L}$ pripravljene obarvane suspenzije celic, tako da smo nastavek pipete prislonili na rob krovnega stekelca, ki smo ga fiksirali z drugo roko in počasi iztisnili vsebino iz

nastavka, kot prikazuje Slika 6. V dolbinica se sama napolni zaradi delovanja kapilarnih sil, ki potegnejo suspenzijo v števni prostor.

- 5) V komorici smo šteli celice pod 200 x povečavo v štirih stanskih poljih (S1, S2, S3, S4) mrežice, od katerih ima vsak površino 1 mm^2 . Čim hitreje smo ločeno prešteli vse mrtve in žive celice ter diferencirane vilusne enterocite.
- 6) Iz spodnjih enačb smo izračunali celokupno število celic/mL kulture, odstotek živih celic in delež vilusnih enterocitov.

Enačba 1: Izračun celokupnega števila celic/mL kulture.

$$\text{število celic/mL} = \bar{n} \times f \times 10^4$$

$$\bar{n} = (n_1 + n_2 + n_3 + n_4)/4$$

(\bar{n} = povprečno število preštetih celic v polju površine 1 mm^2 , n_1, n_2, n_3, n_4 = število celic v posameznem stranskem polju Neubauerjeve števne komorice, f = faktor redčenja osnovne celične kulture (v našem primeru je faktor redčenja 1, ker celične kulture nismo redčili), 10^4 = faktor potreben za preračunavanje števila celic na 1 mL (velikost enega stranskega polja je $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ in debelina sloja med mrežico ter krovnim stekelcem je natanko 0,1 mm, torej je volumen v enem polju 10^{-4} mL))

Enačba 2: Izračun celične živosti (odstotek živih celic).

$$\text{celična živost (\%)} = \left(\frac{\text{povprecno število živih celic na polje}}{\text{povprecno število vseh celic na polje}} \right) \times 100$$

Enačba 3: Izračun deleža vilusnih enterocitov.

$$\text{delež vilusnih enterocitov (\%)} = \left(\frac{\text{povprecno število vilusnih enterocitov na polje}}{\text{povprecno število vseh celic na polje}} \right) \times 100$$

3.2.5 Priprava celičnega lizata

Vsa merjenja, kjer smo kot vzorec potrebovali lizat celic (določanje koncentracije proteinov ter aktivnosti maltaze, saharaze in tkivne transglutaminaze), smo izvedli hkrati po končanem kultiviranju podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa. Celične lizate smo pripravljali vsak dan sproti iz vzorcev, odvzetih iz kultur podganjih epitelijskih celic, ki smo jih kultivirali brez gliadinskega peptida in kultur podganjih epitelijskih celic, ki smo jim dodali gliadinski peptid, ob času 0 (tako po dodatku gliadinskega peptida) in nato vsakih 24 ur (po 24, 48, 72 in 96 urah). Do izvedbe meritev smo celične lizate hranili v zamrzovalniku pri -20°C .

Postopek dela:

- 1) Celično kulturo smo pred odvzemom iz vdolbinice na mikrotitrski plošči homogenizirali s pipetiranjem in nato del kulture ($750 \mu\text{L}$) prenesli v centrifugirko ter centrifugirali 10 min pri 1200 vrtljajih/min.
- 2) Supernatant smo odpipetirali ter spravili za nadaljnje analize v medij sproščenih snovi.
- 3) K sedimentu smo dodali 10 mL fiziološke raztopine in ga resuspendirali.
- 4) Centrifugirke smo centrifugirali 10 min pri 1200 vrtljajih/min.
- 5) Supernatant smo odlili in ga zavrgli, k sedimentu pa smo ponovno dodali 10 mL fiziološke raztopine in ga resuspendirali.
- 6) Centrifugirke smo ponovno centrifugirali 10 min pri 1200 vrtljajih/min.
- 7) Dobili smo bister, brezbarven supernatant, ki smo ga odlili ter zavrgli, preostanek fiziološke raztopine nad sedimentom pa smo previdno odstranili s pipetiranjem.
- 8) Sediment smo resuspendirali v $750 \mu\text{L}$ destilirane vode.
- 9) Homogeno suspenzijo celic smo iz centrifugirke prenesli v plastično epruveto z zamaškom ($V=1,5 \text{ mL}$) in jo ustrezno označili.
- 10) Epruveto smo za 30 minut zamrznili na -20°C . Nato smo jo 5 minut odtajali na 37°C in ponovno zamrznili na -20°C . Tako je bil lizat pripravljen in do uporabe smo ga hranili v zamrzovalniku, zmrznenega na -20°C .
- 11) Pred uporabo smo celične lizate odtajali ter jih tik pred vsakim pipetiranjem in nanašanjem na mikrotitrsko ploščo temeljito homogenizirali z mešanjem na vibracijskem mešalu.

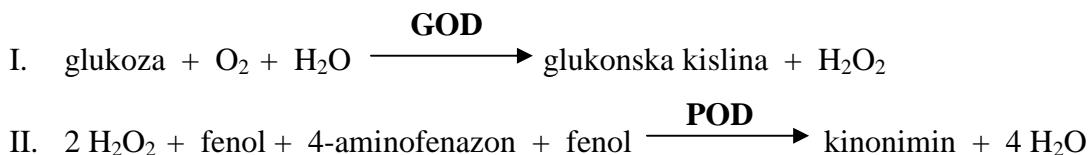
3.2.6 Merjenje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi

Aktivnosti encimov smo izrazili na g proteinov, zato je bilo potrebno določiti tudi koncentracijo proteinov v celičnih kulturah. Koncentracije proteinov smo merili v celičnih lizatih z Bradfordovo metodo, ki je uporabna za določevanje koncentracij proteinov v vzorcu od 100 do 1500 $\mu\text{g/mL}$, z Micro izvedbo pa lahko določamo tudi koncentracije od 1 do 25 $\mu\text{g/mL}$. Metoda temelji na principu vezave barvila Coomassie Brilliant Blue G-250 v kislem na bazične in aromatske aminokisline proteinov (arginin, lizin in histidin). Posledica te vezave je sprememba barve reagenta iz rdeče (protonirana oblika) v modro oz. zeleno (neprotonirana, anionska oblika), odvisno od koncentracije proteinov, s tem pa se premakne valovna dolžina absorpcijskega maksimuma barvila iz 465 nm na 595 nm. Intenzivnost obarvanosti raztopine po nastanku kompleksa barvilo-protein oziroma

absorbanca, ki jo izmerimo pri 595 nm, je sorazmerna koncentraciji proteinov v vzorcu. Za merjenje koncentracije proteinov smo uporabili Total Protein Kit, Micro (Sigma TP0100, Nemčija). (90, 92).

3.2.7 Merjenje aktivnosti maltaze in saharaze po Dahlqvistovi metodi

Specifično aktivnost maltaze in saharaze v celičnem lizatu smo določali z metodo po Dahlqvistu, ki temelji na hitrosti nastajanja produkta – glukoze iz dodanega substrata. (93) Celičnemu lizatu smo tako dodali specifičen substrat (maltozo oziroma saharozo), ki ga je encim (maltaza oziroma saharaza) začel pretvarjati v glukozo. Po določenem času smo delovanje encima na substrat ustavili in določili količino nastalega produkta. Prekinitve reakcije smo dosegli z dodatkom Tris-HCl pufra, ki ga je vseboval TGO reagent (Tris Glukoza-Oksidazni reagent). Količino sproščene glukoze smo določili z glukoza-oksidazno metodo, ki je potekla v dveh stopnjah. V prvi stopnji (reakcija I) smo glukozo s pomočjo encima glukoza-oksidaza (GOD) oksidirali v glukonsko kislino in vodikov peroksid. V drugi stopnji (reakcija II) smo pretvorili vodikov peroksid s pomočjo ustreznih reagentov in encima peroksidaze (POD) v obarvan produkt (kinonimin).



Obarvan produkt (kinonimin) smo določili spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 505 nm.

Postopek dela:

- 1) Pripravili smo maleatni pufer, tako da smo 1,16 g maleinske kisline raztopili v 15,3 mL 1M NaOH, redčili z destilirano vodo do 100 mL in uravnali pH na 6,0.
- 2) 20,16 mg maltoze smo raztopili v 1 mL maleatnega pufra in dobili raztopino maltoze s koncentracijo 0,0056 mol/L. 19,15 mg saharoze smo raztopili v 1 mL maleatnega pufra in dobili raztopino saharoze s koncentracijo 0,0056 mol/L.
- 3) Na prozorno mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinicami smo nanesli po 50 µL vzorca (celičnega lizata kultur) v 5 paralelkah.
- 4) Za vzorčno slepo vrednost smo v eno paralelko vzorca dodali 10 µL destilirane vode.
- 5) Za reagenčno slepo vrednost smo nanesli 60 µL destilirane vode v treh paralelkah.
- 6) V vdolbinico za standard smo nanesli 10 µL destilirane vode v treh paralelkah.

- 7) Mikrotitrsko ploščico smo nato za 10 min postavili v inkubator na 37°C, da je potekla ekvilibracija. Medtem smo pripravili standardno raztopino glukoze s koncentracijo 0,1 mg/mL, tako da smo 1 volumski del glukoznega standarda s koncentracijo 1 mg/mL, ki je bil prisoten v setu, redčili z 9 volumskimi deli destilirane vode.
- 8) V vdolbinico za standard smo v treh paralelkah dodali 50 µL standardne raztopine glukoze s koncentracijo 0,1 mg/mL.
- 9) V dve paralelki vzorca smo dodali 10 µL raztopine maltoze, v drugi dve paralelki vzorca pa 10 µL raztopine saharoze.
- 10) Vsebino vdolbinic na mikrotitrski plošči smo previdno premešali in mikrotitrsko ploščo inkubirali 60 minut pri 37°C.
- 11) Pripravili smo Tris-HCl pufer s koncentracijo 0,5 mol/L, tako da smo 15,25 g Tris-baze raztopili v 110 mL 1M HCl, z destilirano vodo redčili do 250 mL ter uravnali pH na 7,0. 2 volumska dela Tris-HCl pufra smo nato zmešali z 1 volumskim delom glukozaoksidaznega reagenta (že pripravljen v glukoznem setu) in dobili TGO reagent.
- 12) V vsako vdolbinico smo dodali 100 µL TGO reagenta ter premešali, tako da smo s prsti rahlo potolkli po ploščici.
- 13) Pripravljeno mikrotitrsko ploščo smo inkubirali 60 minut pri 37°C.
- 14) Z mikrotitrskim čitalcem smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 505 nm.

Postopek dela in nanašanja na mikrotitrsko ploščo prikazuje Preglednica 3.

Preglednica 3: Postopek dela za merjenje specifične aktivnosti maltaze in saharaze v celičnem lizatu.

| | Reagenčna slepa | | | Standard | | | Vzorčna slepa | | Vzorec (za maltazo) | | Vzorec (za saharazo) | |
|----------------------------------------------------------------------------|--------------------|-----|-----|----------|-----|-----|------------------|--|------------------------|-----|-------------------------|-----|
| Mesto na mikrotitrski plošči | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | | 8 | 9 | 10 | 11 |
| H ₂ O (µL) | 60 | 60 | 60 | 10 | 10 | 10 | 10 | | - | - | - | - |
| Vzorec (µL) | - | - | - | - | - | - | 50 | | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Ekvilibracija 10 minut pri 37°C. | | | | | | | | | | | | |
| Glukozni standard (µL) | - | - | - | 50 | 50 | 50 | - | | - | - | - | - |
| Substrat (µL) (maltoza ali saharaza) | - | - | - | - | - | - | - | | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Previdno premešamo in inkubiramo točno 60 minut pri 37°C. | | | | | | | | | | | | |
| TGO reagent (µL) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Premešamo in inkubiramo 60 minut pri 37°C. Izmerimo absorbanco pri 505 nm. | | | | | | | | | | | | |

Specifično aktivnost maltaze in saharaze v celičnih lizatih smo izračunali po spodaj navedeni formuli.

Enačba 4: Izračun specifične aktivnosti maltaze ozziroma saharaze.

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

(A_{vz} = absorbanca vzorca, $A_{vz,sl}$ = absorbanca vzorčne slepe, A_{st} = absorbanca standarda, A_{sl} = absorbanca reagenčne slepe, d = redčitev homogenata (=1), t = čas prve inkubacije v minutah (=60), p = koncentracija proteinov v homogenatu (g/L), M = molekulska masa glukoze (=180), g = št. molekul glukoze, ki nastanejo pri hidrolizi substrata (pri maltazi 2, pri saharazi 1), 10^5 = faktor pretvorbe mg v g proteinov, mmol v μmol in razredčitev standarda)

3.2.8 Merjenje aktivnosti tkivne transglutaminaze

Za merjenje specifične aktivnosti tkivne transglutaminaze (TG2) v celičnih lizatih smo uporabili Transglutaminase Assay Kit (Sigma CS1070, ZDA). Merjenje specifične aktivnosti je temeljilo na katalitični aktivnosti TG2 pri tvorbi kovalentne vezi med prosto aminsko skupino kadaverina in γ -karboksamidno skupino biotina. Kadaverin je bil kovalentno vezan na površino mikrotitrsko ploščice, ki je bila priložena setu, biotin-TVQQEL-OH substrat pa se nahajal v reakcijskem pufru. Pri reakciji je prišlo do vezave biotina na kadaverin na površini mikrotitrsko ploščice. Nevezani biotin smo odstranili tako, da smo vdolbinice na ploščici sprali z ultračisto vodo. Količino vezanega biotina, ki je proporcionalna količini aktivne TG2 v celičnem lizatu, pa smo določili v naslednjem koraku z uporabo konjugata streptavidin – peroksidaza in TMB substrata. Streptavidin ima veliko afiniteto do biotina in se je nanj vezal z zelo močno nekovalentno vezjo. Nevezani konjugat streptavidin – peroksidaza smo odstranili tako, da smo vdolbinice na mikrotitrski ploščici sprali s fosfatnim pufrom (PBS-T). Količino vezanega streptavidina pa smo določili z dodatkom TMB, ki je substrat za peroksidazo. Med reakcijo je encim peroksidaza deloval na TMB substrat in ga pretvoril v modroobarvan produkt (oksidiran TMB). Po nekaj minutah smo razvoj barve prekinili tako, da smo dodali raztopino za prekinitev reakcije in vsebina vdolbinic na mikrotitrski plošči je postala rumene barve. Z mikrotitrskim čitalcem smo izmerili absorbanco pri 450 nm. Izmerjena absorbanca je proporcionalna količini vezanega biotina in s tem tudi količini aktivne TG2 v celičnem lizatu. (94)

Postopek dela in nanašanja na mikrotitrsko ploščo prikazuje Preglednica 4.

Postopek dela:

- 1) Ploščico s kadaverinom smo vzeli iz zamrzovalnika in pustili, da se je segrela na sobno temperaturo.
- 2) Pripravili smo osnovno raztopino transglutaminaze. Pomešali smo 5 µL 1M DTT, 1 µL 0,5M EDTA in 494 µL ultračiste vode ter v 0,5 mL pripravljene raztopine raztopili vsebino ene viale transglutaminaze.
- 3) 1 µL osnovne raztopine transglutaminaze smo nato raztopili v 1 mL ultračiste vode ter dobili raztopino za pozitivno kontrolo, v kateri je bila končna koncentracija encima 2 mU/mL.
- 4) Pripravili smo reakcijsko mešanico. Za en vzorec je potrebno zmešati 10 µL reakcijskega pufra, 1 µL 1M DTT in 40 µL ultračiste vode, tako da smo si glede na število vzorcev preračunali kolikšen volumen reakcijske mešanice potrebujemo.
- 5) Na ploščico smo nanesli 50 µL vzorca (celičnega lizata kultur) v dveh paralelkah.
- 6) Za reagenčno slepo vrednost smo nanesli 50 µL ultračiste vode v treh paralelkah.
- 7) V vdolbinico za pozitivno kontrolo smo nanesli 50 µL raztopine za pozitivno kontrolo v treh paralelkah.
- 8) V vsako vdolbinico smo dodali 50 µL reakcijske mešanice ter vsebino vdolbinic premešali, tako da smo s prsti rahlo potolkli po ploščici.
- 9) Ploščico smo inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi.
- 10) Med inkubacijo smo si pripravili konjugat streptavidin – peroksidaza. Vsebino ene viale streptavidin – peroksidaze smo raztopili v 100 µL ultračiste vode in dobili osnovno raztopino streptavidin – peroksidaze, ki smo jo nato pomešali s PBS-T pufrom. Za en vzorec je potrebno pomešati 0,1 µL osnovne raztopine streptavidin – peroksidaze in 100 µL PBS-T pufra, tako da smo si glede na število vzorcev preračunali kolikšen volumen konjugata streptavidin – peroksidaza potrebujemo.
- 11) Po končani inkubaciji smo vse vdolbinice 3x sprali z ultračisto vodo.
- 12) V vsako vdolbinico smo dodali 100 µL konjugata streptavidin – peroksidaza (korak 10) in mikrotitrsko ploščico inkubirali 20 minut pri sobni temperaturi.
- 13) Vse vdolbinice smo 3x sprali z 200 µL PBS-T pufra.
- 14) V vsako vdolbinico smo nato dodali 200 µL TMB tekočega substrata in ploščico inkubirali 3 minute pri sobni temperaturi.
- 15) Razvoj barve smo prekinili tako, da smo v vsako vdolbinico dodali 100 µL raztopine za prekinitev reakcije (Stop Solution).

16) Z mikrotitrskim čitalcem smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 450 nm.

Preglednica 4: Postopek dela za merjenje specifične aktivnosti tkivne transglutaminaze v celičnem lizatu.

| | Reagenčna slepa | | | Pozitivna kontrola | | | Vzorec | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----|-----|--------------------|-----|-----|--------|-----|
| Mesto na mikrotitrski plošči | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| H ₂ O (µL) | 50 | 50 | 50 | - | - | - | - | - |
| Raztopina za pozitivno kontrolo (µL) | - | - | - | 50 | 50 | 50 | - | - |
| Vzorec (µL) | - | - | - | - | - | - | 50 | 50 |
| Reakcijska mešanica (µL) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Inkubiramo 15 - 30 minut pri sobni temperaturi in nato speremo vse vdolbinice 3x z ultračisto vodo. | | | | | | | | |
| Konjugat streptavidin - peroksidaza (µL) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Inkubiramo 20 minut pri sobni temperaturi in nato speremo vse vdolbinice z 200 µL PBS-T pufra (največ 3x). | | | | | | | | |
| TBM tekoči substrat (µL) | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 |
| Inkubiramo 1 - 3 minute pri sobni temperaturi. | | | | | | | | |
| Raztopina za prekinitev reakcije (µL) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Izmerimo absorbanco pri 450 nm. | | | | | | | | |

Specifično aktivnost tkivne transglutaminaze v celičnih lizatih smo izračunali po spodaj navedeni formuli.

