

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KARMEN WECHTERSBAH

**POSTAVITEV IMUNOCITOKEMIČNE METODE ZA
DOLOČANJE DELEŽA APOPTOTIČNIH CELIC V
CITOLOŠKIH VZORCIH OČESNE VEZNICE**

**IMMUNOCYTOCHEMICAL ASSESSMENT OF
APOPTOSIS IN CYTOLOGY SAMPLES OF
CONJUNCTIVAL EPITHELIUM**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ
LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo sem opravljala na Inštitutu za patologijo, Medicinske fakultete v Ljubljani, pod mentorstvom prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm. in somentorice mag. Irene Srebotnik-Kirbiš.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju in somentorici za izkazano strokovno pomoč in nasvete pri opravljanju magistrske naloge. Prav tako se zahvaljujem najbližjim za spodbudo in podporo v času študija.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelala samostojno pod vodstvom mentorja prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm. in somentorice mag. Irene Srebotnik-Kirbiš.

Ljubljana, april 2016

Mentor: prof. dr. Borut Božič

Somentorica: mag. Irena Srebotnik Kirbiš

Predsednica komisije: prof. dr. Marija Sollner Dolenc

Član komisije: doc. dr. Simon Žakelj

KAZALO

1	UVOD	1
1.1	APOPTOZA	1
1.1.1	Ekstrinzična pot aktivacije apoptoze.....	2
1.1.2	Intrinzična pot aktivacije apoptoze.....	2
1.2	PAKLITAKSEL	3
1.3	HUMANA CELIČNA LINIJA RAKA MATERNIČNEGA VRATU (HeLa).....	4
1.4	GLAVKOM.....	4
1.4.1	Očesna veznica	5
1.4.2	Benzalkonijev klorid (BAK) in apoptoza	6
1.5	ANALITIČNE METODE ZA DOLOČANJE DELEŽA APOPTOTIČNIH CELIC ..	7
1.5.1	Molekulski označevalci apoptoze	7
1.5.2	Imunocitokemična metoda (ICK metoda).....	7
1.5.3	Metoda TUNEL (TdT-mediated-dUTPX nick end labeling)	8
2	NAMEN DELA	9
3	MATERIALI IN METODE	10
3.1	MATERIALI	10
3.1.1	Laboratorijska oprema	10
3.1.2	Reagenti	11
3.1.3	Raztopine	12
3.2	PREISKOVANCI	13
3.3	METODE.....	14
3.3.1	Odvzem vzorcev očesne veznice	14
3.3.2	Gojenje celic HeLa in indukcija apoptoze.....	14
3.3.3	Priprava citospinov iz celičnih suspenzij celične linije HeLa in celic očesne veznice.....	15
3.3.4	Imunocitokemično določanje deleža apoptotičnih celic	16
3.3.5	Ocena deleža celic s pozitivno imunocitokemično reakcijo	18
3.3.6	Določanje deleža apoptotičnih celic z metodo TUNEL (TdT-mediated-dUTPX nick end labeling).....	18
3.4	STATISTIČNA ANALIZA.....	19

4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	20
4.1	UGOTAVLJANJE UPORABNOSTI IMUNOCITOKEMIČNEGA DOLOČANJA APOPTOTIČNIH CELIC NA EKSPERIMENTALNEM MODELU HUMANE CELIČNE LINIJE	20
4.2	IMUNOCITOKEMIČNO DOLOČANJE DELEŽA APOPTOTIČNIH CELIC V CITOLOŠKIH VZORCIH OČESNE VEZNICE BOLNIKOV Z GLAVKOMOM.....	25
5	SKLEPI.....	30
6	LITERATURA.....	31
PRILOGE		

POVZETEK

Glavkom je skupina bolezni, ki povzročajo okvaro optičnega živca in brez zdravljenja lahko vodijo v slepoto. Najpogostejši vzrok za nastanek glavkoma je povišan očesni tlak. Za zadovoljivo znižanje očesnega tlaka je potrebna topična terapija z uporabo več vrst kapljic, ki najpogosteje vsebujejo konzervans benzalkonijev klorid (BAK). Številne raziskave so pokazale, da BAK povzroča vnetne spremembe očesne površine in apoptozo celic očesne veznice. Vpliv BAK-a na apoptozo celic je odvisen od njegove koncentracije in časa delovanja.

Namen naše raziskave je bilo ugotoviti zanesljivost imunocitokemične metode za določanje deleža apoptotičnih celic najprej na eksperimentalnem modelu humane celične linije raka materničnega vratu HeLa in nato še na kliničnih vzorcih očesne veznice bolnikov z glavkomom. Zanimalo nas je, ali je za ta namen bolj primerno imunocitokemično določanje antigena M30 (s kaspazami razcepljenega citokeratina 18) ali razcepljene kaspaze 3.

Z različnimi koncentracijami paklitaksela (0,5, 5 in 50 mM) smo inducirali apoptozo celic HeLa. Po 12, 24 in 48 urah smo na standardno pripravljenih citospinih z imunocitokemično metodo določili delež celic, ki vsebujejo antigen M30 (s kaspazami razcepljen citokeratin 18) in razcepljeno kaspazo 3. Rezultate smo primerjali z deležem celic, ki imajo fragmentirano DNA (metoda TUNEL). Iz kliničnih vzorcev očesne veznice bolnikov z glavkomom smo na enak način pripravili citospine in z imunocitokemično metodo določili delež celic, ki vsebujejo antigen M30 in razcepljeno kaspazo 3. Primerjali smo rezultate med skupino bolnikov z glavkomom z in brez topične antiglavkomske terapije.

Na eksperimentalnem modelu humane celične linije HeLa smo ugotovili, da tako z metodo TUNEL kot tudi z imunocitokemičnim določanjem antigena M30 in razcepljene kaspaze 3, zaznamo naraščanje deleža apoptotičnih celic s časom izpostavljenosti različnim koncentracijam paklitaksela (M30: $\bar{x}_{12(50\text{mM})} = 35\%$, $\bar{x}_{24(50\text{mM})} = 75,75\%$, $\bar{x}_{48(50\text{mM})} = 79,5\%$; razcepljena kaspaza 3: $\bar{x}_{12(50\text{mM})} = 28\%$, $\bar{x}_{24(50\text{mM})} = 41\%$, $\bar{x}_{48(50\text{mM})} = 40,75\%$; TUNEL: $\bar{x}_{12(50\text{mM})} = 7,5\%$, $\bar{x}_{24(50\text{mM})} = 70\%$, $\bar{x}_{48(50\text{mM})} = 78\%$).

Vzorci očesne veznice smo s štetkanjem celic očesne veznice odvzeli 80 preiskovancem, od katerih je 27 predstavljalo kontrolno skupino pacientov z glavkomom brez topične terapije (15 žensk s povprečno starostjo 66 let in 12 moških s povprečno starostjo 55 let) ter 53 bolnikov z glavkomom (32 žensk, povprečna starost 71 let in 21 moških, povprečna starost 72 let), ki uporabljajo topično terapijo z vsebnostjo BAK-a vsaj 6 mesecev. Med obema skupinama preiskovancev smo z Mann-Whitney U testom ugotovili značilne razlike le v deležu apoptotičnih celic, ki izražajo antigen M30 ($p_{\text{M30}} = 0,014$, $p_{\text{r-kaspaza 3}} = 0,362$).