Enačba 5: Izračun specifične aktivnosti tkivne transglutaminaze.

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

(A_{vz} = absorbanca vzorca, A_{sl} = absorbanca reagenčne slepe, A_{pk} = absorbanca pozitivne kontrole, c_{pk} = aktivnost transglutaminaze v raztopini pozitivne kontrole (= 2 mU/mL), c_p = koncentracija proteinov v vzorcu (g/L))

Aktivnosti maltaze, saharaze in tkivne transglutaminaze smo izrazili kot specifične aktivnosti IU/g proteinov, kjer je IU katalitična aktivnost encima, ki v 1 minutu razgradi 1 µmol substrata pri standardnih pogojih (37°C, pH 6,0 in pri 0,1 M koncentraciji substrata).

* IU je mednarodna enota (International Unit).

3.2.9 Statistične metode za analizo rezultatov

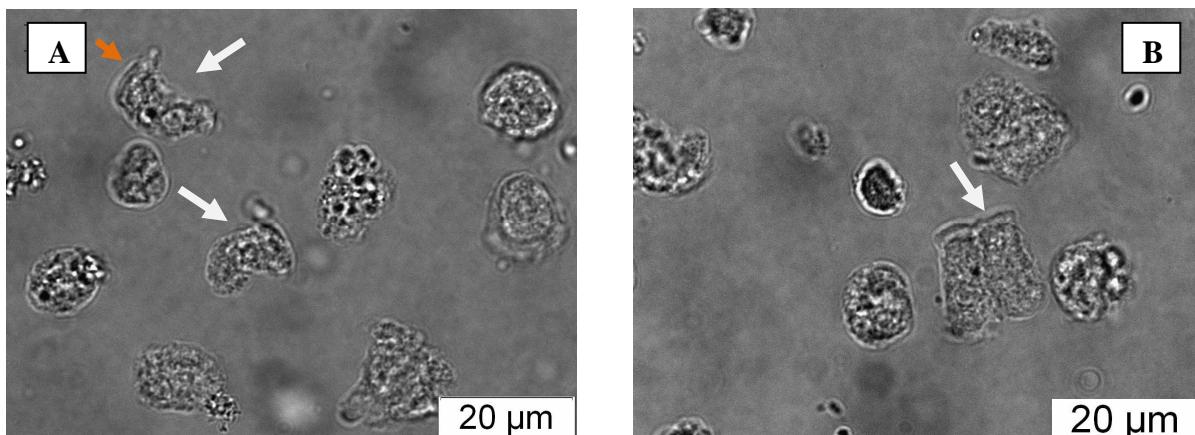
Za obdelavo rezultatov smo uporabili statistične funkcije programa SPSS (enofaktorska anova) ter statistične funkcije programa Microsoft Office Excel 2007 (dvostranski parni t-test). Pri obeh testih smo upoštevali 5 % tveganje.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Naš cilj je bil proučiti vpliv toksičnega peptida glutena p_{31-43} na epitelijske celice ozkega črevesa podgan *in vitro*. Pomembno je, da se pri pripravi primarnih suspenzijskih kultur črevesnih epitelijskih celic čim bolj približamo dejanskim fiziološkim pogojem. (39) Za kultiviranje podganjih epitelijskih celic smo uporabili metodo, ki je bila v preteklih študijah že preizkušena na miših in je primerna za kultiviranje črevesnih epitelijskih celic v ustreznom hranilnem mediju skozi daljše časovno obdobje. (95) Za razširitev poizkusov, ki zahtevajo večji vzorec celic, smo metodo prenesli iz mišijh na podganje črevesne epitelijske celice.

4.1 KULTIVIRANJE PRIMARNIH KULTUR PODGANJIH EPITELIJSKIH CELIC Z GLIADINSKIM PEPTIDOM p_{31-43}

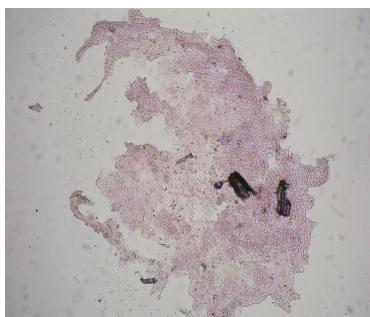
Primarne suspenzijske kulture epitelijskih celic ozkega črevesa podgane že na pogled niso bile povsem bistre. V njih smo opazili svetlo, lebdečo suspenzijo, v kateri so bili najverjetneje prisotni nerazgrajeni koščki vezivnega tkiva. Celice se namreč, kljub večkratnem redčenju, niso povsem sprostile iz tkiva, kar smo opazili tudi pri pregledu kultur pod invertnim svetlobnim mikroskopom.



Slika 7: Kulture črevesnih epitelijskih celic. Na sliki A sta z belo puščico označena diferencirana vilusna enterocita, ki imata značilno stebričasto obliko, apikalni del pa prekrivajo številne mikroresice, ki dajejo pod mikroskopom krtačast videz (oranžna puščica). Na sliki B sta s puščico označena dva združena diferencirana vilusna enterocita. (Mikroskopski sistem cell R, Olympus IX81; 1000 x povečava)

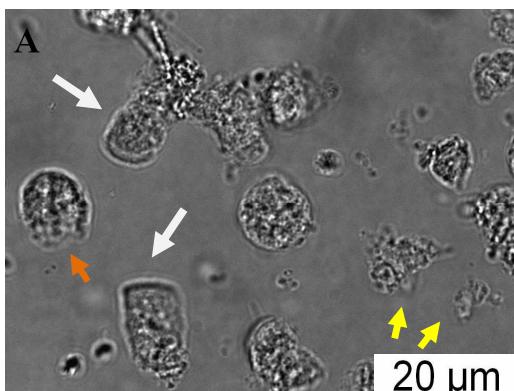
Pri mikroskopiranju celičnih kultur ozkega črevesa podgane smo ugotovili, da je prisotna mešana populacija epitelijskih celic, saj so bile celice heterogene, različnih oblik in velikosti. Po značilni stebričasti obliki in resastem obrobku na apikalni strani celice smo prepoznali diferencirane vilusne enterocite. Vilusni enterociti imajo težnjo po združevanju

in tvorbi enoskladnega epitelija, zato smo v kulturah opazili po dva združena vilusna enterocita - "dvojčka" (Slika 7). Ostalih celic nismo identificirali, opazovali pa smo razlike v velikosti celic. Prisotne so bile najverjetnejše čašaste, enteroendokrine, Panethove in izvorne celice ter prehodne celice vseh štirih končno diferenciranih celičnih linij na različnih stopnjah diferenciacije.



Slika 8: Obarvani "oblački" mukusa na površini kultur (barvanje s PAS metodo), v katere so ujeti delci odmrlih celic. (95) (Inverzni svetlobni mikroskop Olympus CKX41; 400 × povečava)

Tokom kultiviranja smo pod mikroskopom opazili velike temne "oblačke", ki so lebdeli na površini celične kulture. (Slika 8) Iz rezultatov predhodnih raziskav smo sklepali, da je to mukus, ki ga izločajo čašaste celice. (95) S tem smo posredno potrdili njihovo prisotnost v kulturi ter njihovo aktivnost med kultiviranjem. V delčkih mukusa so bili ujeti delčki odmrlih celic, ki zaradi svoje lahkosti splavajo na površino.



Slika 9: Odmiranje epitelijskih celic ozkega črevesa po treh dneh kultiviranja v kulturi brez peptida. Z belo puščico sta označena deformirana vilusna enterocita, ki že imata delno poškodovano integriteto celične membrane, resasta površina na apikalnem delu celice pa je še ohranjena. Tudi celica označena z oranžno puščico je že delno deformirana in je začela izgubljati svojo obliko. Rumena puščica pa prikazuje fragmente razpadlih celic. (Mikroskopski sistem cell R, Olympus IX81; 1000 x povečava)

Po nekaj dneh kultiviranja smo opazili, da so nekateri vilusni enterociti in tudi ostale epitelijske celice v kulturi že začele propadati. Pri enterocitih je prišlo do deformacije značilne stebričaste oblike celice, vendar je bila še vedno opazna resasta površina na apikalnem delu enterocitov, zato smo jih še vedno lahko prepoznali. Prisotni so bili tudi številni fragmenti propadlih epitelijskih celic, celice pa so bile v notranjosti že močno granulirane. (Slika 9) Epitelijske celice črevesa imajo namreč tudi *in vivo* kratko

življenjsko dobo. (72) Pri izolaciji so bile poleg nediferenciranih prekurzorskih celic, ki so bile še v začetni fazi življenjskega cikla, verjetno zajete tudi končno diferencirane celice, ki so bile že tik pred razpadom. Zato smo v kulturah poleg lepo oblikovanih celic, lahko opazili tudi že delno razpadle celice. Znotraj 96 urnega kultiviranja nismo opazili značilnih razlik v morfologiji celic med kulturami s peptidom in kulturami brez peptida. Gliadinski peptid torej ni imel večjega vpliva na morfologijo celic, saj smo propadanje celic opazili tako v kulturah brez dodanega gliadinskega peptida, kot v kulturah z dodanim peptidom. Po 96 urah kultiviranja smo v večini kultur opazili spremembo začetne rdeče obarvanosti medija v motno rumenkasto. Sprememba barve je lahko posledica izčrpanosti medija (pH medija pade), lahko pa jo povzročijo delčki tkiva, ki ostanejo v kulti po izolaciji celic. V delčkih tkiva se začne proces nekroze, ki lahko spremeni pH in s tem barvo medija. Najverjetnejše pa je bil vzrok za spremembo barve medija prisotnost črevesnih bakterij v kulturah, ki se ob premajhni koncentraciji Ab/Am oziroma njegovi izrabi lahko namnožijo ter iztrošijo medij. Do kontaminacije je lahko prišlo tudi v osnovnih kulturah ali že med postopkom izolacije. Tudi pod mikroskopom smo v kulturah opazili številne drobne migetajoče črne "pikice", ki so bile najverjetnejše bakterije. Pri delu s podganjim modelom lahko sicer izoliramo večje število epitelijskih celic, vendar je prisotnih tudi več črevesnih bakterij. V nadaljnjih raziskavah bi zato bilo smiselno uporabiti višjo koncentracijo Ab/Am ali izbrati optimalnejšo kombinacijo Ab/Am, da bi preprečili razrast mikroorganizmov.

4.2 SPREMLJANJE VPLIVA GLIADINSKEGA PEPTIDA p_{31-43} NA ŠTEVILLO CELIC, ŽIVOST CELIC IN DELEŽ VILUSNIH ENTEROCITOV

Število celic/mL kulture, celično živost (delež živih celic) in delež diferenciranih vilusnih enterocitov v kulturah smo določali s pomočjo tripanskega modrila in Neubauerjeve števne komorice pod 200 x povečavo inverznega svetlobnega mikroskopa. Delež enterocitov smo izračunali glede na število vseh celic v posamezni homogeni celični kulturi. Zaradi prisotnosti velike količine drobirja ter majhnih koščkov tkiva, ki jih je bilo težko ločiti od celic, je bilo štetje in opazovanje celic zelo subjektivno.

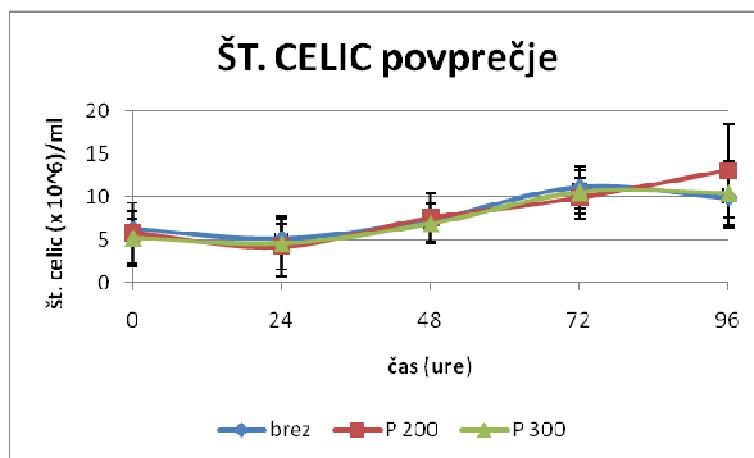
Preglednica 5 in Graf 1 prikazujeta povprečno število vseh celic/mL kulture, posebej za kulture brez dodanega peptida, kulture z dodanim gliadinskim peptidom v koncentraciji

200 µg/mL (P 200) in kulture z dodanim gliadinskim peptidom v koncentraciji 300 µg/mL (P 300) tokom 96 urnega kultiviranja.

Preglednica 5: Povprečje števila celic/mL v treh kulturah brez peptida, v treh kulturah P 200 in v treh kulturah P 300 tokom 96 urnega kultiviranja podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa. * p(T0) predstavlja vrednosti parnega t-testa v času kultiviranja izračunane glede na začetno vrednost ob času 0 ur.

| POVPREČNO ŠTEVILO CELIC/mL ± SD | | | | | | |
|---------------------------------|------------------------------|--------|------------------------------|--------|------------------------------|--------|
| Čas (ure) | Brez peptida | | P 200 | | P 300 | |
| 0 | $6,23 \pm 1,19 \times 10^6$ | p (T0) | $5,77 \pm 3,52 \times 10^6$ | p (T0) | $5,17 \pm 3,19 \times 10^6$ | p (T0) |
| 24 | $5,10 \pm 1,73 \times 10^6$ | 0,0705 | $4,23 \pm 3,44 \times 10^6$ | 0,1709 | $4,50 \pm 2,99 \times 10^6$ | 0,0310 |
| 48 | $7,33 \pm 0,91 \times 10^6$ | 0,1454 | $7,57 \pm 2,83 \times 10^6$ | 0,0591 | $6,83 \pm 2,34 \times 10^6$ | 0,1502 |
| 72 | $11,10 \pm 2,42 \times 10^6$ | 0,0213 | $9,87 \pm 2,37 \times 10^6$ | 0,0547 | $10,53 \pm 2,61 \times 10^6$ | 0,0555 |
| 96 | $9,83 \pm 3,43 \times 10^6$ | 0,3091 | $13,07 \pm 5,42 \times 10^6$ | 0,2133 | $10,63 \pm 3,79 \times 10^6$ | 0,2916 |

Graf 1: Spremljanje povprečnega števila celic/mL kulture tokom 96 urnega kultiviranja v kulturah brez peptida, v kulturah P 200 in v kulturah P 300.



Število celic/mL v vseh celičnih kulturah po prvih 24 urah kultiviranja pada, v kulturah s peptidom P 300 celo statistično značilno ($p=0,0310$). Razlog je verjetno v tem, da se celice še niso povsem prilagodile na nove razmere, dodatek toksičnega peptida v koncentraciji 300 µg/mL pa za epitelijske celice predstavlja še dodatni stresni dejavnik, zato je padec števila celic v teh kulturah še izrazitejši. Po 24 urah kultiviranja število celic v vseh kulturah začne naraščati. V kulturah brez dodanega peptida število celic po 72 urah doseže povprečno najvišjo vrednost tokom kultiviranja ($11,10 \times 10^6$ celic/mL), ki je pri 5%

* Število celic/mL za posamezne kulture podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa med 96 urnim kultiviranjem prikazujeta Preglednica 15 in Graf 14, Priloge, str. 70.

tveganju statistično značilno ($p=0,0213$) višja od števila izoliranih celic. Tudi v kulturah z dodanim peptidom število celic narašča in doseže povprečno najvišjo vrednost tokom kultiviranja po 96 urah ($13,07 \times 10^6$ celic/mL v kulturah P 200 in $10,63 \times 10^6$ celic/mL v kulturah P 300), vendar statistično značilnih razlik glede na začetno število celic pri 5% tveganju nismo dokazali. Razlogov za porast števila celic je lahko več, od vzpostavitev primerenega mikrookolja v kulturi in adaptacije celic do odsotnosti pankreasnih encimov in mehanskega odstranjevanja celic z vrha vilusov, ki poteka *in vivo* ob prehajanju hrane. Možna razlaga je tudi ta, da padec števila diferenciranih celic v prvih 24 urah kultiviranja sproži pospešeno proliferacijo izvornih celic, zaradi česar se število celic poveča. Do podobnih mehanizmov prihaja tudi *in vivo*. V kulturah brez peptida število celic v zadnjih 24 urah kultiviranja nato ponovno upade iz povprečno $11,10 \times 10^6$ celic/mL na povprečno $9,83 \times 10^6$ celic/mL, kar je lahko posledica endogenega biološkega ritma. Povečanje števila celic povzroči upad proliferacijskega potenciala, ki mu sledi zmanjšanje števila celic ob hkratnem ponovnem povečanju proliferacijskega potenciala. Zanimivo je dejstvo, da je število celic v kulturah z dodanim toksičnim peptidom doseglo povprečno najvišjo vrednost med kultiviranjem šele po 96 urah kultiviranja, torej kasneje kot v kulturah brez peptida, kjer se je to zgodilo že po 72 urah. Možno je, da ima gliadinski peptid p₃₁₋₄₃ nek negativen vpliv na epitelijske celice in je vzpostavljanje homeostaze celic zato počasnejše. Posamezne skupine smo tudi primerjali med seboj, vendar statistično značilnih razlik med kulturami z gliadinskim peptidom in kulturami brez peptida nismo dokazali ($p > 0,05$). Med posameznimi kulturami so opazne tudi velike individualne razlike, ki so posledica biološke variabilnosti.

Preglednica 6 in Graf 2 prikazuje povprečno celično živost, posebej za kulture brez dodanega peptida, kulture P 200 in kulture P 300 tokom 96 urnega kultiviranja.* Tokom kultiviranja smo zabeležili postopno upadanje celične živosti v vseh celičnih kulturah. V kulturah brez peptida živost statistično značilno pada ($p=0,0218$) po 96 urah kultiviranja iz povprečno 91,3 % ob začetku kultiviranja na povprečno 75,4 %. V kulturah P 200 živost statistično značilno pada ($p=0,0031$) že po 24 urah kultiviranja iz povprečno 94,0 % na povprečno 85,1 % in nato pada vse do konca kultiviranja, ko je povprečna živost le še 57,4 %. V kulturah P 300 živost statistično značilno pada ($p=0,0311$) prav tako že po prvih 24

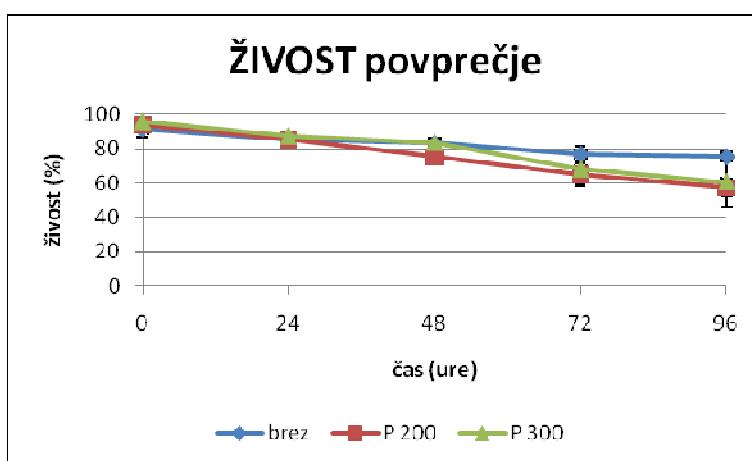
* Živost celic za posamezne kulture podganjih epitelijskih celic oztega črevesa med 96 urnim kultiviranjem prikazujeta Preglednica 16 in Graf 15, Priloge, str. 71.

urah iz povprečno 95,8 % na povprečno 87,2 %. Ob koncu kultiviranja je živost v teh kulturah le še 60,5 %.

Preglednica 6: Povprečje celične živosti v treh kulturah brez peptida, v treh kulturah P 200 in v treh kulturah P 300 tokom 96 urnega kultiviranja podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa. p(T0) predstavlja p-vrednosti parnega t-testa v času kultiviranja izračunane glede na začetno vrednost ob času 0 ur.

| POVPREČNA ŽIVOST (%) ± SD | | | | | | |
|---------------------------|--------------|--------|--------------|--------|---------------|--------|
| Čas (ure) | Brez peptida | P 200 | | P 300 | | |
| 0 | 91,33 ± 4,72 | p (T0) | 94,03 ± 3,82 | p (T0) | 95,83 ± 1,67 | p (T0) |
| 24 | 85,23 ± 2,06 | 0,1392 | 85,10 ± 3,90 | 0,0031 | 87,23 ± 1,47 | 0,0311 |
| 48 | 83,13 ± 0,65 | 0,1098 | 75,20 ± 1,49 | 0,0057 | 83,37 ± 2,61 | 0,0180 |
| 72 | 76,70 ± 4,42 | 0,0540 | 65,00 ± 6,78 | 0,0377 | 67,90 ± 8,64 | 0,0226 |
| 96 | 75,40 ± 2,36 | 0,0218 | 57,43 ± 4,76 | 0,0171 | 60,50 ± 14,82 | 0,0438 |

Graf 2: Spremljanje povprečne celične živosti tokom 96 urnega kultiviranja v kulturah brez peptida, v kulturah P 200 in v kulturah P 300.



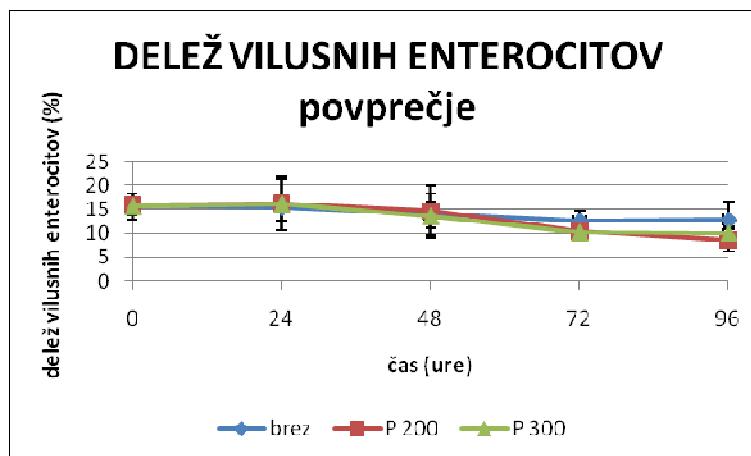
Postopno upadanje celične živosti smo pričakovali, saj so do podobnih opažanj prišli že v predhodnih poizkusih. (96) Propadanje celic je del fiziološkega procesa staranja kulture, s katerim upada tudi potencial za rast in obnavljanje, proti koncu kultiviranja pa je tudi posledica neugodnih razmer v kulturi, zaradi iztrošenosti medija in razrasta bakterij. Ugotovili smo, da je upad celične živosti v kulturah z dodanim gliadinskim peptidom večji v primerjavi s kontrolnimi kulturami. Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da bi peptid p₃₁₋₄₃ lahko imel direkten toksičen vpliv na živost "zdravih" podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa, saj se je živost v kulturah z dodanim peptidom tokom kultiviranja prej statistično značilno zmanjšala v primerjavi s kulturami brez peptida. Pri statistični obdelavi podatkov

smo primerjali tudi posamezne skupine med seboj. Povprečen padec živosti v kulturah P 200 je po 48 urah statistično značilen glede na kulture brez peptida ($p=0,002$) in tudi glede na kulture P 300 ($p=0,001$). Iz teh podatkov bi lahko sklepali, da ima nižja koncentracija peptida celo večji negativni vpliv na živost podganjih epitelijskih celic kot višja koncentracija, vendar tega ne moremo z gotovostjo trditi, saj so opazne zelo velike individualne razlike med posameznimi kulturami. Opazna pa so tudi rahla nihanja v padcu živosti med posameznimi kulturami, kar je posledica biološke variabilnosti med vzorci heterogenih epitelijskih celic. Pri izolaciji smo namreč zajeli celice, ki so v začetni fazi življenskega cikla, kot tudi celice, ki so že tik pred razpadom. Pri vzorčenju smo tako lahko zajeli različne deleže živih oziroma mrtvih epitelijskih celic.

Preglednica 7: *Povprečje deleža diferenciranih vilusnih enterocitov v treh kulturah brez peptida, v treh kulturah P 200 in v treh kulturah P 300 tokom 96 urnega kultiviranja podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa. $p(T0)$ predstavlja p vrednosti parnega t-testa v času kultiviranja izračunane glede na začetno vrednost ob času 0 ur.*

| DELEŽ ENTEROCITOV (%) ± SD | | | | | | |
|----------------------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
| Čas (ure) | Brez peptida | | P 200 | | P 300 | |
| 0 | 16,00 ± 2,23 | p (T0) | 15,87 ± 0,40 | p (T0) | 15,60 ± 2,76 | p (T0) |
| 24 | 15,43 ± 2,70 | 0,7754 | 16,23 ± 5,54 | 0,9247 | 16,13 ± 5,31 | 0,7943 |
| 48 | 13,93 ± 2,62 | 0,3793 | 14,63 ± 5,19 | 0,7391 | 13,63 ± 4,55 | 0,4114 |
| 72 | 12,67 ± 2,04 | 0,1895 | 10,50 ± 1,47 | 0,0377 | 10,33 ± 1,87 | 0,1330 |
| 96 | 12,83 ± 3,69 | 0,0644 | 8,63 ± 2,31 | 0,0399 | 10,07 ± 1,31 | 0,0471 |

Graf 3: Spremljanje povprečnega deleža diferenciranih vilusnih enterocitov tokom 96 urnega kultiviranja v kulturah brez peptida, v kulturah P 200 in v kulturah P 300.



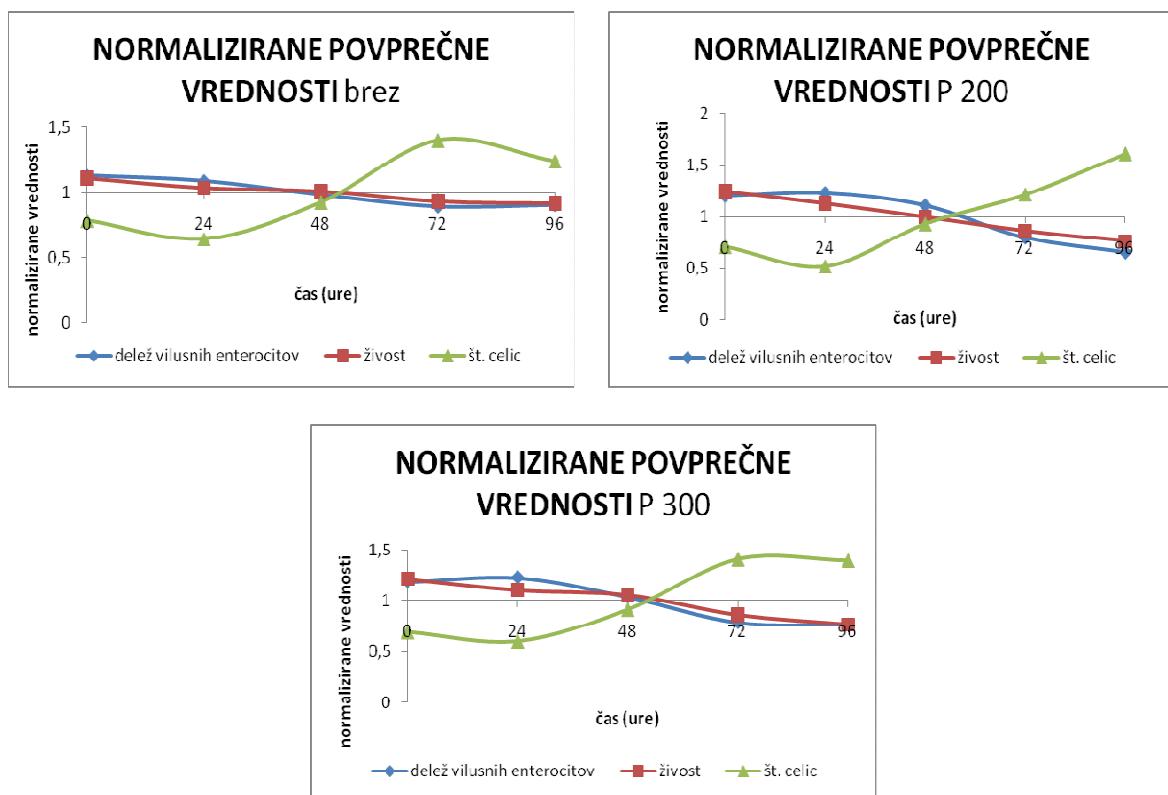
Preglednica 7 in Graf 3 prikazuje povprečni delež diferenciranih vilusnih enterocitov, posebej za kulture brez dodanega peptida, kulture P 200 in kulture P 300 tokom 96 urnega kultiviranja.* Povprečni delež diferenciranih vilusnih enterocitov v vseh celičnih kulturah je ob začetku kultiviranja 15,8 %. Vzrok za nizek odstotek enterocitov je verjetno v postopku izolacije, saj so bile zajete tudi druge črevesne celice: čašaste, enteroendokrine, Panethove ter izvorne celice. Povprečni delež vilusnih enterocitov se v kulturah brez dodanega peptida postopoma zmanjšuje tokom 72 urnega kultiviranja iz povprečno 16,0 % na povprečno 12,7 %, v zadnjih 24 urah pa pride do rahlega dviga na povprečno 12,8 %, ki pa ni statistično značilen ($p > 0,05$). Padec deleža enterocitov je lahko posledica izolacije, pri kateri smo pridobili starostno heterogene populacije celic in propada poškodovanih ter starih enterocitov, ki so bili že pred izolacijo tik pred odmrtjem. Zmanjšanje števila enterocitov spodbudi proliferacijo in diferenciacijo prehodnih celic, ki se v treh dneh preobrazijo v zrele enterocite. Posledično se število enterocitov v zadnjih 24 urah kultiviranja poveča. Spremembe povprečnega deleža enterocitov v kulturah brez peptida tokom kultiviranja niso statistično značilne ($p > 0,05$) in so lahko tudi posledica endogenih bioloških ritmov. V kulturah z gliadinskim peptidom se delež enterocitov po 24 urah kultiviranja poveča glede na začetno vrednost, vendar ne statistično značilno ($p > 0,05$). V kulturah P 200 se delež enterocitov poveča iz povprečno 15,9 % na povprečno 16,2 %, v kulturah P 300 pa iz povprečno 15,6 % na povprečno 16,1 %. Vzrok za povečanje deleža enterocitov je lahko v postopku izolacije, s katerim smo zajeli prehodne celice, ki so bile tik pred preobrazbo v zrele enterocite. Tokom nadaljnega kultiviranja delež vilusnih enterocitov postopoma upada. V kulturah P 200 delež enterocitov že po 72 urah pade statistično značilno ($p=0,0377$) na povprečno 10,5 %, prav tako je padec glede na začetno vrednost statistično značilen ($p=0,0399$) po 96 urah, ko doseže povprečno 8,6 %. V kulturah P 300 delež enterocitov pade statistično značilno ($p=0,0471$) glede na začetno vrednost po 96 urah in doseže povprečno 10,1 %. Upadanje deleža vilusnih enterocitov v kulturah z dodanim peptidom je lahko posledica staranja kultur, zaradi česar pride do slabljenja signala za diferenciacijo in posledično nastaja manj končno diferenciranih celic. V kulturah z dodanim gliadinskim peptidom smo zabeležili statistično značilen padec deleža enterocitov, iz česar lahko sklepamo, da ima peptid p₃₁₋₄₃ nek vpliv na "zdrave" podganje enterocite in pomakne ravnotežje med diferenciacijo in odmiranjem enterocitov v

* Delež diferenciranih vilusnih enterocitov za posamezne kulture podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa med 96 urnim kultiviranjem prikazujeta Preglednica 17 in Graf 16, Priloge, str. 73.

smer povečanega propada. Vendar statistična obdelava podatkov pri 5 % tveganju ni pokazala statistično značilnih razlik med posameznimi skupinami.

Trendi parametrov se tokom kultiviranja pri vseh kulturah gibljejo zelo podobno, zato so povzeti kar na združenem grafu normaliziranih povprečnih vrednosti za vse podgane, posebej za kulture brez dodanega peptida, kulture P 200 in kulture P 300. (Graf 4) Tako je dobro vidno gibanje trendov za vsak parameter posebej in možna primerjava med njimi.

Graf 4: Normalizirane povprečne vrednosti števila celic, živosti celic in deleža vilusnih enterocitov tokom 96 urnega kultiviranja v kulturah brez peptida, v kulturah z dodanim peptidom v koncentraciji 200 µg/mL in v kulturah z dodanim peptidom v koncentraciji 300 µg/mL.



Po začetku kultiviranja se število celic nekoliko zmanjša, kar sovпадa s sočasnim zmanjšanjem celične živosti. V kulturah se verjetno še ni ustvarilo optimalno mikrookolje in celice se še niso povsem prilagodile novim razmeram. Padec je bolj izrazit v kulturah z dodanim peptidom p₃₁₋₄₃, ki verjetno deluje kot dodatni stresni dejavnik, zato je vzpostavljanje ustreznega okolja v kulturah še počasnejše. Padec živosti in števila celic predstavlja signal za spodbudo proliferacije izvornih celic, zato se tokom nadaljnjega kultiviranja število celic poveča, prav tako se v kulturah ustvarijo ugodne razmere zaradi odsotnosti pankreasnih encimov in odstranjevanja celic z vrha vilusov, ki je prisotno *in vivo*. Temu trendu pa ne sledi celična živost, ki še naprej pada. Propadanje celic je del fiziološkega procesa staranja kulture, s katerim upada tudi potencial za rast in obnavljanje,

celice pa postopno izgubljajo svojo funkcionalnost. Povečanje števila vseh celic, tako živih kot mrtvih, torej nakazuje na pospešeno proliferacijo v kulturah, hkratni upad celične živosti pa nakazuje na povečan propad celic, ki je proti koncu kultiviranja lahko tudi posledica neugodnih razmer v kulturi, zaradi iztrošenosti medija in razrasta bakterij. V kulturah brez peptida smo opazili nihanje v deležu diferenciranih enterocitov, ki nakazuje na endogeni ritem ohranjanja števila enterocitov, kjer sta diferenciacija in odmiranje diferenciranih enterocitov uravnovežena. V kulturah z gliadinskim peptidom pa tokom kultiviranja pride do povečanega upada povprečnega deleža enterocitov.

Med delom se je izkazalo, da metoda za oceno živosti s tripanskim modrilom ni najbolj primerna in optimalna. V celičnih kulturah smo imeli namreč heterogeno populacijo celic, ki ima v epiteliju ozkega črevesa različno vlogo in s tem različne lastnosti. Celice imajo verjetno tudi različno propustnost membrane, zaradi česar barvilo vanje vdira različno. Primarna funkcija diferenciranih vilusnih enterocitov je absorpcija, zato bi pričakovali, da imajo membrano bolj propustno od ostalih celic v kulturi in se tako bolj barvajo s tripanskim modrilom. V določenih primerih je bilo težko razlikovati med modro obarvano celico, v katero je barvilo vdrlo in neobarvano celico. Poleg tega je tripansko modrilo toksično, zato mu celice ne smejo biti predolgo izpostavljene (največ 3-5 minut), saj v tem primeru pride do uničenja živih celic, kar povzroči prevzem barvila tudi v te celice in tako lahko sicer žive celice zaznamo kot mrtve. V nadalnjih poskusih bi bilo smiselno izbrati kakšno drugo metodo (avtomatsko štetje celic in določanje živosti), s katero bi lažje razlikovali med živimi in mrtvimi celicami ter tako dobili bolj objektivne rezultate.