Naša raziskava je potrdila, da na eksperimentalnem modelu humane celične linije raka materničnega vratu HeLa lahko z imunocitokemičnim določanjem antigena M30 in razcepljene kaspaze 3 zanesljivo določamo delež apoptotičnih celic. Za določanje deleža apoptotičnih celic v vzorcih očesne veznice pa je primerno le imunocitokemično določanje antigena M30.

ABSTRACT

Glaucoma is a group of ocular disorders resulting in optic nerve damage which can cause blindness if not treated. A major risk factor is increased ocular pressure. The most effective treatment for lowering ocular pressure involves one or more topical antiglaucoma medications which are mostly preserved with benzalkonium chloride (BAK). Many studies have shown that BAK causes ocular inflammation and apoptosis of conjunctival epithelial cells. The mode of BAK-induced cell death is time and dose dependent.

The aim of our study was to evaluate immunocytochemical detection of cleaved caspase 3 and antigen M30 (caspase-cleaved cytokeratin 18) for the assessment of apoptosis first on cytopins prepared from human HeLa cell line used as an experimental model and then on cytopins prepared from conjunctival epithelium of glaucoma patients with and without topical antiglaucoma therapy.

Apoptosis of HeLa cells was induced by different concentrations of paclitaxel (0,5, 5 and 50 mM). After 12, 24 and 48 hours of incubation the percentage of antigen M30 and cleaved caspase 3 positive HeLa cells was assessed by immunocytochemistry on cytopins. Results were compared with percentage of cells with fragmented DNA (TUNEL method).

The same protocol for immunocytochemical detection of antigen M30 and cleaved caspase 3 was used on cell samples of conjunctival epithelium. The percentages of M30 and cleaved caspase 3 positive cells were compared between group of patients with glaucoma using topical antiglaucoma medications and group of patients with no therapy.

Results on HeLa cell line showed that TUNEL method as well as immunocytochemical method using antibodies that specifically recognize cleaved caspase 3 and antigen M30, can detect increase in percentage of apoptotic cells dependend on time exposed to different concentration of paclitaxel (M30: $\bar{x}_{12(50mM)} = 35\%$, $\bar{x}_{24(50mM)} = 75,75\%$, $\bar{x}_{48(50mM)} = 79,5\%$; cleaved caspase 3: $\bar{x}_{12(50mM)} = 28\%$, $\bar{x}_{24(50mM)} = 41\%$, $\bar{x}_{48(50mM)} = 40,75\%$; TUNEL: $\bar{x}_{12(50mM)} = 7,5\%$, $\bar{x}_{24(50mM)} = 70\%$, $\bar{x}_{48(50mM)} = 78\%$).

Samples of conjunctival epithelial cells were obtained with brush cytology from 80 patients of which 27 represented control group of patients with glaucoma and no therapy (15 women, mean age of 66 years and 12 men, mean age 55 years) and 53 patients with glaucoma using eye drops preserved with benzalkonium chloride at least for 6 months (32 women, mean age 71 years and 21 men, mean age 72 years). By using Mann-Whitney U test we found statistically significant differences in percentage of apoptotic cells expressing antigen M30 ($p_{M30} = 0,014$, $p_{\text{cleaved caspase 3}} = 0,362$) between tested groups of patients.

Our study showed that immunocytochemical detection of antigen M30 and cleaved caspase 3 can be used for detection of apoptosis on a human HeLa cell line used as an experimental model. However on clinical samples of conjunctival epithelium only immunocytochemical detection of antigen M30 proved to be specific marker of apoptosis.

SEZNAM OKRAJŠAV

antigen M30- s kaspazami razcepljen citokeratin 18

BAK- benzalkonijev klorid

BSA- goveji serumski albumin

HeLa- humana celična linija raka materničnega vratu

ICK metoda - imunocitokemična metoda

PBS- fosfatni pufer

PEG- polietilen glikol

r-kaspaza 3- razcepljena kaspaza 3

1 UVOD

1.1 APOPTOZA

Apoptoza je programirana celična smrt, potrebna za normalen razvoj organizma in ohranjanje homeostaze tkiv tekom življenja. Je pomemben proces v embrionalnem razvoju, normalni delitvi celic ter razvoju in delovanju imunskega sistema. Glavna funkcija apoptoze je odstranjevanje celic, ki lahko škodujejo delovanju organizma. Napake v procesu apoptoze lahko povzročijo nevrodegenerativne bolezni, ishemične okvare, avtoimunske bolezni in različne vrste rakov (1, 2).

Proces, ki prav tako vodi v celično smrt, je nekroza. Nekroza nastane kot posledica obsežne okvare celice zaradi različnih fizikalnih in kemijskih povzročiteljev (hipoksije, ishemije, napačnega delovanja komplementa, okužbe). Poškodovana celica ne more uravnavati količine vode in ionov (natrijevi in kalcijevi ioni prehajajao nekontrolirano v celico), kar povzroči njeno nabrekanje. Celica razpade in izloči vsebino v zunajcelični prostor, kar povzroči aktivacijo mediatorjev vnetja in s tem vnetje okolišnjega tkiva. Nekroza celic lahko vodi v propadanje tkiva (3, 4).

Za proces apoptoze pa so značilne drugačne morfološke spremembe in različni biokemični mehanizmi, ki se kažejo kot skrčenje celice, kolaps citoskeleta, kondenzacija jedrnega kromatina in razpad kromatina na fragmente. Celična površina tvori mehurčke in celica razpade na s celično membrano obdane fragmente, imenovane apoptotična telesa. Površina apoptotične celice se kemijsko spremeni, zaradi česar jih makrofagi v njihovi bližini prepoznajo in fagocitirajo. Negativno nabit fosfolipid fosfatidilserin, ki se nahaja na notranji strani lipidnega dvosloja, se v procesu apoptoze premakne na zunanjo stran celične membrane in s tem omogoči makrofagom prepoznavanje apoptotičnih celic. Od fosfatidilserina odvisna fagocitoza apoptotične celice prepreči, da bi fagocitne celice tvorile citokine (5).

Za proces apoptoze je značilna znotrajcelična proteolitična kaskada, katere ključni encimi so cisteinske proteaze, imenovane kaspaze, ki cepijo peptidno verigo za aminokislino aspartatom (2). Kaspaze se v celici sprva sintetizirajo kot neaktivni proencimi, imenovani prokaspaze, ki se aktivirajo po proteolitičnem cepljenju. Prokaspaza se v zgodnji fazi apoptoze razcepi na malo in veliko podenoto, ki skupaj tvorita tetramer. Slednji predstavlja aktivirano kaspazo, ki cepi drugo prokaspazo, kar sproži nadaljni proces proteolitične kaskade. Prokaspaze, ki so v procesu apoptoze odgovorne za začetek proteolitične kaskade,

se imenujejo sprožitvene kaspaze (kaspaza 2, 8, 9, 10). Ko se aktivirajo, cepijo in aktivirajo ostale izvrševalne kaspaze (kaspaza 3, 6, 7).