4.3 SPREMLJANJE VPLIVA GLIADINSKEGA PEPTIDA p_{31-43} NA AKTIVNOST MALTAZE, SAHARAZE IN TKIVNE TRANSGLUTAMINAZE

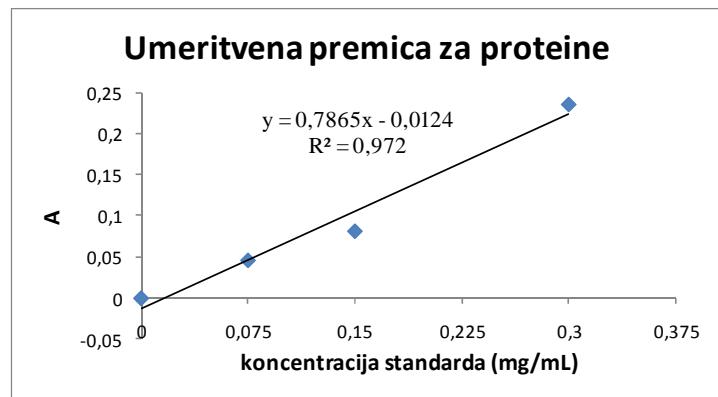
Učinek gliadinskega peptida p_{31-43} na primarne suspenzijske kulture podganjih črevesnih epitelijskih celic smo ugotavljali tudi preko aktivnosti maltaze, saharaze in TG2, ki imajo v patogenezi celiakije pomembno vlogo. Za bolnike s celiakijo je značilna povečana aktivnost TG2 ter upad aktivnosti vseh črevesnih disaharidov. Absolutne (izmerjene) vrednosti encimskih aktivnosti zaradi različnih koncentracij celic v kulturah, uporabljenih za pripravo celičnih lizatov, ne povedo veliko, zato smo za boljšo interpretacijo rezultatov aktivnosti encimov izrazili na g proteinov. Poleg aktivnosti encimov je bilo potrebno

določiti tudi koncentracijo proteinov v celičnih kulturah. Vse meritve so bile opravljene v treh paralelkah. Za pripravo umeritvene premice smo pripravili standardne redčitve raztopine humanega albumina z začetno koncentracijo 0,3 mg/mL (Preglednica 8 in Graf 5).

Preglednica 8: Absorbance standardov humanega albumina

| Koncentracija standarda (mg/mL) | Absorbanca (A) |
|---------------------------------|----------------|
| 0 | 0 |
| 0,075 | 0,2357 |
| 0,15 | 0,0816 |
| 0,3 | 0,0461 |

Graf 5: Umeritvena premica za proteine



Ker ujemanje z umeritveno premico ni bilo najbolj optimalno, smo za izračun koncentracij proteinov uporabili absorbanco standarda humanega albumina s koncentracijo 0,075 mg/mL. Koncentracije proteinov smo izračunali na osnovi absorbanc posameznih celičnih lizatov iz enačbe $c = (0,075 \cdot A) / 0,0461$.

4.3.1 Spremljanje specifične aktivnosti maltaze

Koncentracije proteinov in aktivnosti maltaze, izražene na g proteinov v posameznih kulturah v času 96 urnega kultiviranja prikazujeta Preglednica 9 in Graf 6. Aktivnost maltaze ima v posameznih celičnih kulturah različne razpone vrednosti in zaradi boljše preglednosti so v Preglednici 10 prikazane povprečne aktivnosti maltaze v kulturah podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa, posebej za kulture brez dodanega peptida, kulture P 200 in kulture P 300 tokom 96 urnega kultiviranja. Izračunali smo tudi normalizirane povprečne aktivnosti maltaze, ki odražajo relativen odnos posameznih meritev do povprečja.

Na grafu normaliziranih povprečnih vrednosti (Graf 7) vidimo, da se v prvih 24 urah kultiviranja povprečna aktivnost maltaze v vseh kulturah nekoliko poveča. V kulturah brez peptida se aktivnost maltaze poveča iz povprečno 28,10 IU/g proteinov na povprečno 30,63 IU/g proteinov, v kulturah P 200 iz povprečno 25,97 IU/g proteinov na povprečno 35,58 IU/g proteinov, v kulturah P 300 pa iz povprečno 37,33 IU/g proteinov na povprečno 38,08 IU/g proteinov. Dvig povprečne aktivnosti maltaze je najbolj izrazit v kulturah P

200, vendar ni statistično značilen ($p > 0,05$). Vzrok za prehodno povišanje aktivnosti maltaze je lahko v odsotnosti pankreasne proteaze in njenega delovanja na membranske encime resaste površine enterocitov *in vitro*. (53, 54) Dvig maltazne aktivnosti je prav tako lahko posledica endogenih bioloških ritmov, ki jih disaharidaze izkazujejo tudi po izolaciji enterocitov in gojenju v kulturah. Dodatek toksičnega peptida pa verjetno predstavlja dodatni stresni dejavnik, ki preko propadanja encima spodbudi maltazno aktivnost ali povzroči spremenjeno razmerje epitelijskih celic (večji vpliv na druge epitelijske celice kot na enterocite). Možno je, da peptid vpliva tudi na indukcijo in povečano sintezo encima, vendar le kratkotrajno in z nadaljevanjem toksičnega učinka ta mehanizem odpove.

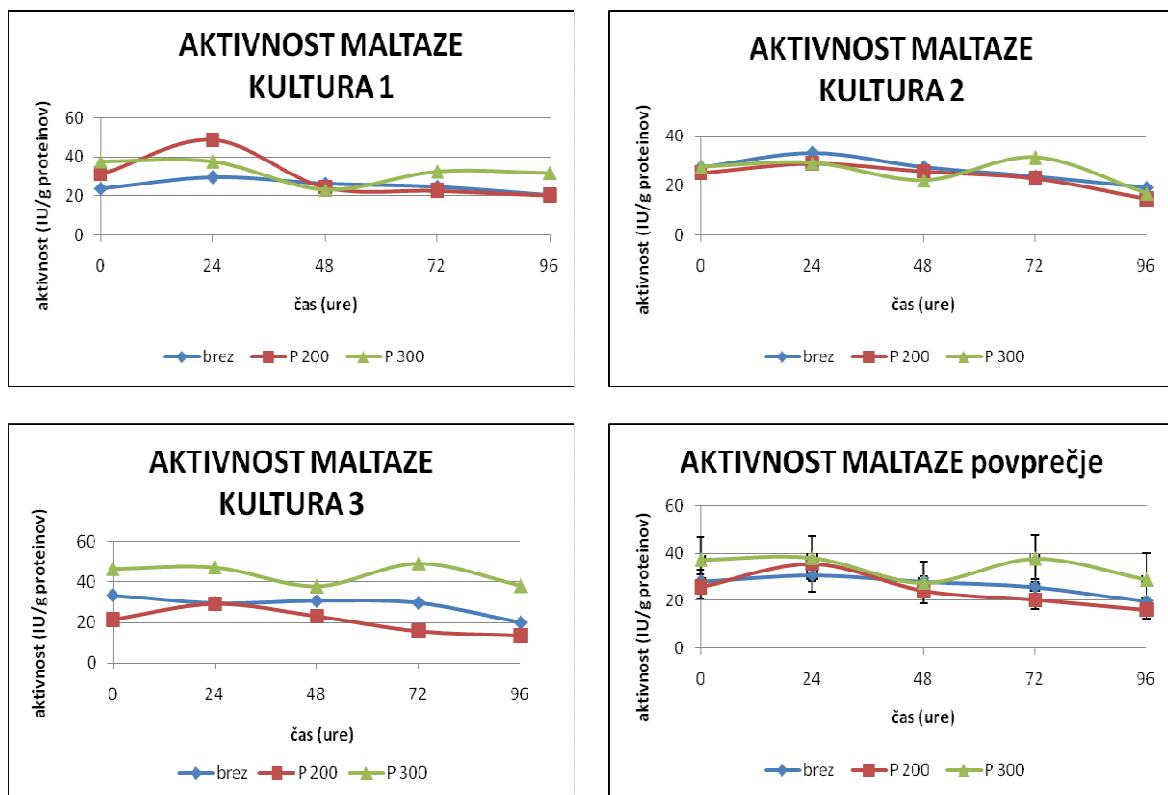
Preglednica 9: Koncentracije proteinov in aktivnosti maltaze izražene na g proteinov v kulti 1, kulti 2 in kulti 3 podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa v času 96 urnega kultiviranja, posebej za del kultur, ki smo jih gojili brez peptida, del kultur s P 200 in del kultur s P 300.

| Čas (ure) | Brez peptida | | P 200 | | P 300 | |
|--------------|-----------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------|
| | Konc. proteinov (g/L) | Aktivnost maltaze (IU/g proteinov) | Konc. proteinov (g/L) | Aktivnost maltaze (IU/g proteinov) | Konc. proteinov (g/L) | Aktivnost maltaze (IU/g proteinov) |
| 0 | 0,0496 | 23,58764 | 0,0373 | 31,41618 | 0,0346 | 37,99793 |
| 24 | 0,0463 | 29,45061 | 0,0219 | 48,85118 | 0,0314 | 37,89706 |
| 48 | 0,0431 | 26,15427 | 0,0559 | 24,52842 | 0,0550 | 23,18018 |
| 72 | 0,0540 | 24,48065 | 0,0369 | 22,78450 | 0,0392 | 32,70262 |
| 96 | 0,0527 | 20,29651 | 0,0702 | 20,38731 | 0,0419 | 31,86140 |

| Čas (ure) | Brez peptida | | P 200 | | P 300 | |
|--------------|-----------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------|
| | Konc. proteinov (g/L) | Aktivnost maltaze (IU/g proteinov) | Konc. proteinov (g/L) | Aktivnost maltaze (IU/g proteinov) | Konc. proteinov (g/L) | Aktivnost maltaze (IU/g proteinov) |
| 0 | 0,0445 | 27,35068 | 0,0507 | 24,97978 | 0,0478 | 27,52876 |
| 24 | 0,0532 | 33,17536 | 0,0520 | 28,81645 | 0,0431 | 29,11132 |
| 48 | 0,0429 | 27,39530 | 0,0746 | 25,60460 | 0,0610 | 22,01849 |
| 72 | 0,0234 | 23,51627 | 0,0304 | 22,71930 | 0,0496 | 31,29088 |
| 96 | 0,0389 | 18,91703 | 0,0458 | 14,57451 | 0,0533 | 16,82690 |

| Čas (ure) | Brez peptida | | P 200 | | P 300 | |
|--------------|-----------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------|
| | Konc. proteinov (g/L) | Aktivnost maltaze (IU/g proteinov) | Konc. proteinov (g/L) | Aktivnost maltaze (IU/g proteinov) | Konc. proteinov (g/L) | Aktivnost maltaze (IU/g proteinov) |
| 0 | 0,0447 | 33,35491 | 0,0611 | 21,5252 | 0,0361 | 46,44945 |
| 24 | 0,1223 | 29,25310 | 0,0512 | 29,08222 | 0,0436 | 47,22546 |
| 48 | 0,0476 | 30,47064 | 0,0364 | 23,08982 | 0,0367 | 37,86888 |
| 72 | 0,0707 | 29,44142 | 0,0515 | 15,73287 | 0,0317 | 49,25740 |
| 96 | 0,0177 | 19,92991 | 0,0275 | 13,54973 | 0,0442 | 38,20834 |

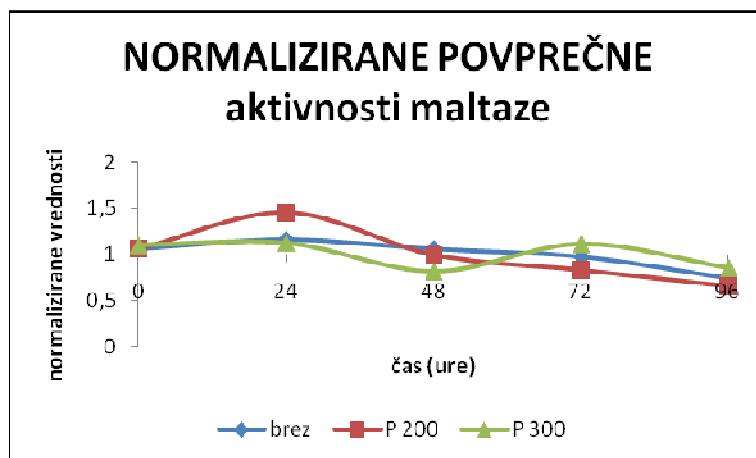
Graf 6: Spremljanje aktivnosti maltaze izražene na g proteinov v kulturi 1, kulturi 2 in kulturi 3 podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa tokom 96 urnega kultiviranja posebej za del kultur, ki smo jih gojili brez peptida, del kultur s P 200 in del kultur s P 300. Podan je tudi graf povprečnih aktivnosti maltaze.



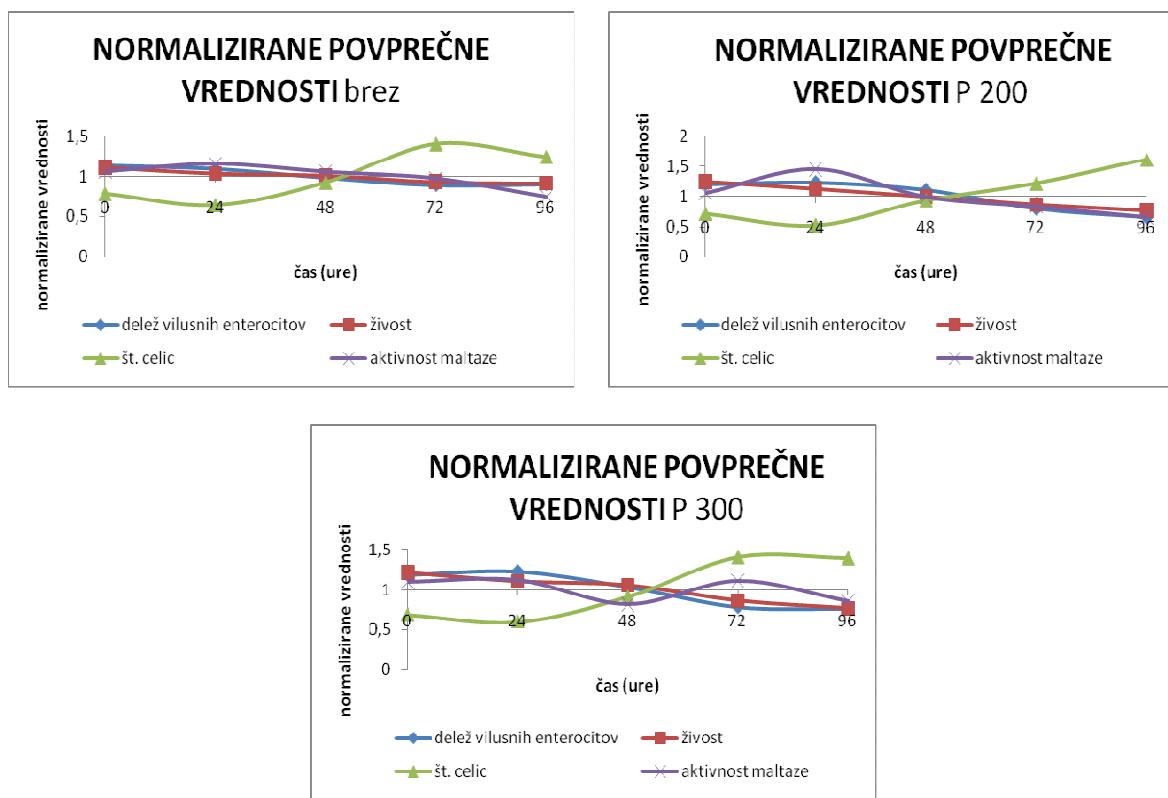
Preglednica 10: Povprečje aktivnosti maltaze, izražene na g proteinov, v treh kulturah brez peptida, v treh kulturah P 200 in v treh kulturah P 300 tokom 96 urnega kultiviranja podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa. Podane so tudi normalizirane povprečne aktivnosti maltaze. p(T0) predstavlja p vrednosti parnega t-testa v času kultiviranja izračunane glede na začetno vrednost ob času 0 ur.

| POVPREČNA (IU/g proteinov) IN NORMALIZIRANA POVPREČNA AKTIVNOST MALTAZE \pm SD | | | | | | | | | |
|----------------------------------------------------------------------------------|------------------|--------|-------------|-------------------|--------|-------------|-------------------|--------|-------------|
| Čas (ure) | Brez peptida | | Norm. vred. | P 200 | | Norm. vred. | P 300 | | Norm. vred. |
| 0 | 28,10 \pm 4,93 | p (T0) | 1,0622 | 25,97 \pm 5,02 | p (T0) | 1,0597 | 37,33 \pm 9,48 | p (T0) | 1,0990 |
| 24 | 30,63 \pm 2,21 | 0,5253 | 1,1578 | 35,58 \pm 11,49 | 0,1414 | 1,4518 | 38,08 \pm 9,06 | 0,2617 | 1,1212 |
| 48 | 28,01 \pm 2,22 | 0,9592 | 1,0588 | 24,41 \pm 1,26 | 0,6175 | 0,9958 | 27,69 \pm 8,84 | 0,0721 | 0,8153 |
| 72 | 25,81 \pm 3,18 | 0,2871 | 0,9758 | 20,41 \pm 4,05 | 0,0945 | 0,8328 | 37,75 \pm 9,99 | 0,8960 | 1,1116 |
| 96 | 19,71 \pm 0,71 | 0,1033 | 0,7453 | 16,17 \pm 3,69 | 0,0089 | 0,6598 | 28,97 \pm 10,98 | 0,0240 | 0,8529 |
| $\bar{x} \pm SD$ | $26,45 \pm 4,13$ | | | $24,51 \pm 7,26$ | | | $33,96 \pm 5,17$ | | |

Graf 7: Spremljanje normalizirane povprečne aktivnosti maltaze tokom 96 urnega kultiviranja v kulturah brez peptida, v kulturah P 200 in v kulturah P 300.



Graf 8: Normalizirane povprečne vrednosti aktivnosti maltaze, števila celic, živosti celic in deleža vilusnih enterocitov tokom 96 urnega kultiviranja v kulturah brez peptida, v kulturah P 200 in v kulturah P 300.



Tokom nadaljnega kultiviranja se povprečna aktivnost maltaze v kulturah brez peptida in v kulturah P 200 postopoma zmanjšuje, kar se ujema z upadanjem celične živosti in deleža diferenciranih vilusnih enterocitov. (Graf 8) V kulturah brez peptida aktivnost maltaze po 96 urah kultiviranja pada na povprečno 19,71 IU/g proteinov, vendar padec aktivnosti ni statistično značilen ($p > 0,05$). V kulturah P 200 pa aktivnost maltaze po 96 urah pada statistično značilno ($p=0,0089$) na povprečno 16,17 IU/g proteinov. Vzrok za upadanje

aktivnosti maltaze je verjetno v fiziološkem procesu staranja kultur in naravnem propadanju iztrošenih enterocitov v kulturah, medtem ko so novo nastale celice še v fazi diferenciacije in še niso aktivne. S staranjem kultur upada tudi potencial za obnavljanje in celice izgubljajo svojo funkcionalnost. Zmanjšanje povprečne aktivnosti maltaze je lahko tudi posledica neugodnih razmer v kulturah ob koncu kultiviranja, zaradi izrabljenosti hrnilnega medija in razrasta bakterij. V teh poizkusih medija namreč nismo menjavali, ker je bilo v predhodnih poizkusih ugotovljeno, da so celične kulture dlje časa žive brez menjave medija (pasaž) in da uporabljena količina medija zadostuje za kultivirano gostoto celic (10^6 celic/mL). Možno je tudi, da so se enterociti slabo prilagodili na novo okolje v kulturah in so zato slabše aktivni, kar je verjetno posledica toksičnih vplivov gliadinskega peptida. V kulturah P 300 so opazna večja nihanja povprečne aktivnosti maltaze. Začetnemu rahlemu dvigu sledi upad aktivnosti na povprečno 27,69 IU/g proteinov in nato ponoven dvig na povprečno 37,75 IU/g proteinov. V zadnjih 24 urah kultiviranja aktivnost maltaze pade na povprečno 28,97 IU/g proteinov, ki se statistično značilno ($p=0,0240$) razlikuje od začetne vrednosti. Spreminjanje aktivnosti maltaze se ne ujema s spremenjanjem povprečne živosti in deleža diferenciranih vilusnih enterocitov, ki tokom kultiviranja upadata. (Graf 8) Iz tega lahko sklepamo, da k aktivnosti maltaze ne prispevajo izključno diferencirani vilusni enterociti, ampak disaharidazne aktivnosti najverjetneje odražajo tudi druge celice v kulti oziroma nediferencirani enterociti, vendar bo to domnevo potrebno potrditi še v nadaljnjih raziskavah. Nihanja aktivnosti maltaze so lahko tudi posledica vzorčenja, kjer smo zajeli različen delež enterocitov iz posamezne kulture. Bolj verjetno pa je, da je spremenjanje maltazne aktivnosti posledica endogenega biološkega ritma. V kulturah brez dodanega peptida se aktivnost maltaze tokom kultiviranja ohrani, v kulturah z dodanim peptidom v obeh koncentracijah pa je padec povprečne maltazne aktivnosti statistično značilen, iz česar lahko sklepamo, da bi peptid p₃₁₋₄₃ lahko imel direkten toksičen vpliv na "zdrave" podganje enterocite. Možno je, da peptid povzroči oslabitev signala za diferenciacijo in posledično nastaja manj končno diferenciranih enterocitov, zaradi česar je zmanjšana tudi aktivnost njihovih encimov. Pri statistični obdelavi rezultatov smo posamezne skupine primerjali tudi med seboj, vendar statistično značilnih razlik med kulturami brez peptida in kulturami s peptidom pri 5 % tveganju nismo dokazali. Med posameznimi kulturami so opazne velike individualne razlike, ki so posledica biološke variabilnosti.

4.3.2 Spremljanje specifične aktivnosti saharaze

Preglednica 11 in Graf 9 prikazujeta koncentracije proteinov in aktivnosti saharaze, izražene na g proteinov v posameznih kulturah v času 96 urnega kultiviranja. Zaradi boljše preglednosti so v Preglednici 12 prikazane povprečne in normalizirane povprečne aktivnosti saharaze v kulturah podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa, posebej za kulture brez dodanega peptida, kulture P 200 in kulture P 300 tokom 96 urnega kultiviranja.

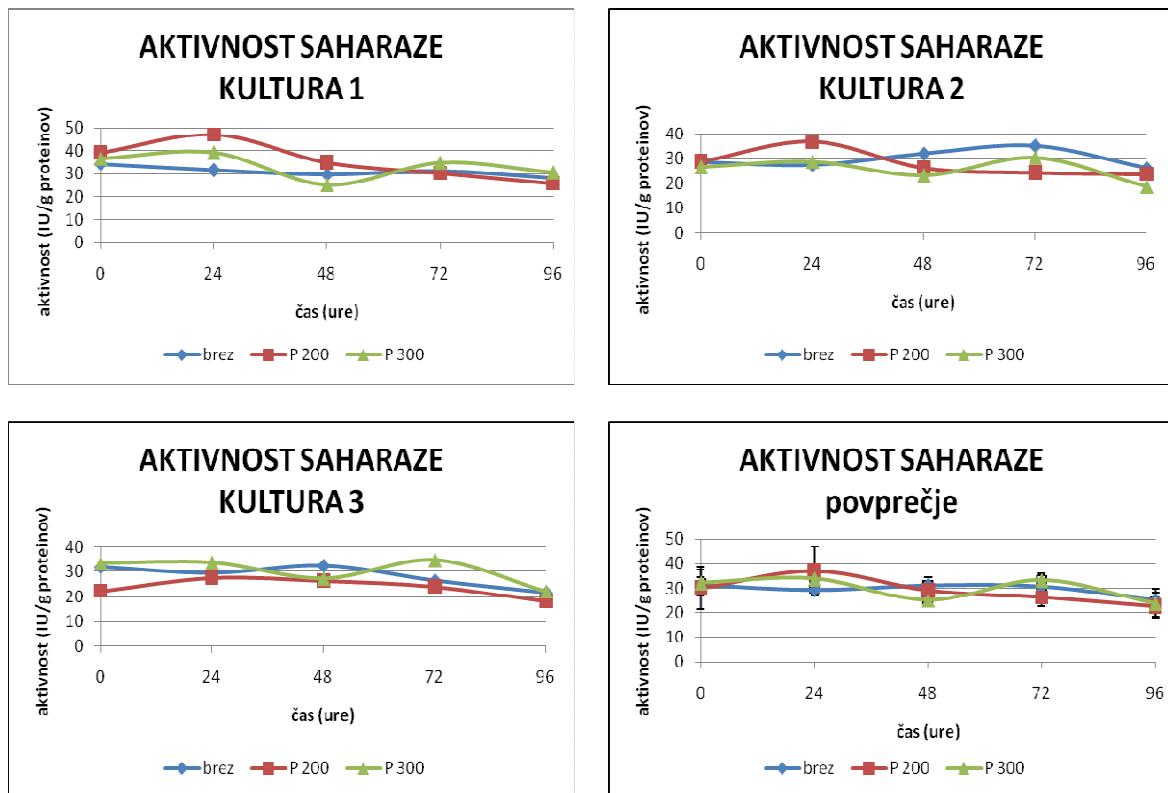
Preglednica 11: Koncentracije proteinov in aktivnosti saharaze izražene na g proteinov v kulturi 1, kulturi 2 in kulturi 3 podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa v času 96 urnega kultiviranja, posebej za del kultur, ki smo jih gojili brez peptida, del kultur s P 200 in del kultur s P 300.

| Čas (ure) | Brez peptida | | P 200 | | P 300 | |
|--------------|-----------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------|
| | Konc. proteinov (g/L) | Aktivnost saharaze (IU/g proteinov) | Konc. proteinov (g/L) | Aktivnost saharaze (IU/g proteinov) | Konc. proteinov (g/L) | Aktivnost saharaze (IU/g proteinov) |
| 0 | 0,0496 | 34,20208 | 0,0373 | 39,27023 | 0,0346 | 36,59116 |
| 24 | 0,0463 | 31,55400 | 0,0219 | 47,07523 | 0,0314 | 39,13927 |
| 48 | 0,0431 | 29,56641 | 0,0559 | 35,03685 | 0,0550 | 24,96310 |
| 72 | 0,0540 | 31,15719 | 0,0369 | 30,37987 | 0,0392 | 34,74677 |
| 96 | 0,0527 | 27,90832 | 0,0702 | 25,82419 | 0,0419 | 30,49524 |

| Čas (ure) | Brez peptida | | P 200 | | P 300 | |
|--------------|-----------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------|
| | Konc. proteinov (g/L) | Aktivnost saharaze (IU/g proteinov) | Konc. proteinov (g/L) | Aktivnost saharaze (IU/g proteinov) | Konc. proteinov (g/L) | Aktivnost saharaze (IU/g proteinov) |
| 0 | 0,0445 | 28,44491 | 0,0507 | 28,82305 | 0,0478 | 26,50956 |
| 24 | 0,0532 | 27,27789 | 0,0520 | 36,53813 | 0,0431 | 28,65623 |
| 48 | 0,0429 | 31,95662 | 0,0746 | 26,26086 | 0,0610 | 23,14336 |
| 72 | 0,0234 | 35,06211 | 0,0304 | 24,36496 | 0,0496 | 30,2813 |
| 96 | 0,0389 | 26,04179 | 0,0458 | 23,73597 | 0,0533 | 18,61684 |

| Čas (ure) | Brez peptida | | P 200 | | P 300 | |
|--------------|-----------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------|
| | Konc. proteinov (g/L) | Aktivnost saharaze (IU/g proteinov) | Konc. proteinov (g/L) | Aktivnost saharaze (IU/g proteinov) | Konc. proteinov (g/L) | Aktivnost saharaze (IU/g proteinov) |
| 0 | 0,0447 | 31,82843 | 0,0611 | 22,32211 | 0,0361 | 33,48755 |
| 24 | 0,1223 | 29,33316 | 0,0512 | 27,55140 | 0,0436 | 33,73247 |
| 48 | 0,0476 | 32,36256 | 0,0364 | 26,38837 | 0,0367 | 27,24454 |
| 72 | 0,0707 | 26,32755 | 0,0515 | 24,08527 | 0,0317 | 34,73215 |
| 96 | 0,0177 | 21,54751 | 0,0275 | 18,06700 | 0,0442 | 22,01836 |

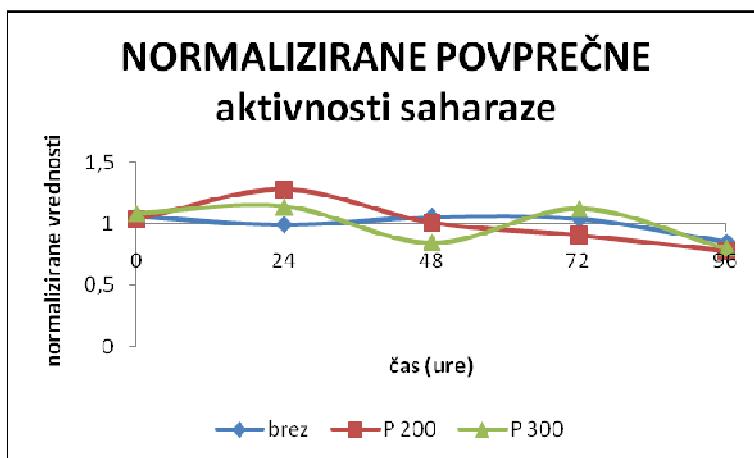
Graf 9: Spremljanje aktivnosti saharaze izražene na g proteinov v kulturi 1, kulturi 2 in kulturi 3 podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa tokom 96 urnega kultiviranja posebej za del kultur, ki smo jih gojili brez peptida, del kultur s P 200 in del kultur s P 300. Podan je tudi graf povprečnih aktivnosti saharaze.



Preglednica 12: Povprečje aktivnosti saharaze, izražene na g proteinov, v treh kulturah brez peptida, v treh kulturah P 200 in v treh kulturah P 300 tokom 96 urnega kultiviranja podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa. Podane so tudi normalizirane povprečne aktivnosti saharaze. p(T0) predstavlja p vrednost parnega t-testa v času kultiviranja izračunane glede na začetno vrednost ob času 0 ur.

| POVPREČNA (IU/g proteinov) IN NORMALIZIRANA POVPREČNA AKTIVNOST SAHARAZE \pm SD | | | | | | | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|---------------|---------------|------------------------------------|---------------|---------------|------------------------------------|---------------|---------------|
| Čas (ure) | Brez peptida | | Norm. vred. | P 200 | | Norm. vred. | P 300 | | Norm. vred. |
| 0 | 31,49 \pm 2,89 | p (T0) | 1,0625 | 30,14 \pm 8,55 | p (T0) | 1,0375 | 32,20 \pm 5,16 | p (T0) | 1,0868 |
| 24 | 29,39 \pm 2,14 | 0,0465 | 0,9916 | 37,06 \pm 9,77 | 0,0146 | 1,2756 | 33,84 \pm 5,24 | 0,1463 | 1,1424 |
| 48 | 31,30 \pm 1,51 | 0,9417 | 1,0559 | 29,23 \pm 5,03 | 0,7540 | 1,0062 | 25,12 \pm 2,06 | 0,0998 | 0,8479 |
| 72 | 30,85 \pm 4,38 | 0,8780 | 1,0409 | 26,28 \pm 3,56 | 0,3378 | 0,9046 | 33,25 \pm 2,57 | 0,5818 | 1,1225 |
| 96 | 25,17 \pm 3,27 | 0,1086 | 0,8491 | 22,54 \pm 4,01 | 0,1225 | 0,7760 | 23,71 \pm 6,12 | 0,0329 | 0,8004 |
| $\bar{x} \pm SD$ | 29,64 \pm 2,63 | | | 29,05 \pm 5,37 | | | 29,62 \pm 4,82 | | |

Graf 10: Spremljanje normalizirane povprečne aktivnosti saharaze tokom 96 urnega kultiviranja v kulturah brez peptida, v kulturah P 200 in v kulturah P 300.

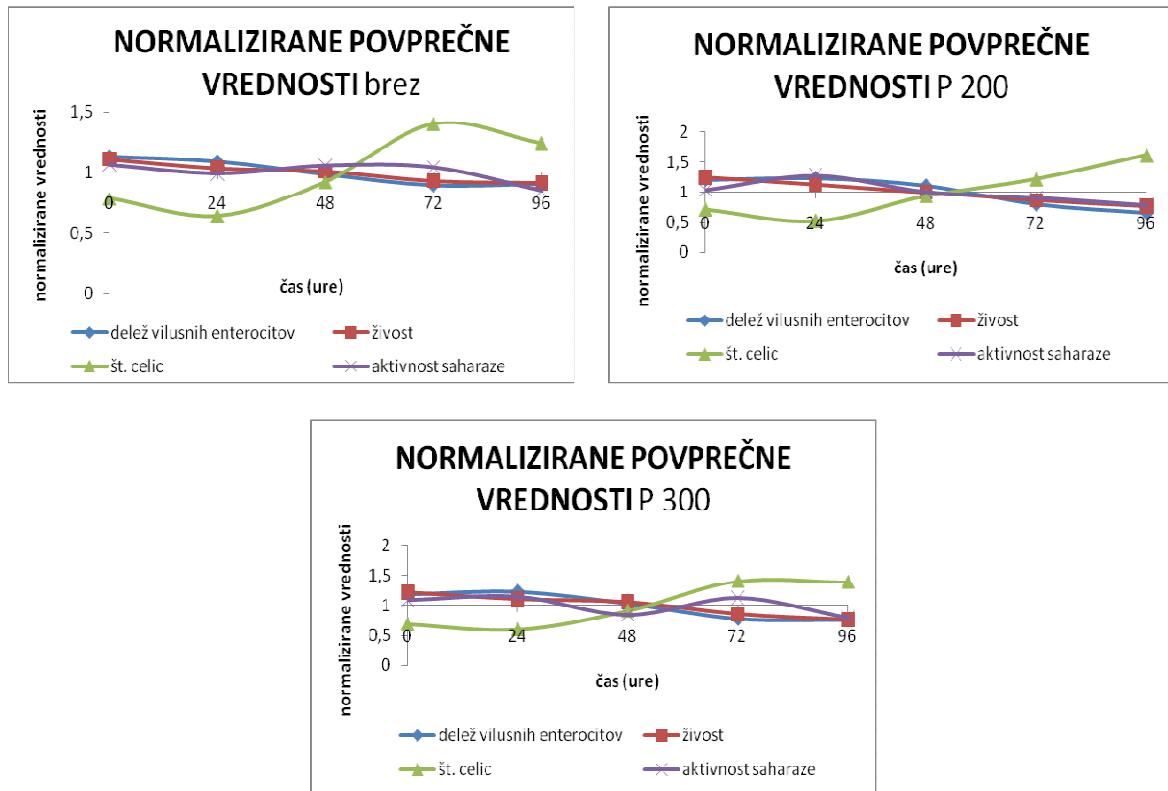


Iz grafa normaliziranih povprečnih vrednosti (Graf 10) je razvidno, da povprečna aktivnost saharaze v kulturah brez dodanega peptida tokom 72 ur kultiviranja niha okrog povprečne začetne vrednosti 31,49 IU/g proteinov. V prvih 24 urah se aktivnost saharaze zniža na povprečno 29,39 IU/g proteinov, kar je pri 5 % tveganju statistično značilno ($p=0,0465$). V celičnih kulturah se verjetno še niso ustvarile optimalne razmere in vzpostavili ustreznii biokemijski procesi, kar se odraža tudi v manjši aktivnosti saharaze. Nadaljnje spremembe povprečne aktivnosti saharaze niso statistično značilne ($p > 0,05$) in so verjetno posledica endogenih bioloških ritmov *in vitro*. Spreminjanje aktivnosti saharaze se ne ujema s spremenjanjem povprečne živosti in deleža diferenciranih vilusnih enterocitov (Graf 11), ki tokom kultiviranja upadata. Iz tega lahko sklepamo, da nosilci aktivnosti saharaze niso le diferencirani vilusni enterociti, ampak tudi druge celice v kulturi oziroma nediferencirani enterociti, vendar bo to domnevo potreben potrditi še v nadalnjih raziskavah. Nihanja povprečnih aktivnosti saharaze so lahko tudi posledica vzorčenja, kjer smo zajeli različen delež enterocitov iz posamezne kulture. V zadnjih 24 urah kultiviranja pade aktivnost saharaze v kulturah brez gliadinskega peptida na povprečno 25,17 IU/g proteinov, kar pa ni statistično značilno ($p > 0,05$). Vzrok je verjetno v fiziološkem staranju kultur in naravnem propadanju iztrošenih enterocitov. Ob koncu kultiviranja pride do neugodnih razmer v kulturah, kar lahko prav tako povzroči zmanjšanje povprečne aktivnosti saharaze. V kulturah P 200 pride v prvih 24 urah kultiviranja do zvišanja aktivnosti saharaze iz povprečno 30,14 IU/g proteinov na povprečno 37,06 IU/g proteinov, ki je pri 5 % tveganju statistično značilno ($p=0,0146$). Prehodni dvig povprečne aktivnosti saharaze je lahko posledica endogenih bioloških ritmov. *In vitro* je odsotno delovanje pankreasne proteaze na membranske encime enterocitov, kar bi prav tako lahko bil razlog za povečanje