Apoptoza poteka po dveh signalnih poteh: ekstrinzični ali izvencelično aktivirani ter intrinzični ali preko mitohondrijev posredovani (5).

1.1.1 Ekstrinzična pot aktivacije apoptoze

Izvencelični signalni proteini z vezavo na membranske receptorje sprožijo ekstrinzično pot apoptoze. Membranski receptorji so transmembranski proteini, ki imajo izvencelično ligand-vezavno domeno, eno transmembransko domeno in znotrajcelično »smrtno« domeno, ki aktivira apoptozo. Receptorji so trimeri in spadajo v skupino tumor nekrotizirajočih faktorjev (TNF). Najpomembnejši receptorji, ki so odgovorni za sprožitev apoptoze, so TNFR in Fas. Ligandi, ki se vežejo na receptorje smrti, so TNF, FasL in TRAIL (5). Vezava ligandov na receptorje smrti povzroči konformacijske spremembe receptorja in vezavo Fas-povezane smrtne domene (FADD) s kaspazo 8 v smrt-inducirajoči signalni kompleks (DISC). Z vezavo pride do cepljenja in aktivacije kaspaze 8, ki nato cepi in aktivira kaskado izvrševalnih kaspaz, kot so kaspaza 3, kaspaza 6 in kaspaza 7 (6).

1.1.2 Intrinzična pot aktivacije apoptoze

Apoptoza se lahko aktivira znotrajcelično kot odziv na poškodbo ali stres (radiološko sevanje, virusne infekcije, toksini, vpliv radikalov, poškodba DNA, pomanjkanje kisika, hranil) (5). Intrinzična pot aktivacije apoptoze se začne s sprostitvijo citokroma c ter aktivatorjev kaspaz, kot so prokaspaza-aktivirajoči protein Apaf1, Hsp10, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 in endonukleaze G iz intermembranskega prostora mitohondrijev (7). Citokrom c preide iz intermembranskega prostora mitohondrija v citosol, kjer se veže na prokaspaza-aktivirajoči protein Apaf1, kar povzroči oligomerizacijo slednjega v apoptosom. Apaf1 protein v apoptosomu aktivira sprožitveno kaspazo 9, ki nato aktivira kaskado izvrševalnih kaspaz (kaspazo 3, kaspazo 6 in kaspazo 7), ki inducirajo apoptozo (5).

Poškodba DNA običajno aktivira tumor supresorski gen p53, ki sproži transkripcijo genov odgovornih za kodiranje proteinov iz družine Bcl-2, ki vplivajo na izločanje citokroma c iz mitohondrijev. Proteini iz družine Bcl-2 proteinov so znotrajcelični proteini, ki regulirajo

aktivacijo prokaspaz. Bcl-2 in Bcl-XL inhibirata apoptozo s preprečevanjem izločanja citokroma c iz mitohondrijev. Ostali proteini, kot so Bad, Bax, Bak in Bid, apoptozo sprožijo. Druga skupina znotrajceličnih regulatorjev apoptoze so iz družine inhibitorjev apoptoze. Ti proteini zavirajo apoptozo na dva načina: vežejo se na določene prokaspaze in zavirajo njihovo aktivacijo ali pa se vežejo na kaspaze in zavirajo njihovo delovanje (5).

Permeabilizacija zunanje mitohondrijske membrane lahko vodi tudi v od kaspaz neodvisno apoptozo preko aktivacije apoptoza-inducirajočega faktorja (AIF) in endonukleaze G. AIF preide v citosol in nato v jedro, kjer se veže na DNA in povzroči kondenzacijo kromatina ter fragmentacijo DNA (8).

1.2 PAKLITAKSEL

Paklitaksel je eden izmed pogosto uporabljenih kemoterapevtikov, ki sprožijo proces apoptoze (9). Je diterpen, izoliran iz lubja iglavca Western yew (*Taxus brevifolia*), ki raste na področju Severne Amerike (10). Uporaba paklitaksela je usmerjena predvsem v zdravljenje malignih epitelijskih tumorjev (11). Paklitaksel je antimitotični faktor, ki se specifično veže na mikrotubule in povzroči stabilizacijo mikrotubulne dinamike. Receptorji celičnih membran in citoplazemski receptorji s paklitakselom ne interagirajo (12). Mikrotubuli so sestavljeni iz tubulinskih heterodimerov, s katerimi so v dinamičnem odnosu, ki je ključen za njihovo delovanje (13). Paklitaksel se veže na amino terminalno skupino 31 aminokislin velike beta podenote tubulina in vpliva na tvorbo mikrotubulov tako, da jih stabilizira z zmanjšanjem kritične koncentracije mikrotubulnega proteina, potrebnega za sestavo mikrotubulov. Interakcija paklitaksela s celico tako povzroči nastanek snopov stabilnih mikrotubulov. Glede na stehiometrijo vezave paklitaksela na mikrotubule slednji različno zavira dinamiko mikrotubulne nestabilnosti. Vrsta mikrotubulov, ki so najbolj občutljivi na delovanje paklitaksela, so delitvena vretena. Paklitaksel zavira celično replikacijo pri evkariontih, in sicer zavira celični cikel v pozni fazi G2 mitoze. S paklitakselom inducirana apoptoza poteka po intrinzični poti, vendar pa so specifični mehanizmi slednje slabo raziskani (9, 14). Paklitaksel lahko sproži različne signalne poti, ki vodijo v apoptozo. Spremembe celic po dodatku paklitaksela so odvisne od koncentracije in časa izpostavljenosti slednjemu. Tretiranje celic z nizko koncentracijo paklitaksela (od 10 do 100 nM) zavira mikrotubulno dinamiko in tako prepreči delovanje delitvenih vreten v mitози. Posledica tega je prekinitev celičnega cikla v fazi G₂/M, kar

sproži apoptozo preko aktivacije p34 in fosforilacije proteina Bcl-2. Pri daljšem tretiranju celic (nekaj ur), so celice lahko podvržene nenormalni mitozii in postanejo večjedrne. Ob tem pride do poškodbe DNA, kar vodi v aktivacijo tumor supresorskega gena p53 in posledično apoptozo. Tretiranje celic z višjimi koncentracijami paklitaksela (od 0,2 do 30 μM) povzroči obsežno okvaro mikrotubulov in vpliva na regulacijo ekspresije genov (Bak, Bax, TNF- α) ter aktivacijo kinaz kot npr. JNK/SAPK, p34 itd., kar vodi v aktivacijo kaspaz in posledično apoptozo (12).