aktivnosti saharaze v prvih 24 urah kultiviranja. Možna razloga pa je tudi ta, da toksični gliadinski peptid spodbudi aktivnost saharaze preko vpliva na povečano propadanje encima, lahko pa pride tudi do indukcije in povečane sinteze encima, vendar je ta učinek kratkotrajen in kasneje izzveni. Med nadalnjim kultiviranjem aktivnost saharaze postopoma upade na povprečno 22,54 IU/g proteinov, vendar zmanjšanje povprečne aktivnosti saharaze ni statistično značilno ($p > 0,05$). Zniževanje aktivnosti saharaze se ujema z upadanjem povprečne živosti in deleža diferenciranih enterocitov. (Graf 11) Vzrok za zmanjšano aktivnost saharaze je lahko staranje kulture in propadanje iztrošenih enterocitov, medtem ko novo nastale celice še niso aktivne. Proti koncu kultiviranja je lahko zmanjšana aktivnost saharaze tudi posledica iztrošenosti medija in okužbe z bakterijami. Upadanje saharazne aktivnosti je lahko tudi posledica vpliva toksičnega gliadinskega peptida, ki verjetno predstavlja dodatni stresni dejavnik ter povzroči slabše prilagajanje enterocitov na razmere v kulturah in slabše aktivnosti njihovih encimov. V kulturah P 300 prihaja do večjih nihanj povprečne aktivnosti saharaze. Aktivnost se najprej poveča iz povprečno 32,20 IU/g proteinov na povprečno 33,84 IU/g proteinov, nato pade na povprečno 25,12 IU/g proteinov, čemur sledi ponovno povečanje aktivnosti na povprečno 33,25 IU/g proteinov. Spreminjanje aktivnosti saharaze se ne ujema s spremembo povprečne živosti in deleža diferenciranih vilusnih enterocitov (Graf 11), ki tokom kultiviranja upadata. Nihanje povprečne aktivnosti saharaze bi lahko bila posledica toksičnih vplivov peptida p_{31-43} na podganje enterocite. Ker pa spremembe saharazne aktivnosti niso statistično značilne, so bolj verjetno posledica endogenih bioloških ritmov, ki jih imajo disaharidaze tudi *in vitro*. Lahko pa je sprememba povprečne aktivnosti saharaze posledica heterogenih epitelijskih celic v kulti, in smo pri vzorčenju zajeli enkrat več in drugič manj diferenciranih enterocitov, ki so nosilci disaharidazne aktivnosti. V zadnjih 24 urah kultiviranja se aktivnost saharaze zmanjša na povprečno 23,71 IU/g proteinov, ki se statistično značilno razlikuje ($p=0,0329$) od začetne aktivnosti. Povprečna aktivnost saharaze se je tokom 96 urnega kultiviranja statistično značilno zmanjšala le v kulturah P 300, medtem ko v kulturah brez peptida in kulturah P 200 upad saharazne aktivnosti ni bil statistično značilen. Iz teh rezultatov sklepamo, da bi peptid p_{31-43} lahko imel toksičen vpliv na "zdrave" podganje enterocite le pri višji koncentraciji 300 µg/mL in dolgotrajnejšem vplivu, kar se posledično kaže v znižani aktivnosti saharaze. Posamezne skupine smo primerjali tudi med seboj, vendar statistično značilnih razlik med kulturami brez peptida in kulturami z gliadinskim peptidom pri 5 % tveganju nismo dokazali. Med

posameznimi kulturami so opazne velike individualne razlike, ki so posledica biološke variabilnosti.

Graf 11: Normalizirane povprečne vrednosti aktivnosti saharaze, števila celic, živosti celic in deleža vilusnih enterocitov tokom 96 urnega kultiviranja v kulturah brez peptida, v kulturah P 200 in v kulturah P 300.



Razponi specifične aktivnosti maltaze in saharaze so se pri posameznih kulturah med seboj razlikovali, vendar smo opazili podoben trend nihanja povprečnih aktivnosti obeh encimov, kar je verjetno posledica endogenih bioloških ritmov. Črevesne disaharidaze imajo tudi *in vitro* svoj endogeni ritem, ki ima nekatere lastnosti ultradialnega ritma, znotraj katerega se pojavljajo nihanja v aktivnosti na približno 4 ure, pri čemer aktivnosti disaharidaz nihajo tudi do $\pm 30\%$. (43, 44) Vendar pa encimske aktivnosti posameznih encimov v kulturah ne nihajo sočasno, zato prihaja do razlik in visokih standardnih deviacij med posameznimi kulturami. Upad aktivnosti disaharidaz proti koncu kultiviranja je posledica fiziološkega staranja kulture, neugodnih razmer in propadanja iztrošenih enterocitov v kulturah. Upad celične živosti v kulturah pa je še hitrejši kot upad encimske aktivnosti, kar dokazuje, da so disaharidaze aktivne tudi pri mrtvih celicah, dokler so celice še formirane in je celična membrana še prisotna.

Peptidi glutena naj bi bili toksični le za enterocite bolnikov s celiakijo, ki so genetsko predispozirani. (13) Primarna suspenzijska kultura podganjih epitelijskih celic ozrega

črevesa, ki smo jo uporabili pri raziskavi, pa predstavlja fiziološki model, torej "zdrave" enterocite, za katere je verjetno, da se ne odzivajo na toksične peptide. Iz spremeljanja specifičnih aktivnosti maltaze in saharaze lahko zaključimo, da bi peptid p₃₁₋₄₃ lahko imel toksičen vpliv na "zdrave" podganje enterocite tako pri koncentraciji 200 µg/mL kot tudi 300 µg/mL ob dolgotrajnejšem vplivu (72 oz. 96 ur), kar pri krajših poizkusih ni zaznavno. Vpliv gliadinskega peptida se kaže v statistično značilnem znižanju aktivnosti maltaze tokom kultiviranja in delno tudi v znižanju aktivnosti saharaze, vendar statistično značilnih razlik med kulturami brez peptida in kulturami z gliadinskim peptidom pri 5 % tveganju nismo dokazali.

4.3.3 Spremljanje specifične aktivnosti tkivne transglutaminaze

Koncentracije proteinov in aktivnosti TG2, izražene na g proteinov v posameznih kulturah v času 96 urnega kultiviranja prikazujeta Preglednica 13 in Graf 12. Aktivnost TG2 ima v posameznih celičnih kulturah različne razpone vrednosti in zaradi boljše preglednosti so v Preglednici 14 prikazane povprečne in normalizirane povprečne aktivnosti TG2 v kulturah podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa, posebej za kulture brez dodanega peptida, kulture P 200 in kulture P 300 tokom 96 urnega kultiviranja.

TG2 naj bi bila pod normalnimi fiziološkimi pogoji neaktivna in šele različne fizične in kemične poškodbe celic naj bi povzročile njeno aktivacijo. (88) Iz grafa povprečnih vrednosti (Graf 13) vidimo, da je v kulturah brez peptida povprečna aktivnost TG2 ob začetku kultiviranja ničelna, kar pomeni, da encim ni aktiven. V kulturah so se verjetno ustvarili ugodni pogoji za rast in so se celice prilagodile novim razmeram. Po 48 urah kultiviranja se aktivnost TG2 dvigne na povprečno 0,009 IU/g proteinov, ki se ob minimalnem nihaju vzdržuje vse do konca kultiviranja. Povečanje povprečne aktivnosti TG2 ni statistično značilno ($p > 0,05$) in je lahko posledica endogenih bioloških ritmov *in vitro* ali neizogibnih meritvenih napak. Prav tako je povečanje aktivnosti TG2 ob koncu kultiviranja lahko posledica iztrošenosti media in razrasta bakterij. V kulturah z gliadinskim peptidom je trend spremeljanja aktivnosti TG2 pri obeh koncentracijah peptida podoben. Ob začetku kultiviranja encim ni aktiven. Po 24 urah kultiviranja začne aktivnost TG2 naraščati in doseže v kulturah P 200 najvišjo vrednost po 48 urah (povprečno 0,725 IU/g proteinov), ki je statistično značilno višja ($p=0,0396$) od začetne aktivnosti. Tokom nadaljnega kultiviranja se povprečna aktivnost TG2 postopno zmanjša na povprečno 0,276 IU/g proteinov, ki pa se od začetne vrednosti ne razlikuje statistično značilno ($p > 0,05$). V

kulturah P 300 povprečna aktivnost TG2 po 48 urah statistično značilno naraste ($p=0,0125$) na povprečno 0,477 IU/g proteinov in nato v naslednjih 24 urah doseže najvišjo vrednost tokom kultiviranja (povprečno 0,575 IU/g proteinov). Ob koncu kultiviranja se aktivnost TG2 zmanjša na povprečno 0,318 IU/g proteinov, ki pa je še vedno statistično značilno višja ($p=0,0465$) od začetne aktivnosti. Toksični peptid verjetno deluje kot stresni dejavnik in v kulturah ustvari neugodne razmere, kar se posledično kaže v zvišani aktivnosti TG2.

Do podobnih opažanj so prišli tudi v predhodnih raziskavah. (96)

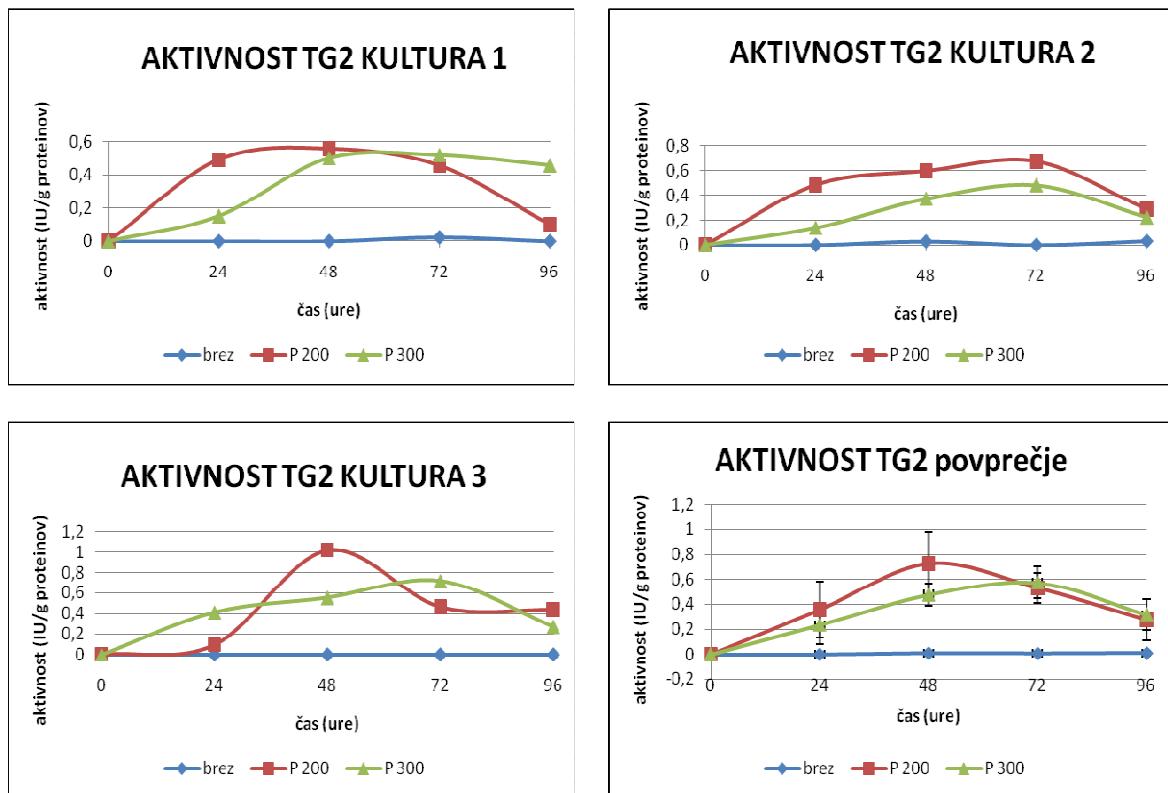
Preglednica 13: Koncentracije proteinov in aktivnosti tkivne transglutaminaze izražene na g proteinov v kulturi 1, kulturi 2 in kulturi 3 podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa v času 96 urnega kultiviranja, posebej za del kultur, ki smo jih gojili brez peptida, del kultur s P 200 in del kultur s P 300.

| Čas (ure) | Brez peptida | | P 200 | | P 300 | |
|--------------|-----------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------|
| | Konc. proteinov (g/L) | Aktivnost TG2 (IU/g proteinov) | Konc. proteinov (g/L) | Aktivnost TG2 (IU/g proteinov) | Konc. proteinov (g/L) | Aktivnost TG2 (IU/g proteinov) |
| 0 | 0,0496 | 0 | 0,0373 | 0 | 0,0346 | 0 |
| 24 | 0,0463 | 0 | 0,0219 | 0,49200 | 0,0314 | 0,15295 |
| 48 | 0,0431 | 0 | 0,0559 | 0,55778 | 0,0550 | 0,50217 |
| 72 | 0,0540 | 0,02223 | 0,0369 | 0,45514 | 0,0392 | 0,52057 |
| 96 | 0,0527 | 0 | 0,0702 | 0,10250 | 0,0419 | 0,45766 |

| Čas (ure) | Brez peptida | | P 200 | | P 300 | |
|--------------|-----------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------|
| | Konc. proteinov (g/L) | Aktivnost TG2 (IU/g proteinov) | Konc. proteinov (g/L) | Aktivnost TG2 (IU/g proteinov) | Konc. proteinov (g/L) | Aktivnost TG2 (IU/g proteinov) |
| 0 | 0,0445 | 0 | 0,0507 | 0 | 0,0478 | 0 |
| 24 | 0,0532 | 0 | 0,0520 | 0,48430 | 0,0431 | 0,13924 |
| 48 | 0,0429 | 0,02795 | 0,0746 | 0,59489 | 0,0610 | 0,37391 |
| 72 | 0,0234 | 0 | 0,0304 | 0,67090 | 0,0496 | 0,48392 |
| 96 | 0,0389 | 0,03088 | 0,0458 | 0,28786 | 0,0533 | 0,22499 |

| Čas (ure) | Brez peptida | | P 200 | | P 300 | |
|--------------|-----------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------|
| | Konc. proteinov (g/L) | Aktivnost TG2 (IU/g proteinov) | Konc. proteinov (g/L) | Aktivnost TG2 (IU/g proteinov) | Konc. proteinov (g/L) | Aktivnost TG2 (IU/g proteinov) |
| 0 | 0,0447 | 0 | 0,0611 | 0 | 0,0361 | 0 |
| 24 | 0,1223 | 0 | 0,0512 | 0,09371 | 0,0436 | 0,41304 |
| 48 | 0,0476 | 0 | 0,0364 | 1,02132 | 0,0367 | 0,55511 |
| 72 | 0,0707 | 0 | 0,0515 | 0,46560 | 0,0317 | 0,71905 |
| 96 | 0,0177 | 0 | 0,0275 | 0,43667 | 0,0442 | 0,27132 |

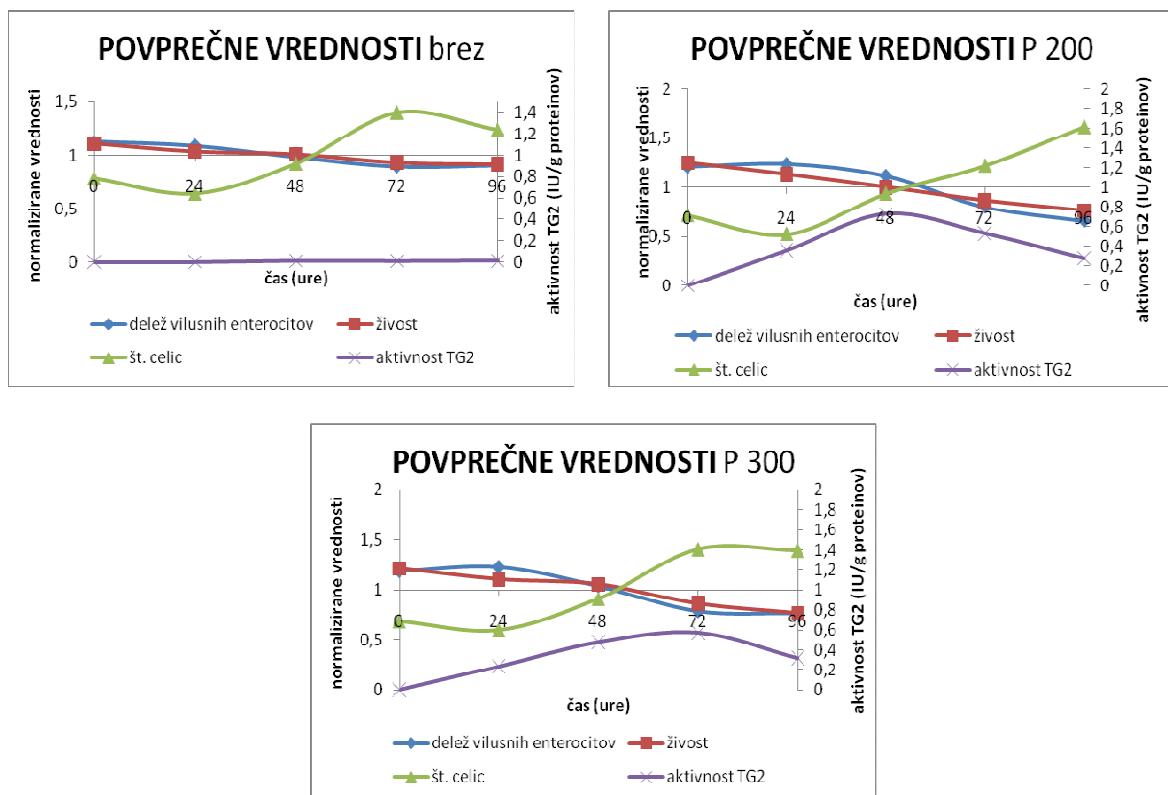
Graf 12: Spremljanje aktivnosti tkivne transglutaminaze (TG2) izražene na g proteinov v kulturi 1, kulturi 2 in kulturi 3 podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa tokom 96 urnega kultiviranja posebej za del kultur, ki smo jih gojili brez peptida, del kultur s P 200 in del kultur s P 300. Podan je tudi graf povprečnih aktivnosti TG2.