1.3 HUMANA CELIČNA LINIJA RAKA MATERNIČNEGA VRATU (HeLa)

Humana celična linija raka materničnega vratu (HeLa) je prva nesmrtna humana celična linija izolirana v 50. letih prejšnjega stoletja iz cervikalnega raka bolnice Henriette Lacks. Celice HeLa so vzgojili v laboratoriju in ugotovili, da imajo za razliko od zdravih človeških celic, ki se delijo od 40 do 50-krat, sposobnost neskončne delitve. V 24 urah se je njihovo število podvojilo. Za razliko od normalne človeške celice, ki ima 46 kromosomov, ima HeLa celica 82 mutiranih kromosomov. Vzrok za odstopanje od normalne delitve je okužba s HPV, ki je vzrok za večino rakov materničnega vratu. Posledica okužbe s HPV je inaktivacija p53 proteina, ki v normalnih celicah zavira nastanek mutacij in delitev rakavih celic. HeLa celična linija je do danes najbolj uporabljena celična linija v raziskovalne namene. Uporablja se za preučevanje biokemijskih procesov zdravih in obolelih tkiv, cepiv, zdravil, vplivov sevanja in toksičnih snovi (15, 16).

Ker so celice HeLa vrsta epiteljskih celic tako kot celice očesne veznice, katerih apoptozo bomo določali, nam HeLa celice predstavljajo ustrezen eksperimentalni model za preučevanje apoptoze inducirane s paklitakselom. Raziskave so pokazale, da paklitaksel sproži apoptozo celične linije HeLa že pri nizkih koncentracijah in da se njegov učinek povečuje s časom delovanja (17).

1.4 GLAVKOM

Glavkom je skupina bolezni, za katere je značilna napredujoča optična nevropatija z značilnimi morfološkimi spremembami na papili in v plasti retinalnih živčnih vlaken in/ali izpadi v vidnem polju. Je eden izmed najbolj pogostih vzrokov slepote na svetu.

Najpogostejši je primarni glavkom odprtega zakotja, ki predstavlja 90 % vseh vrst glavkomov. Dejavniki tveganja za nastanek glavkoma odprtega zakotja so povečan očesni tlak zaradi slabega odtekanja očesne tekočine (prekatne vodke) iz očesa, starost, pozitivna družinska anamneza za glavkom v ožjem družinskem krogu, visoka kratkovidnost in očesna poškodba. Zdravljenje glavkoma je osredotočeno na znižanje očesnega tlaka z zdravili ali laserskim posegom. Izsledki velikih randomiziranih kliničnih raziskav so potrdili, da znižanje očesnega tlaka pri primarnem glavkomu odprtega zakotja upočasni ali ustavi napredovanje okvare (18). Bolniki z glavkomom morajo dolgotrajno jemati eno ali več vrst očesnih kapljic, ki ali zmanjšajo nastajanje prekatne vodke v očesu ali povečajo njeno odtekanje iz očesa, nekatere pa lahko delujejo tudi na oba načina. Najpogosteje kapljice za zdravljenje glavkoma vsebujejo konzervans benzalkonijev klorid (BAK), za katerega so ugotovili, da je toksičen za očesno površino (19).

1.4.1 Očesna veznica

Očesna veznica prekriva sprednjo površino očesa do roženice, kjer prehaja v roženični epitel. Prekriva notranjo stran vek in beločnico. Delimo jo na limbus, ki meji na roženico, bulbarno veznico, ki prekriva zrklo, forniks ali prehodno gubo očesne veznice in tarzalno veznico, ki prekriva notranjo stran veke (Slika 1). Očesna veznica je sestavljena iz dveh plasti: epitelijske in strome. Epitelij sestavljajo dve ali več plasti ploščatega epitelijskega epitelija, čašaste celice, melanociti, Langerhansove celice in vnetnice. Epiteljske celice so med sabo povezane preko dezmosomov. Pod slojem epiteljskih celic se nahaja stroma, ki jo sestavljajo mastociti, plazmatke, limfociti in nevtrofilci ter kolagenska vlakna, elastična vlakna, žile in živci. Očesna veznica je ena izmed najbolj imunološko aktivnih tkiv očesne površine. Čašaste celice proizvajajo mucine, ki preprečujejo sušenje očesa in delujejo protimikrobno. Epiteljske celice očesne veznice predstavljajo mehansko bariero pred mikroorganizmi in toksini (20).



Slika 1: Deli očesne veznice: 1- limbus, 2- bulbarna veznica, 3- forniks ali prehodna guba očesne veznice, 4- tarzalna veznica

1.4.2 Benzalkonijev klorid (BAK) in apoptoza

Benzalkonijev klorid (BAK) je detergent in kvarтерна amonijeva sol. Zaradi širokega antimikrobnega delovanja in njegovega učinka na medcelične stike je eden izmed najbolj uporabljenih konzervansov v oftalmoloških preparatih za zdravljenje suhega očesa in glavkoma (21). Žal pa so številne eksperimentalne in klinične raziskave pokazale, da BAK vpliva na stabilnost solznega filma, povzroča izgubo čašastih celic, nekrozo in apoptozo celic očesne veznice. Ugotovili so, da so opisane spremembe povezane s slabšim uspehom operacije glavkoma. Zaradi negativnih učinkov BAK-a na celice očesne veznice je potrebna previdnost predvsem pri njegovi dolgotrajni uporabi (19, 22). In vitro raziskave na celičnih kulturah očesne veznice so pokazale apoptotičen učinek BAK-a že pri zelo nizkih koncentracijah. Z naraščanjem koncentracije BAK-a se je povečevalo tudi število apoptotičnih celic (23). Indukcija humane celične linije epitelijskih celic očesne veznice z BAK-om lahko povzroči od kaspaz odvisno apoptozo s sprostitvijo citokroma c iz mitohondrija (intrinzična pot aktivacije apoptoze). BAK lahko sproži apoptozo tudi preko od kaspaz neodvisne apoptotične poti tako, da inducira sproščanje AIF iz mitohondrijev, ki potujejo v jedro, kjer se vežejo na DNA in povzročijo kondenzacijo kromatina ter fragmentacijo DNA (8).

1.5 ANALITIČNE METODE ZA DOLOČANJE DELEŽA APOPTOTIČNIH CELIC

1.5.1 Molekulski označevalci apoptoze

Molekulski označevalci apoptoze so prokaspaze, aktivirane kaspaze in njihovi substrati. Aktivirane kaspaze se določa z različnimi metodami, kot so prenos po Westernu, imunoprecipitacija ter imunohistokemična in imunocitokemična metoda. Med pogosto uporabljenimi označevalci apoptoze je aktivirana oziroma razcepljena kaspaza 3 (r-kaspaza 3), ki se aktivira po intrinzični ali ekstrinzični poti (24). Kaspaza-3 se aktivira po proteolitičnem cepljenju prokaspaze v dve podenoti (p17 in p12). Za cepljenje je potrebna aspartamska kislina na mestu P1. R-kaspaza 3 je ena izmed najbolj specifičnih indikatorjev procesa apoptoze. Nahaja se v citoplazmi apoptotičnih celic ter posameznih morfološko zdravih celicah, ki predstavljajo populacijo celic v zgodnjih fazah apoptoze, ko pride do aktivacije kaspaze 3 (25). Substrati kaspaz, ki so specifični za epiteljske celice v apoptozi, so s kaspazami razcepljeni citokeratini 18 (antigen M30). V procesu apoptoze izvrševalne kaspaze, med katerimi je tudi aktivirana kaspaza 3, na mestu 238 in 396 cepijo aspartamsko kislino. Novo nastali epitop je selektivni označevalec apoptoze, saj ga ne moremo določiti v vitalnih in nekrotičnih epiteljskih celicah (26, 27). Posebnost citokeratinov 18 je, da se kljub cepitvi v začetni fazi apoptoze ohranijo v obliki filamentov in se v kasnejših fazah apoptoze reorganizirajo v granularno obliko (25).

1.5.2 Imunocitokemična metoda (ICK metoda)

ICK metoda se uporablja za identifikacijo antigenov, ki so značilni za določeno bolezen ali proces v celici. Reakcije se izvajajo na celicah, ki so nanešene na objektna stekla – citospinih. Osnova ICK metode je vezava protitelesa na antigen. Lahko je direktna ali indirektna z uporabo različnih označevalcev (fluorokromi, encimi). Pri indirektni ICK metodi vezavi primarnega protitelesa na antigen sledi vezava označenega sekundarnega protitelesa na primarno protitelo. Če je sekundarno protitelo označeno s fluorokromom, je njegova vezava na primarno protitelo v imunskem kompleksu vidna pod fluorescentnim ali konfokalnim mikroskopom. Lahko pa je sekundarno protitelo biotinilirano, čemur sledi vezava streptavidina konjugiranega z encimom (hrenova peroksidaza) na sekundarno protitelo. Po dodatku substrata (vodikov peroksid) in kromogena (3-amino-9-etilkarbazol ali 3,3'-diaminobenzidin) se v encimski reakciji tvori obarvan produkt, ki se nahaja na

mestu nastanka imunskega kompleksa. Pozitivna reakcija je vidna pod svetlobnim mikroskopom.

1.5.3 Metoda TUNEL (TdT-mediated-dUTPX nick end labeling)

Metoda TUNEL je osnovna in najbolj razširjena metoda za določanje celic v apoptozi. V pozni fazi apoptoze se aktivirajo endonukleaze, ki razrežejo jedrno DNA na kratke fragmente dolžine 50-300 baznih parov, ki imajo izpostavljene 3'OH proste konce. V encimski reakciji s terminalno deoksinukleotidil transferazo se na proste 3'OH konce vežejo s fluorokromom označeni nukleotidi. Delež celic s fragmentirano DNA se nato detektira s pretočnim citometrom, ELISA metodo, in situ hibridizacijo ali indirektno imunofluorescenčno metodo.

Slabost metode TUNEL je, da z njo lahko določimo tudi fragmente DNA nekrotičnih celic. Na lažno pozitiven rezultat lahko vpliva tudi delovanje endogenih endonukleaz. Poleg tega z metodo TUNEL lahko določimo le delež celic v kasnejših fazah apoptoze, za katero je značilna fragmentacija jedrne DNA (28).

2 NAMEN DELA

Namen našega dela je ugotoviti zanesljivost imunocitokemičnega določanja deleža apoptotičnih celic v vzorcih očesne veznice. Ugotoviti nameravamo, ali je bolj primerno imunocitokemično določanje antigena M30 ali r-kaspaze 3. Najprej bomo prilagodili postopek imunocitokemičnega določanja deleža apoptotičnih celic na standardno pripravljenih citospinih iz humane celične linije HeLa. Po indukciji apoptoze celic HeLa s tremi različnimi koncentracijami raztopine paklitaksela bomo primerjali imunocitokemično ugotovljen delež apoptotičnih celic z rezultati metode TUNEL. Uporabnost imunocitokemičnega določanja apoptotičnih celic, oblikovano na eksperimentalnem modelu celične linije HeLa, bomo preizkusili na citospinih pripravljenih iz vzorcev očesne veznice bolnikov z glavkomom. Z ustrezno statistično analizo bomo ugotovili, ali z imunocitokemičnim določanjem antigena M30 in r-kaspaze 3 lahko določimo razliko v deležu apoptotičnih celic med skupino bolnikov z glavkomom brez terapije in skupino bolnikov z glavkomom, ki prejemajo topično terapijo z vsebnostjo BAK-a.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Laboratorijska oprema

- pipete, Eppendorf
- nastavki za pipete, Gilson
- brezprašna komora, Iskra PIO
- inkubator Heracell, Thermo
- 50 ml epruvete, Eppendorf
- centrifuga, Thermo
- petrijeve plošče, Cell TC Dishes Sarstedt Numbrecht
- sterilna laboratorijska steklovina
- sistem za sterilizacijo s filtracijo
- 0,22 µm filter, Millipore Stericup
- 100 ml plastični lončki z vakuumom, BD Vacutainer
- 5 ml steklene epruvete za vakuumski odvzem krvi, BD Vacutaine
- Pasteurjeve pipete PLASTIBRAND, Brand
- centrifuga PLC-322, Tehnica Železniki
- citocentrifuga Cytospin 4, Shandon
- kovinske sponke Cytoclip slide clip, Shandon
- plastične komore za vzorec, Shandon
- filtri za citocentrifugo, Shandon
- objektna stekla s peskanim delom 76x26 mm, Thermo Scientific
- merilni valj
- ščetke za ginekološki bris, METALOPLAST, d.o.o.
- aparat Benchmark XT , Roche Ventana
- 1,5 ml epruvete, Eppendorf
- stojala za epruvete, Eppendorf
- mešalec, Tehnica
- krovna stekelca 24x32 mm, Thermo Scientific
- svetlobni mikroskop, Nikon ECLIPSE E200

- pretočni citometer BD FACSCanto™, BD Biosciences
- centrifuga Sigma 4K10
- hladilnik
- CO₂ inkubator, MCO-19AICUVH-PE, PANASONIC

3.1.2 Reagenti

- 200 mM raztopina L-glutamina, Gibco
- 5% vol/vol raztopina fetalnega govejega seruma, Gibco
- Pan penig sodium (penzilpenicilin sodium), koncentracija v gojišču 100 000 U/l, Panpharma
- Garamycin, koncentracija v gojišču 50 mg/l, Krka
- Paclitaxel 300 mg/50 ml, FRESenius KABI
- 0,25% raztopina tripsina z EDTA v Hansovem pufru , Gibco
- fosfatni pufer (PBS), Merck
- NaCl
- KH₂PO₄
- NaOH
- Na₂CO₃
- EDTA-Kompleksal III
- BSA (goveji serumski albumin), SERVA
- Penicilin (Crystacillin 1 000 000 IE), Pliva
- Garamicyn, 80 mg/2ml, Krka
- metanol, Merck
- polietilen glikol, SIGMA
- anestetične kapljice za oko Alcaine, Alcon
- 96% etanol, KEFO
- 100% etanol, J.T.Baker
- ksilen, SIGMA ALDRICH
- 30 % vodikov peroksid, Merck
- demineralizirana in sterilizirana voda
- mišje monoklonsko protitelo proti razcepljenemu citokeratinu 18, M30 CytoDEATH, 50 testov, Roche, razredčitev 1:20