Preglednica 14: Povprečje aktivnosti tkivne transglutaminaze, izražene na g proteinov, v treh kulturah brez peptida, v treh kulturah P 200 in v treh kulturah P 300 tokom 96 urnega kultiviranja podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa. Podane so tudi normalizirane povprečne aktivnosti tkivne transglutaminaze. p(T0) predstavlja p vrednosti parnega t-testa v času kultiviranja izračunane glede na začetno vrednost ob času 0 ur.

| POVPREČNA (IU/g proteinov) IN NORMALIZIRANA POVPREČNA AKTIVNOST TRANSGLUTAMINAZE \pm SD | | | | | | | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------|-------------|-------------------|--------|-------------|-------------------|--------|-------------|
| Čas (ure) | Brez peptida | | Norm. vred. | P 200 | | Norm. vred. | P 300 | | Norm. vred. |
| 0 | 0,000 \pm 0,00 | p (T0) | 0 | 0,000 \pm 0,00 | p (T0) | 0 | 0,000 \pm 0,00 | p (T0) | 0 |
| 24 | 0,000 \pm 0,00 | / | 0 | 0,357 \pm 0,23 | 0,1133 | 0,9448 | 0,235 \pm 0,15 | 0,1186 | 0,7325 |
| 48 | 0,009 \pm 0,02 | 0,4227 | 1,7240 | 0,725 \pm 0,26 | 0,0396 | 1,9196 | 0,477 \pm 0,09 | 0,0125 | 1,4865 |
| 72 | 0,007 \pm 0,01 | 0,4227 | 1,3712 | 0,531 \pm 0,12 | 0,0171 | 1,4054 | 0,575 \pm 0,13 | 0,0158 | 1,7902 |
| 96 | 0,010 \pm 0,02 | 0,4227 | 1,9048 | 0,276 \pm 0,17 | 0,1041 | 0,7302 | 0,318 \pm 0,12 | 0,0465 | 0,9908 |
| $\bar{x} \pm SD$ | $0,005 \pm 0,005$ | | | $0,378 \pm 0,273$ | | | $0,321 \pm 0,223$ | | |

Graf 13: Povprečne aktivnosti tkivne transglutaminaze, izražene na g proteinov ter normalizirane povprečne vrednosti števila celic, živosti celic in deleža vilusnih enterocitov tokom 96 urnega kultiviranja v kulturah brez peptida, v kulturah P 200 in v kulturah P 300.



Ob koncu kultiviranja je TG2 v vseh kulturah še vedno aktivna, čeprav je celična živost že precej nizka. TG2 ima namreč pomembno vlogo pri apoptozi celic, saj sodeluje pri polimerizaciji znotrajceličnih proteinov, kar stabilizira strukturo umirajoče celice in prepreči sproščanje znotrajceličnih komponent. (88) Pri statistični obdelavi podatkov smo posamezne skupine primerjali med seboj. Povprečna aktivnost TG2 se v kulturah P 200 in v kulturah P 300 po 48 urah kultiviranja pri 5 % tveganju statistično značilno poveča glede na kulture brez peptida ($p=0,004$ in $p=0,033$). Tudi po 72 in 96 urah kultiviranja je povprečna aktivnost TG2 v kulturah z gliadinskim peptidom pri obeh koncentracijah statistično značilno višja kot v kulturah brez peptida ($p=0,049$ po 72 urah in $p=0,036$ po 96 urah za kulture P 200 ter $p=0,046$ po 72 urah in $p=0,020$ po 96 urah za kulture P 300). Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da ima gliadinski peptid p₃₁₋₄₃ direkten toksičen vpliv na "zdrave" podganje epitelijске celice ozkega črevesa. V nedavni študiji so ugotovili, da naj bi se peptid p₃₁₋₄₃ kopičil v lizosomih epitelijskih celic ozkega črevesa in v celicah sprožil oksidativni stres, ki bi nato posledično induciral povečano izražanje in povečano aktivnost TG2. (97) Med kulturami P 200 in kulturami P 300 pri 5 % tveganju ni statistično značilnih razlik, torej je vpliv obeh koncentracij toksičnega peptida p₃₁₋₄₃ na celice enak.

5 SKLEPI

V raziskovalni nalogi smo tokom 96 urnega kultiviranja proučevali vplive toksičnega gliadinskega peptida p₃₁₋₄₃ na primarne suspenzijske kulture podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa preko spremeljanja števila celic, živosti celic, deleža diferenciranih vilusnih enterocitov in aktivnosti treh encimov: maltaze, saharaze in tkivne transglutaminaze. Na podlagi dobljenih rezultatov smo prišli do sledečih ugotovitev.

- Z uporabljenim postopkom izolacije je bila izolirala heterogena populacija črevesnih epitelijskih celic, ki poleg diferenciranih vilusnih enterocitov vključujejo še ostale epitelijske celice ozkega črevesa (čašaste, enteroendokrine, Panethove in izvorne celice).
- V kulturah so bili prisotni oblački mukusa, ki kažejo na prisotnost in aktivnost čašastih celic.
- Izolirani vilusni enterociti imajo v gostih kulturah ($>10^6$ celic/mL) težnjo po združevanju in tvorbi enoskladnega epitelija, saj smo v kulturah opazili po dva ali več združenih vilusnih enterocitov. Za suspenzijsko kulturo je priporočljiva gostota celic $\leq 10^6$ celic/mL.
- Peptid p₃₁₋₄₃ v času 96 urnega kultiviranja ni izrazito vplival na **morfologijo celic**, saj značilnih razlik v morfologiji celic med kulturami s peptidom in kulturami brez peptida nismo opazili. V vseh kulturah je prišlo do propadanja in deformacije epitelijskih celic.
- Gliadinski peptid p₃₁₋₄₃ ni vplival na **število celic** v kulti, saj med kulturami z dodanim peptidom in kulturami brez peptida pri 5 % tveganju ni bilo statistično značilnih razlik.
- Upad **celične živosti** je bil znotraj kultur z gliadinskim peptidom večji kot znotraj kontrolnih kultur brez dodanega peptida. Pri primerjavi posameznih skupin med seboj pa smo statistično značilne razlike pri 5 % tveganju dokazali le v kulturah z dodanim peptidom p₃₁₋₄₃ v koncentraciji 200 µg/mL in le po 48 urah kultiviranja napram kulturam brez peptida. Tokom nadaljnjega kultiviranja statistično značilnih razlik pri 5 % tveganju med kulturami brez dodanega peptida in kulturami z dodanim peptidom ni bilo.
- Metoda za oceno živosti s tripanskim modrilom ni najbolj primerna in optimalna.

- V kulturah z dodanim gliadinskim peptidom smo tokom kultiviranja zabeležili statistično značilen padec **deleža enterocitov**, iz česar lahko sklepamo, da bi gliadinski peptid p₃₁₋₄₃ lahko nek imel toksičen vpliv na "zdrave" podganje enterocite in pomaknil ravnotežje med diferenciacijo in odmiranjem enterocitov v smer povečanega propada, vendar statistično značilnih razlik med skupinami z dodanim peptidom in skupinami brez peptida pri 5 % tveganju nismo dokazali.
- Iz spremeljanja aktivnosti **maltaze** smo z uporabo dveh statističnih pristopov ugotovili, da gliadinski peptid p₃₁₋₄₃ niti v koncentraciji 200 µg/mL, niti v koncentraciji 300 µg/mL nima toksičnega vpliva na "zdrave" podganje enterocite. Aktivnost maltaze se je tokom kultiviranja znotraj kultur z dodanim gliadinskim peptidom sicer statistično značilno zmanjšala, vendar statistično značilnih razlik med skupinami brez dodanega peptida in skupinami z dodanim peptidom pri 5 % tveganju nismo dokazali.
- Tudi iz spremeljanja aktivnosti **saharaze** smo z uporabo dveh statističnih pristopov ugotovili, da gliadinski peptid p₃₁₋₄₃ niti v koncentraciji 200 µg/mL, niti v koncentraciji 300 µg/mL nima toksičnega vpliva na "zdrave" podganje enterocite. Aktivnost saharaze se je statistično značilno zmanjšala glede na začetno vrednost le v kulturah z dodanim gliadinskim peptidom v koncentraciji 300 µg/mL ob dolgotrajnejšem vplivu (po 96 urah kultiviranja), statistično značilnih razlik med skupinami brez dodanega peptida in skupinami z dodanim peptidom pa pri 5 % tveganju nismo dokazali.
- Določena stopnja variabilnosti v aktivnosti maltaze in saharaze je lahko tudi posledica različnih deležev enterocitov v kulturah, ki so glavni nosilci disaharidazne aktivnosti. Tudi pri vzorčenju smo lahko zajeli enkrat več in drugič manj diferenciranih vilusnih enterocitov.
- Aktivnost **tkivne transglutaminaze** je bila v kulturah z gliadinskim peptidom, tako pri koncentraciji 200 µg/mL, kot tudi pri koncentraciji 300 µg/mL, pri 5 % tveganju statistično značilno višja v primerjavi s kulturami brez dodanega peptida. Gliadinski peptid p₃₁₋₄₃ torej morebiti ima nek toksičen vpliv na "zdrave" podganje epitelijske celice ozkega črevesa, kar se posledično kaže v zvišani aktivnosti tkivne transglutaminaze.
- Glede na vse parametre, ki smo jih spremljali v kulturah epitelijskih celic ozkega črevesa podgane, lahko zaključimo, da je za nadaljnje proučevanje toksičnih vplivov peptidov glutena na primarne kulture podganjih črevesnih celic pred prenosom metode na kultiviranje humanih epitelijskih celic črevesa potrebno nekatere faze dela izboljšati:

- ~ potek izolacije celic je potrebno prilagoditi večjim količinam tkiva (dodati večji volumen Hanksove raztopine s kolagenazo XI, večkrat spirati...),
- ~ zaradi suma na razrast bakterij med kultiviranjem (hitra izraba medija, opazne drobne migetajoče črne "pikice" pod mikroskopom), je potrebno povečati delež Ab/Am v kultivacijskem mediju do koncentracije, ki še nima zaviralnih učinkov na razmnoževanje celic ali izbrati optimalnejšo kombinacijo Ab/Am,
- ~ namesto metode barvanja celic s tripanskim modrilom izbrati objektivnejše meritnike za določanje števila in živosti celic.

V tej seriji poskusov smo prvič kot živalski model za proučevanje vpliva toksičnih glutenskih peptidov na primarne kulture epitelijskih celic ozkega črevesa uporabili podgane. Prišli smo do pomembnih ugotovitev ter odprli številna nova vprašanja za nadaljnje raziskave. Izsledki našega dela so pomembni tudi za nadaljnje proučevanje mehanizma toksičnosti gliadinskega peptida p₃₁₋₄₃ na "zdrave" humane epitelijске celice ozkega črevesa in epitelijске celice ozkega črevesa bolnikov s celiakijo, kar bi prispevalo tudi k razvoju novih terapevtskih pristopov za zdravljenje bolezni.

6 LITERATURA

- 1) Koch V: Gluten – sestavina živil in industrijskih proizvodov. Zbornik prispevkov 1. slovenskega strokovnega sestanka o celiakiji, Maribor, Slovensko društvo za celiakijo, 2002; 70-73.
- 2) Kagnoff MF: Overview and Pathogenesis of Celiac Disease. Gastroenterology 2005; 128: 10-18.
- 3) Tušek Bunc K: Celiakija v ambulanti zdravnika družinske medicine. »Celiakija« - glasilo slovenskega društva za celiakijo 2006; 5.
- 4) Howdle PD: Gliadin, glutenin or both? The search for the Holy Grail in coeliac disease. European Journal of Gastroenterology & Hepatology 2006; 18: 703-706.
- 5) Bossuyt X: Celiac disease-general and laboratory aspects. New trends in classification, monitoring and management of autoimmune diseases: The 5th FESCC Continuous Postgraduate Course in Clinical Chemistry, Dubrovnik, edited by Elizabeta Topić; Medicinska naklada, 2005; 25-30.
- 6) Ciccioppo R, Di Sabatino A, Corazza GR: The immune recognition of gluten in coeliac disease. Clin Exp Immunol 2005; 140: 408-416.
- 7) Koning F: Toxicity of prolamins in celiac disease. International Coeliac Disease Meeting, Maribor, University Medical Center, 2007; 49-54.
- 8) Mowat AM: Coeliac disease – a meeting point for genetics, immunology, and protein chemistry. Lancet 2003; 361: 1290-1292.
- 9) Mamone G, Ferranti P, Rossi M, Roepstorff P, Fierro O, Malorni A, Addeo F: Identification of a peptide from α -gliadin resistant to digestive enzymes: Implication for celiac disease. Journal of Chromatography B 2007; 855: 236-241.
- 10) Silano M, De Vincenzi M: In vitro screening of food peptides toxic for coeliac and other gluten – sensitive patients: a review. Toxicology 1999; 132: 99-110.
- 11) Bethune MT, Crespo-Bosque M, Bergseng E: Noninflammatory Gluten Peptide Analogs as Biomarkers for Celiac Sprue. Chemistry and Biology 2009; 8: 868-881.
- 12) Leeds JS, Hörloldt BS, Sidhu R, Hopper AD, Robinson K, Toulson B, Dixon L, Lobo AJ, McAlindon ME, Hurlstone DP, Sanders DS: Is there an association between coeliac disease and inflammatory bowel diseases? A study of relative prevalence in comparison with population controls. Scand J Gastroenterol 2007; 42: 1214-1220.
- 13) Dolinšek J, Urlep-Žužej D, Mičetić-Turk D: Sodobni principi diagnostike celiakije. Zdravstveni vestnik 2006; 75: II-89-97.

- 14) Molberg O, McAdam SN, Sollid LM: Role of Tissue Transglutaminase in Celiac Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* 2000; 30(3): 232-240.
- 15) Koning F: A Tertiary Twist to the Transglutaminase Tale. *PLoS Biol* 2007; 5(12): e337
[doi:10.1371/journal.pbio.0050337](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050337)
- 16) Kocjančič A, Mravlje F, Štajer D: Interna medicina, 3. izdaja, Littera picta, Ljubljana, 2005: 510-526.
- 17) Mičetić – Turk D: Celiakija nekoč in danes. *Zbornik prispevkov 1. slovenskega strokovnega sestanka o celiakiji*, Maribor, Slovensko društvo za celiakijo, 2002; 8-12.
- 18) Hourigan CS: The molecular basis of coeliac disease. *Clin Exp Med* 2006; 6: 53-59.
- 19) Rodrigo L: Celiac disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12 (41): 6585-6593.
- 20) Troncone R, Borrelli M: The clinical spectrum of celiac disease. *International Coeliac Disease Meeting*, Maribor, University Medical Center, 2007; 89-94.
- 21) Vodopivec B, Cerar A: Histopatološke spremembe pri celiakiji. *Zbornik prispevkov 1. slovenskega strokovnega sestanka o celiakiji*, Maribor, Slovensko društvo za celiakijo, 2002; 50-53.
- 22) Saavalainen P: Genetics of celiac disease. *International Coeliac Disease Meeting*, Maribor, University Medical Center, 2007; 61-69.
- 23) Green PHR, Jabri B: Celiac Disease. *Annu. Rev. Med.* 2006; 57: 207-221.
- 24) Mearin ML: Celiac Disease Among Children and Adolescents. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2007; 37: 86-105.
- 25) Dickson BC, Streutker CJ, Chetty R: Coeliac disease: an update for pathologist. *J Clin Pathol* 2006; 59: 1008-1016.
- 26) Kagnoff MF: Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J. Clin. Invest.* 2007; 117: 41-49.
- 27) Fasano A, Not T, Wang W, Uzzau S, Berti I, Tommasini A, Goldblum SE: Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet* 2000; 355: 1518-1519.
- 28) Clemente MG, De Virgiliis S, Kang JS, Macatagney R, Musu MP, Di Pierro MR, Drago S, Congia M, Fasano A: Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut* 2003; 52: 218-223.
- 29) Bethune MT, Khosla C: Parallels between Pathogens and Gluten Peptides in Celiac sprue. *PLoS Pathogens* 2008; 4, 2: 1-16.
- 30) Sollid LM: Immunology of celiac disease. *International Coeliac Disease Meeting*, Maribor, University Medical Center, 2007; 55-59.

- 31) Crohnova bolezen, Ulcerozni kolitis in Intermediarni kolitis. <http://www.kvcb.si>, dostop 22. 5. 2010
- 32) Nikolaus S, Schreiber S: Diagnostics of Inflammatory Bowel Disease. Gastroenterology 2007; 133: 1670-1689.
- 33) Ocepek A, Skok P: Konične vnetne črevesne bolezni in rak debelega črevesa in danke. Zdravstveni vestnik 2006; 75: II-99-103.
- 34) Masachs M, Casellas F, Malagelada JR: Inflammatory bowel disease in celiac patients. Rev Esp Enferm Dig 2007; 99: 446-450.
- 35) Peyrin-Biroulet L, Chamaillard M: NOD2 and defensins: translating innate to adaptive immunity in Crohn's disease. Journal of Endotoxin Research 2007; 13, 3: 135-139.
- 36) Crohnova bolezen. http://sl.wikipedia.org/wiki/Crohnova_bolezen, dostop 23. 5. 2010
- 37) Veranič P., Romih R, Pšeničnik M: Praktični pouk celične biologije, 1. natis, Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 2003: 12-22; 32-33.
- 38) Freshney RI: Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique, 4th Ed., Wiley-Liss, New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Toronto, Singapore, 2000: 1-521.
- 39) Elli L, Dolfini E, Bardella MT: Gliadin cytotoxicity and in vitro cell cultures. Toxicology Letters 2003; 146: 1-8.
- 40) Batista U: Gojenje sesalskih celic v in vitro pogojih, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 11-17.
- 41) Browning TH, Trier JS: Organ culture of mucosal biopsies of human small intestine. J Clin Invest 1969; 48(8): 1423-1432.
- 42) Krinke GJ: The laboratory rat, Academic Press, San Diego, 2000: 3-27.
- 43) Lukač-Bajalo J, Ungerer R, Hekkens AJM., Van de Biezen E, Hekkens WThJM: Circadian Aspects of In Vitro Culture of Rat Intestinal Rings. J Interdiscipl Cycle Res 1987; 18/4: 243-248.
- 44) Lukač-Bajalo J, Ungerer R, Hekkens WThJM: Circadian measurement of enzyme activity and protein composition of brush borders from rat intestine after in vitro culture. Cronobiol 1987; XIV/2: 199-200.
- 45) 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(4): 241-256.
- 46) Hekkens WThJM, Van Rijen PA, Lukač-Bajalo J, Ungerer R, Rietveld WJ: Influence of a dorsomedial hypothalamus lesion on the circadian changes in the enzyme

- development and activity of intestinal brushborder membranes in the rat. *Chronobiol. int.* 1985; II/2: 103-108.
- 47) Aldhous MC, Shmakov AN, Bode J, Ghosh S: Characterization of conditions for the primary culture of the human small intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 2001; 125: 32-40.
- 48) 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, Medicinski razgledi, 2009; 48, 3: 118.
- 49) 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, Medicinski razgledi, 2009; 48, 3: 119.
- 50) 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: final program, Ljubljana, 2010; [S.l. : s.n.]: 133.
- 51) 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, Medicinski razgledi, 2009; 48, 3: 120.
- 52) Yula Sambruy, Ferruzza S, Ranaldi G, De Angelis I: Intestinal cell culture models. Applications in toxicology and pharmacology. *Cell Biol Toxicol* 2001; 17: 301-317.
- 53) Sambuy Y, de Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati A, Zucco F: The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology* 2005; 21: 1-26.
- 54) Cencic A, Langerholc T: Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology - A review. *International Journal of Food Microbiology* 2010; 141, 1: S4-S14. [doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.026](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.026)
- 55) Quinlan MJ, Yu WY, Horney MA, Tosh D, Slack JMW: In vitro culture of embryonic mouse intestinal epithelium: cell differentiation and introduction of reporter genes. *BMC Developmental Biology* 2006; 24: 1-11.
- 56) Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D: Interna medicina, 3. izdaja, Littera picta, Ljubljana, 2005: 493-496.