- poliklonsko protitelo r-kaspaza 3, Cleaved Caspase-3 (Asp175) Antibody, 300 µl, Cell Signalling Technology, razredčitev 1:50
- reagenti detekcijskega sistema streptavidin-biotin peroksidaza, iView™ DAB detection kit, Ventana Medical System, Roche
- barvilo hematoksilin : Hematoxylin, Ventana Medical System, Roche
- barvilo za pomodritev jeder: Bluing reagent, Ventana Medical System, Roche
- raztopina za redčenje protiteles : Antibody diluent, Ventana Medical System, Roche
- pufer za spiranje: Reaction Buffer (10X), Ventana Medical System, Roche
- medij za pokrivanje preparatov: Coverslipping resin, 500 ml, Tissue-Tek, SAKURA
- encimska raztopina (terminalna deoksinukleotidil transferaza), Roche
- nukleotidi označeni s FITC, Roche
- deoksiribonukleaza I, Fermentas
- 4% paraformaldehid v PBS pH=7,4
- 0,1% Triton 100 , SigmaAldrich

3.1.3 Raztopine

Celični medij

Osnovne raztopine:

- PBS, pH 7,15: 8,5 g NaCl in 1,36 g KH₂PO₄ smo raztopili v 95 ml bidestilirane H₂O, uravnali pH na 7,15 z 2N NaOH in dopolnili do 100 ml
- 5% EDTA: 2,5 g EDTA smo raztopili v 50 ml bidestilirane H₂O
- 20% BSA: 20 g BSA smo raztopili v 100 ml bidestilirane H₂O
- penicilin: Crystacillin 1000000 IE smo raztopili v 4 ml destilirane H₂O

Končna raztopina:

PBS smo razredčili z vodo do 300 ml v razmerju 1:10, dodali 40 ml 5% EDTA in 100 ml BSA. Z nasičeno raztopino Na₂CO₃ smo uravnali pH na 6,8 in dodali 180 µl (22000 IE) penicilina ter 50 µl garamicina. Celični medij smo filtrirali skozi 0,22 µm filter in ga s pomočjo lončka z vakuumom pod sterilnimi pogoji prenesli v 5 ml steklene epruvete.

10% raztopina polietilen glikola (PEG) v metanolu

Postopek:

1. poljubno količino PEG-a smo segreli v vodni kopeli, dokler se ni utekočnil
2. utekočinjenemu PEG-u smo dodali enako količino redestilirane vode
3. zmešali smo 45 ml metanola in 5 ml osnovne raztopine PEG

3.2 PREISKOVANCI

Raziskavo z naslovom Očesna površina in glavkom je izvedla Očesna klinika Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani v sodelovanju z Inštitutom za patologijo, Medicinske fakultete v Ljubljani. Raziskava je bila odobrena s strani Komisije RS za medicinsko etiko (številka odobritve raziskave je 72/02/14). V raziskavo je bilo vključenih 80 bolnikov z glavkomom, ki so izpolnili vprašalnik o pogostosti očesnih težav, sledil je klinični pregled, merjenje očesnega tlaka, pregled očesnega ozadja in odvzem vzorcev očesne veznice.

Preiskovance smo razdelili v dve skupini:

A: testna skupina 53 bolnikov z glavkomom, ki uporabljajo topično terapijo z BAK-om vsaj 6 mesecev (32 žensk, povprečna starost 71 let in 21 moških, povprečna starost 72 let)

B: kontrolna skupina 27 bolnikov z glavkomom, ki ne prejemajo topične terapije (15 žensk s povprečno starostjo 66 let in 12 moških s povprečno starostjo 55 let)

Izključitveni kriteriji v obeh skupinah so bili:

1. prisotnost aktivnega očesnega vnetja, alergije
2. spremembe na vekah (npr. neravni robovi, lagofthalmos)
3. refraktivna operacija, od katere je minilo manj kot 1 leto
4. zapora nazolakrimalne poti
5. vstavev čepkov v punktume
6. nosečnost ali dojenje
7. prisotnost sistemske bolezni, ki vpliva na izločanje solz
8. spremembe zdravil v zadnjih 30 dneh, ki vplivajo na izločanje solz (antihistaminiki, antidepresivi, diuretiki, kortikosteroidi)
9. nosilci kontaktnih leč
10. starost manj kot 18 let

3.3 METODE

3.3.1 Odvzem vzorcev očesne veznice

Vzorci očesne veznice so bili odvzeti na Očesni kliniki Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani. Po aplikaciji anestetičnih kapljic je oftalmolog s ščetko odluščil celice s spodnje prehodne gube očesne veznice (Slika 2). Ščetko z odluščenimi celicami je takoj potopil v epruveto s celičnim medijem in nežno mešal 30 sekund, da so se celice iz ščetke odluščile.



Slika 2: Ščetkanje spodnje prehodne gube očesne veznice

3.3.2 Gojenje celic HeLa in indukcija apoptoze

Celično linijo HeLa smo gojili v gojišču Advanced MEM (Gibco), ki smo mu dodali penicilin, gentamicin, L-glutamin in fetalni goveji serum. Celice smo gojili 24 ur na petrijevih ploščah s površino 150 cm², v inkubatorju pri temperaturi 37 °C in vlažni atmosferi s 5% CO₂. V eksponentni fazi rasti smo celice izpostavili raztopini paklitaksela. Uporabili smo 3 različne koncentracije (0,5 mM, 5 mM, 50 mM), s katerimi smo inkubirali celice v gojišču 12, 24 in 48 ur (Preglednica 1). Celice HeLa, ki smo jih gojili v istih časovnih intervalih brez dodatka paklitaksela, smo uporabili kot kontrolo. Po končanem gojenju smo celice na gojišču sprali s fosfatnim pufrom, jih ločili od podlage z dodatkom

0,25% tripsina z EDTA v Hanksovem pufru in prenesli v epruvete. S centrifugiranjem smo odstranili medij s tripsinom in celice prenesli v celični medij. Tako pripravljeno celično suspenzijo smo uporabili za metodo TUNEL in izdelavo citospinov. Postopek smo ponovili na dveh neodvisno gojenih serijah celic HeLa.

Preglednica 1: Inkubacija celic HeLa z različnimi koncentracijami paklitaksela

Koncentracija paklitaksela (mM)	Čas inkubacije (h)
0- kontrola	12/24/48
0,5	12/24/48
5	12/24/48
50	12/24/48

3.3.3 Priprava citospinov iz celičnih suspenzij celične linije HeLa in celic očesne veznice

Postopek:

1. ustrezno označena objektna stekelca smo skupaj s filtri za citocentrifugo in plastičnimi komorami speli s kovinskimi sponkami (Slika 4) in vstavili v citocentrifugo (Slika 3)
2. v plastične komore smo odpipetirali 100 μ L celične suspenzije in centrifugirali 4 min z RCF 107,8 x g
3. po končanem centrifugiranju smo citospine prenesli v metanol in jih v njem fiksirali 24 ur
4. naslednji dan smo citospine zaščitili z 10 % raztopino PEG-a v metanolu, jih posušili na zraku in shranili na sobni temperaturi



Slika 3: Citocentrifuga



Slika 4: Plastična komora s filter papirjem v kovinski sponki

3.3.4 Imunocitokemično določanje deleža apoptotičnih celic

Za imunocitokemično določanje deleža apoptotičnih celic smo uporabili monoklonsko protitelo M30, ki prepozna s kaspazami razcepljen citokeratin 18 in poliklonsko protitelo r-kaspazo 3, ki se veže na aktivirano oziroma razcepljeno kaspazo 3. Celoten postopek je potekal v aparatu BenchmarkTM XT (Ventana Medical System, Roche) (Slika 5). Za detekcijo in prikaz vezave primarnega protitelesa na mesto antigena smo uporabili analizni komplet iViewTM DAB Detection kit (Ventana Medical System, Roche) (Slika 6).