- 57) Petrovič D, Zorc M: Histologija – učbenik, Inštitut za histologijo in embriologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2005: 173-178.
- 58) Ross MH, Kaye GI, Wojciech P: Histology, A Text and Atlas With Cell and Molecular Biology, 4th Ed., Williams&Wilkins, Baltimore, Philadelphia, 2004: 475-478; 491-501.
- 59) Ovejero AF, Negri M: Fiziologija človeka, Založba Mladinska knjiga, Ljubljana, 1993: 34-37.
- 60) Krinke GJ: The laboratory rat, Academic Press, San Diego, 2000: 292-293.
- 61) Razlike med prebavnim sistemom človeka in podgane. http://highered.mcgraw-hill.com/sites/0073031216/student_view0/exercise47/digestive_systems.html, dostop 11. 2. 2010
- 62) Prebavni sistem podgane. <http://kentsimmons.uwinnipeg.ca/16cm05/16labman05/lb8pg3.htm>, dostop 11. 2. 2010
- 63) Villi, Crypts and the Life Cycle of Small Intestinal Enterocytes. <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/smallgut.html>, dostop 17. 2. 2010
- 64) The Small Intestine Histology. http://www.courseweb.uottawa.ca/medicine-histology/English/Gastrointestinal/Gastro_Small_Intest.htm, dostop 17. 2. 2010
- 65) Štiblar-Martinčič D, Vraspir-Porenta O, Zorc-Pleskovič R: Histologija, Inštitut za histologijo in embriologijo Medicinske fakultete, Ljubljana, 1998: 110.
- 66) Forrester JM: The number of villi in rat's jejunum and ileum: effect of normal growth, partial enterectomy, and tube feeding. J. Anat. 1972; 2: 283-291.
- 67) Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: Molecular biology of the cell, 4th Ed., GS Taylor&Francis Group, New York, 2002: 1274-1276.
- 68) Barker N, van de Wetering M, Clevers H: The intestinal stem cell, Review. Genes & Development by Cold Spring Harbor Laboratory Press 2008; 22: 1856-1864.
- 69) Potten CS: Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1998; 353: 821-830.
- 70) Potten CS, Loeffler M: Stem cells attributes, cycles spirals, pitfalls and uncertainties- lesons for and from the crypt. Development 1990; 110: 1001-1020.
- 71) Booth C, Potten CS: Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. J. Clin. Invest. 2000; 105(11): 1493-1499.
- 72) Karam SM: Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. Frontiers in Bioscience 1999; 4: 286-298.

- 73) Slorach EM, Campbell FC, Dorin JR: A mouse model of intestinal stem cell function and regeneration. *J Cell Sci* 1999; 112: 3029-3038.
- 74) Yen TH, Wright NA: The gastrointestinal tract stem cell niche. *Stem Cell Reviews and Reports* 2006; 2 (3): 203-212.
- 75) Fasano A, Shea-Donohue T: Mechanisms of Disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. *Gastroenterology & Hepatology* 2005; 2(9): 416-422.
- 76) Keshav S: Paneth cells: leukocyte-like mediators of innate immunity in the intestine. *Journal of Leukocyte Biology* 2006; 80: 500-508.
- 77) Radtke F, Cleuers H, Riccio O: From Gut Homeostasis to Cancer. *Current Molecular Medicine* 2006; 6: 275-289.
- 78) Levin RJ: Digestion and absorption of carbohydrates – from molecules and membranes to humans. *Am J Clin Nutr* 1994; 59: 690S-698S.
- 79) Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Enzyme Nomenclature. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>, dostop 8. 5. 2010
- 80) Lutkić A, Votava A: Enzymic deficiency and malabsorption of food disaccharidases. V (Lee CK, Lindley MG): *Developments in food carbohydrate-3, Disaccharidases* 1982; 183-207.
- 81) Swallow DM, Poulter M, Hollox EJ: Intolerance to Lactose and Other Dietary Sugars. *Drug Metab Dispos* 2001; 29: 513-516.
- 82) Nieminen U, Kahri A, Savilahti E, Färkkilä MA: Duodenal Disaccharidase Activities in the Follow-up of Villous Atrophy in Coeliac Disease. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 507-510.
- 83) Naim HY, Sterchi EE, Lentze MJ: Biosynthesis of the Human Sucrase-Isomaltase Complex. Differential O-glycosylation of the sucrase subunit correlates with its position within the enzyme complex. *J Biol Chem* 1988; 263: 7242-7253.
- 84) 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.
- 85) Lagman JM, Rowland R: Activity of duodenal disaccharidases in relation to normal and abnormal mucosal morphology. *J Clin Pathol* 1990; 43: 537-540.
- 86) Griffin M, Casadio R, Bergamini CM: Transglutaminases: Nature's biological glues. *Biochem J* 2002; 368: 377-396.

- 87) Caputo I, D'Amato A, Troncone R, Auricchio S, Esposito C: Transglutaminase 2 in celiac disease: Minireview article. *Amino Acids* 2004; 26: 381-386.
- 88) Fesus L, Piacentini M: Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *TRENDS in Biochemical Sciences* 2002; 27: 534-539.
- 89) Sakly W, Thomas V, Quash G: A role for tissue transglutaminase in α -gliadin peptide cytotoxicity. *Clinical and Experimental Immunology* 2006; 146: 550-558.
- 90) Lapajne T: Spremljanje aktivnosti lizocima kot celičnega označevalca panethovih celic v kulturah mišjih in podganjih epitelijskih celic tankega črevesa. Diplomska naloga. Ljubljana, 2009.
- 91) Mascotti K, McCullough J, Burger SR: HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. *Transfusion* 2000; 40: 693-696.
- 92) Bradford M: A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-254.
- 93) Dahlqvist A: Assay of Intestinal Disaccharidases. *Anal Biochem*. 1968; 22: 99-107.
- 94) Navodila proizvajalca: Transglutaminase Assay Kit, <http://www.sigmaldrich.com/sigma/bulletin/cs1070bul.pdf>, dostop 9. 11. 2009
- 95) Lidija Boštjančič: Spremljanje celične viabilnosti, proliferacije in aktivnosti maltaze v kulturah mišjih enterocitov. Diplomska naloga. Ljubljana, 2008.
- 96) Eržen A.: Proučevanje vpliva toksičnih peptidov na živost in aktivnost tkivne transglutaminaze v kulturi mišjih enterocitov. Diplomska naloga. Ljubljana, 2009.
- 97) Maiuri L, Luciani A, Villella VR: Lysosomal accumulation of gliadin p31–43 peptide induces oxidative stress and tissue transglutaminase-mediated PPAR γ downregulation in intestinal epithelial cells and coeliac mucosa. *Gut* 2010; 59: 311-319.

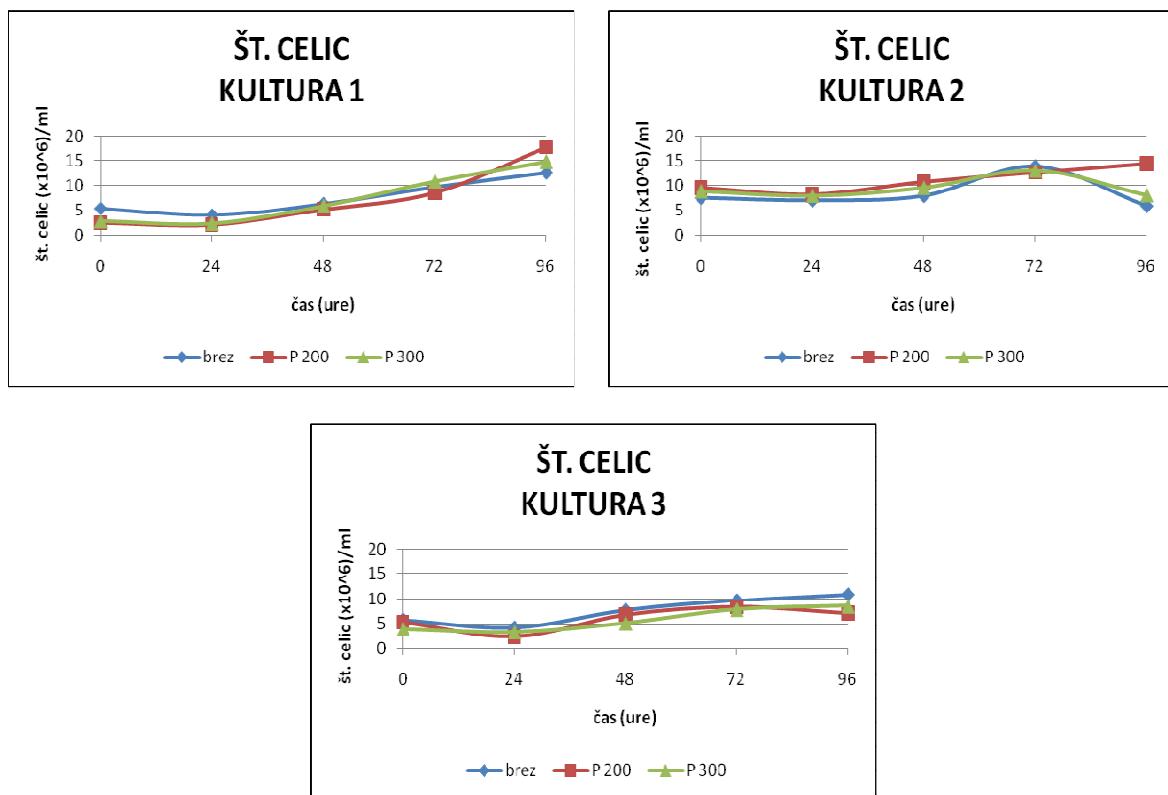
7 PRILOGE

7.1 ŠTEVILLO CELIC, ŽIVOST IN DELEŽ ENTEROCITOVOV V POSAMEZNIH KULTURAH

Preglednica 15: Število celic/mL v posameznih kulturah podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa med 96 urnim kultiviranjem.

| ŠTEVILO CELIC/ mL | | | | | | | | | |
|-------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|-------------------|-------------------|
| Čas (ure) | Kultura1 Brez peptida | Kultura1 P 200 | Kultura1 P 300 | Kultura2 Brez peptida | Kultura2 P 200 | Kultura2 P 300 | Kultura3 Brez peptida | Kultura3 P 200 | Kultura3 P 300 |
| 0 | $5,4 \times 10^6$ | $2,5 \times 10^6$ | $2,8 \times 10^6$ | $7,6 \times 10^6$ | $9,5 \times 10^6$ | $8,8 \times 10^6$ | $5,7 \times 10^6$ | $5,3 \times 10^6$ | $3,9 \times 10^6$ |
| 24 | $4,0 \times 10^6$ | $2,1 \times 10^6$ | $2,3 \times 10^6$ | $7,1 \times 10^6$ | $8,2 \times 10^6$ | $7,9 \times 10^6$ | $4,2 \times 10^6$ | $2,4 \times 10^6$ | $3,3 \times 10^6$ |
| 48 | $6,3 \times 10^6$ | $5,2 \times 10^6$ | $5,9 \times 10^6$ | $8,0 \times 10^6$ | $10,7 \times 10^6$ | $9,5 \times 10^6$ | $7,7 \times 10^6$ | $6,8 \times 10^6$ | $5,1 \times 10^6$ |
| 72 | $9,7 \times 10^6$ | $8,6 \times 10^6$ | $10,8 \times 10^6$ | $13,9 \times 10^6$ | $12,6 \times 10^6$ | $13,0 \times 10^6$ | $9,7 \times 10^6$ | $8,4 \times 10^6$ | $7,8 \times 10^6$ |
| 96 | $12,6 \times 10^6$ | $17,7 \times 10^6$ | $14,8 \times 10^6$ | $6,0 \times 10^6$ | $14,4 \times 10^6$ | $8,0 \times 10^6$ | $10,9 \times 10^6$ | $7,1 \times 10^6$ | $8,5 \times 10^6$ |

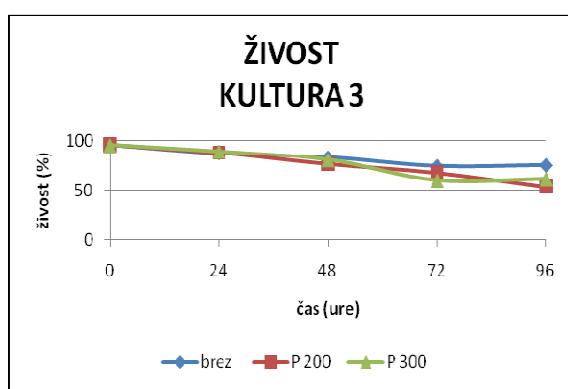
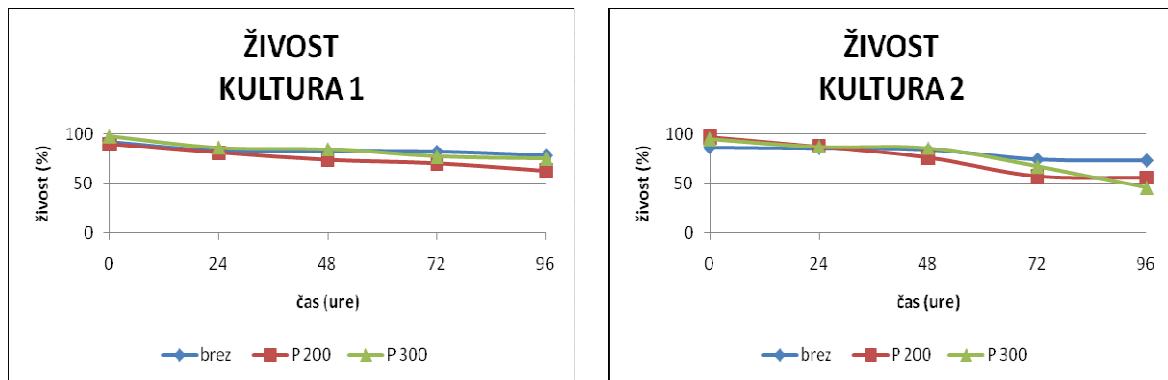
Graf 14: Število celic/mL v posameznih kulturah podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa med 96 urnim kultiviranjem.



Preglednica 16: Živost celic v posameznih kulturah podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa med 96 urnim kultiviranjem.

| ŽIVOST (%) | | | | | | | | | |
|------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|
| Čas (ure) | Kultura1 Brez peptida | Kultura1 P 200 | Kultura1 P 300 | Kultura2 Brez peptida | Kultura2 P 200 | Kultura2 P 300 | Kultura3 Brez peptida | Kultura3 P 200 | Kultura3 P 300 |
| 0 | 91,8 | 89,7 | 97,7 | 86,4 | 96,9 | 94,5 | 95,8 | 95,5 | 95,3 |
| 24 | 83,1 | 80,6 | 86,1 | 85,4 | 87,2 | 86,7 | 87,2 | 87,5 | 88,9 |
| 48 | 82,5 | 73,5 | 84,4 | 83,8 | 75,8 | 85,3 | 83,1 | 76,3 | 80,4 |
| 72 | 81,8 | 70,1 | 77,0 | 74,1 | 57,3 | 66,9 | 74,2 | 67,6 | 59,8 |
| 96 | 77,9 | 62,8 | 74,9 | 73,2 | 55,8 | 45,3 | 75,1 | 53,7 | 61,3 |

Graf 15: Živost celic v posameznih kulturah podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa med 96 urnim kultiviranjem.



Preglednica 17: Delež diferenciranih vilusnih enterocitov v posameznih kulturah podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa med 96 urnim kultiviranjem.

| DELEŽ ENTEROCITOV (%) | | | | | | | | | |
|-----------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|
| Čas (ure) | Kultura1 Brez peptida | Kultura1 P 200 | Kultura1 P 300 | Kultura2 Brez peptida | Kultura2 P 200 | Kultura2 P 300 | Kultura3 Brez peptida | Kultura3 P 200 | Kultura3 P 300 |
| 0 | 15,3 | 15,4 | 18,2 | 14,2 | 16,1 | 12,7 | 18,5 | 16,1 | 15,9 |
| 24 | 18,1 | 22,6 | 22,2 | 12,7 | 13,6 | 12,3 | 15,5 | 12,5 | 13,9 |
| 48 | 16,7 | 20,6 | 18,8 | 11,5 | 12,1 | 11,9 | 13,6 | 11,2 | 10,2 |
| 72 | 14,9 | 12,1 | 11,1 | 10,9 | 10,2 | 11,7 | 12,2 | 9,2 | 8,2 |
| 96 | 11,9 | 10,3 | 10,2 | 9,7 | 9,6 | 8,7 | 16,9 | 6,0 | 11,3 |

Graf 16: Delež diferenciranih vilusnih enterocitov v posameznih kulturah podganjih epitelijskih celic ozkega črevesa med 96 urnim kultiviranjem.