Postopek:

1. pripravljene citospine smo inkubirali v metanolu 30 min in tako odstranili zaščitni sloj PEG-a
2. endogene peroksidaze smo blokirali z inkubacijo citospinov v 5% H₂O₂ v metanolu 5 min ter sprali z demineralizirano vodo
3. imunocitokemična reakcija je potekala po vnaprej izbranem protokolu v aparatu BenchmarkTM XT (Ventana Medical System, Roche), izjemoma pipetiranja primarnega protitelesa, po naslednjem postopku:
 - 3.1 spiranje s komercialno pripravljenim pufrom

- 3.2 ročno pipetiranje razredčenih primarnih, neoznačenih monoklonskih protiteles proti s kaspazami razcepljenemu citokeratinu 18 in poliklonskih protiteles proti r-kaspazi 3
 - 3.3 spiranje nevezanih primarnih protiteles s pufrom
 - 3.4 vezava sekundarnega, z biotinom vezanega protitelesa
 - 3.5 spiranje sekundarnih protiteles s pufrom
 - 3.6 vezava hrenove peroksidaze konjugirane s streptavidinom
 - 3.7 spiranje nevezanega encima s pufrom
 - 3.8 vezava substrata vodikovega peroksida, kromogena 3,3'-diaminobenzidina ter bakra
 - 3.9 spiranje s pufrom
 - 3.10. dodatek barvila hematoksilin in barvila za pomodritev jeder
4. po zaključenem postopku smo preparate sprali v topli vodi z detergentom, dehidrirali v alkoholih naraščajoče koncentracije (96% in 100% etanolu), bistrili v ksilenu ter jih pokrili z medijem za pokrivanje in krovnim stekelcem.



Slika 5: Aparat Benchmark XT, Roche Ventana



Slika 6: Reagenti analiznega kompleta

3.3.5 Ocena deleža celic s pozitivno imunocitokemično reakcijo

Delež celic s pozitivno imunocitokemično reakcijo sva s svetlobnim mikroskopom pri 400-kratni povečavi neodvisno ocenjevali dve izkušeni ocenjevalki. Na citospinih, pripravljenih iz celic HeLa, sva v naključno izbranih vidnih poljih prešteli 200 celic in število pozitivnih celic izrazili kot delež pozitivnih celic na 100 celic (%). Na citospinih pripravljenih iz kliničnih vzorcev očesne veznice sva prešteli vse celice v preparatu in število pozitivnih celic izrazili kot delež pozitivnih celic na 100 celic (%).

3.3.6 Določanje deleža apoptotičnih celic z metodo TUNEL (TdT-mediated-dUTPX nick end labeling)

Z metodo TUNEL smo določali delež fragmentirane jedrne DNA v apoptotičnih celicah HeLa. Iz vsakega vzorca smo odpipetirali 1 ml celične suspenzije v epruvete za izvedbo metode TUNEL. Delež fragmentirane jedrne DNA smo detektirali s pretočnim citometrom po predhodnem tretiranju celic z modificiranimi nukleotidi v encimski reakciji s terminalno deoksinukleotil transferazo, ki je katalizirala polimerizacijo fluorescenčno označenih nukleotidov na proste 3'OH konce.

Postopek:

1. v petrijevko smo prenesli 400 μ L celične suspenzije $C=1 \times 10^7$ cel/ml, dodali 450 μ L fiksacijske raztopine (4% paraformaldehid) in pustili 60 min na mešalniku
2. spirali smo s 450 μ L PBS
3. dodali smo 450 μ L PBS in pustili čez noč v hladilniku
4. centrifugirali smo 5 min z RCF 521x g
5. dodali smo 1 ml PBS in vzorec razdelili v 3 epruvete, v vsako po 300 μ L, ki so predstavljale pozitivno kontrolo, negativno kontrolo in merjeni vzorec s celicami HeLa
6. v epruvete smo dodali 600 μ L permeabilizacijske raztopine (Triton 0,1%), inkubirali 3 min, centrifugirali 5 min z RCF 521x g in nato odlili supernatant
7. v pozitivno kontrolo smo dodali DNazo (1U/ml) in inkubirali pri 37°C v CO₂ inkubatorju 30 min
8. negativno kontrolo in vzorec smo pustili 30 min v hladilniku

9. po inkubaciji smo pozitivno kontrolo sprali s 450 μ L PBS in centrifugirali 5 min z RCF 521x g
10. v epruvete s pozitivno kontrolo in vzorcem smo dodali 50 μ L reakcijske mešanice, ki smo jo pripravili iz 5 μ L encimske raztopine terminalne deoksinukleotidil transferaze in 45 μ L s FITC označenih nukleotidov
11. v negativno kontrolo smo dodali 50 μ L s FITC označenih nukleotidov
12. vzorce smo inkubirali 60 min pri 37°C v CO₂ inkubatorju, jih sprali s 450 μ L PBS in centrifugirali 5 min z RCF 521x g
13. na usedlino smo dodali 200 μ L PBS, premešali epruvete in izvedli detekcijo fragmentirane DNA s pretočnim citometrom
14. rezultate smo podali kot delež celic, ki imajo fragmentirano DNA

3.4 STATISTIČNA ANALIZA

Rezultate o povprečnih deležih celic HeLa v apoptozi smo prikazali tabelarično (Preglednica A v Prilogi) in grafično z linijskimi diagrami s pomočjo programa Excel 2011. Prav tako smo s programom Excel 2011 izračunali povprečne vrednosti deležev celic očesne veznice v apoptozi (Preglednica C v Prilogi). Da bi ugotovili, ali se porazdelitev povprečnih vrednosti deležev apoptotičnih celic očesne veznice značilno razlikuje od normalne, smo uporabili Shapiro-Wilk-ov test. Statistično značilne razlike med povprečnimi vrednostmi deležev celic očesne veznice v apoptozi, ki izražajo r-kaspazo 3 ali antigen M30, smo med skupinama preiskovancev ugotavljali z Mann-Whitney U testom. Slednji predpostavlja nenormalno porazdelitev neodvisnih vzorcev in primerja porazdelitev povprečnih rangov med dvema skupinama. Razlika povprečnih rangov dveh neodvisnih vzorcev je statistično značilna, če je $p \leq 0,05$. Mann-Whitney U test za neodvisna vzorca smo izvedli s pomočjo računalniškega programa SPSS 23.0 (IBM, Chicago, ZDA).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

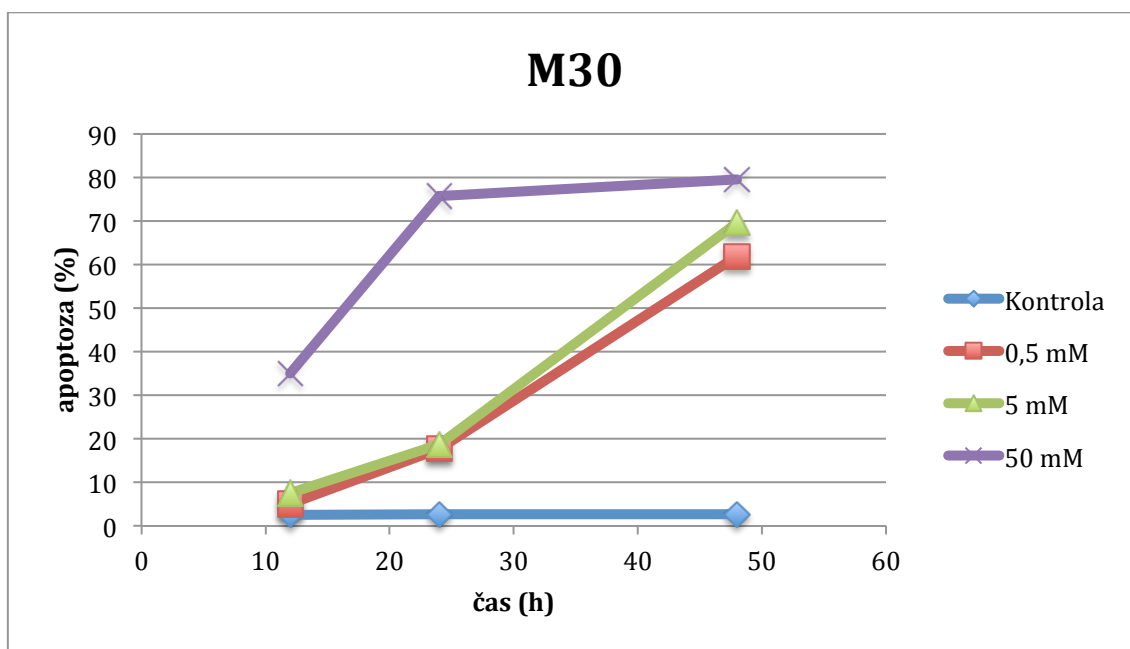
Namen magistrske naloge je bil postavitev metode za imunocitokemično določanje deleža apoptotičnih celic v vzorcih očesne veznice. V ta namen smo zanesljivost imunocitokemičnega določanja dveh za apoptozo značilnih proteinov (razcepljeno kaspazo 3 in s kaspazami razcepljen citokeratin 18) najprej določili na eksperimentalnem modelu humane celične linije raka na materničnem vratu (HeLa). Na osnovi primerjave rezultatov imunocitokemičnega določanja antigenov z rezultati metode TUNEL, smo nameravali ugotoviti upravnost ICK metode za določanje deleža apoptotičnih celic v vzorcih očesne veznice pacientov z glavkomom brez in s topično terapijo.

4.1 UGOTAVLJANJE UPORABNOSTI IMUNOCITOKEMIČNEGA DOLOČANJA APOPTOTIČNIH CELIC NA EKSPERIMENTALNEM MODELU HUMANE CELIČNE LINIJE

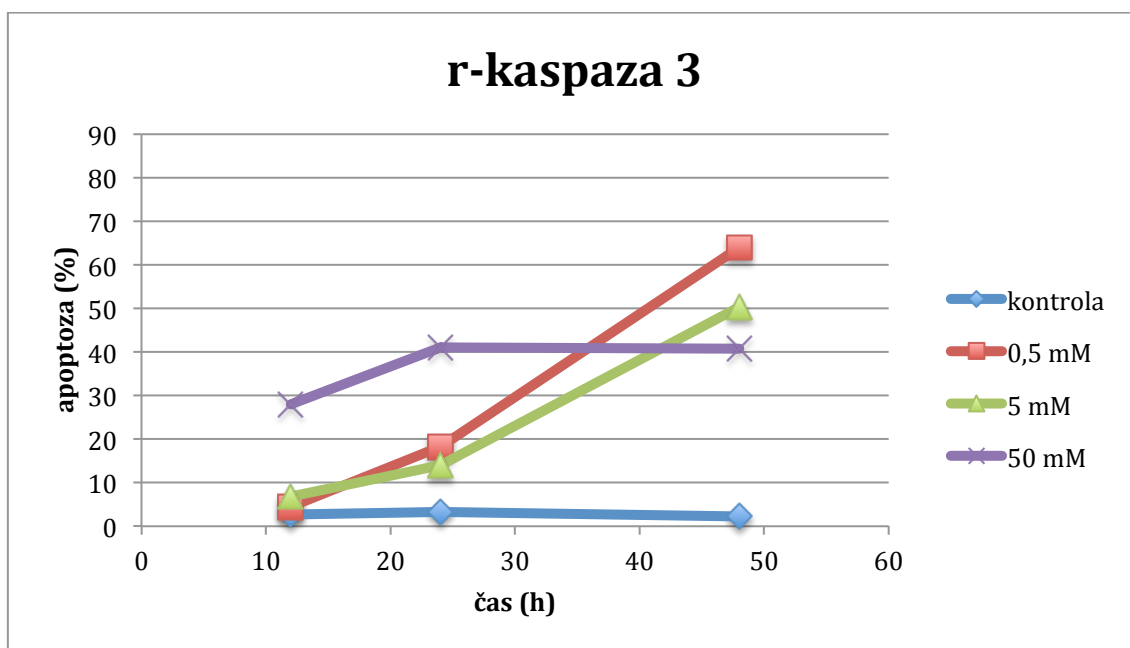
Rezultate imunocitokemičnega določanja antigena M30, r-kaspaze 3 in deleža fragmentirane DNA (metoda TUNEL) na vzorcih celične linije HeLa smo prikazali z linijskimi diagrami. Delež celic, ki izražajo antigen M30, je s časom izpostavljenosti različnim koncentracijam paklitaksela naraščal in po 48 urah dosegel najvišjo vrednost (Slika 7). V kontrolnih vzorcih je bil delež apoptotičnih celic zelo majhen in s časom rasti v gojišču ni naraščal.

Naraščanje deleža celic v apoptozi smo ugotovili tudi z imunocitokemičnim določanjem antigena r-kaspaze 3. Po 24 in 48 urah indukcije z 0,5 mM koncentracijo paklitaksela smo določili višji delež celic v apoptozi kot po indukciji s 5 mM koncentracijo paklitaksela (Slika 8). Pri indukciji apoptoze z najvišjo koncentracijo paklitaksela (50 mM) pa je bil delež celic, ki izražajo r-kaspazo 3, po 12 in 24 urah višji in po 48 urah indukcije nižji kot pri indukciji apoptoze z nižjima koncentracijama paklitaksela (0,5 in 5 mM). V kontrolnih vzorcih, ki niso bili inducirani s paklitakselom, je bil delež apoptotičnih celic nizek.

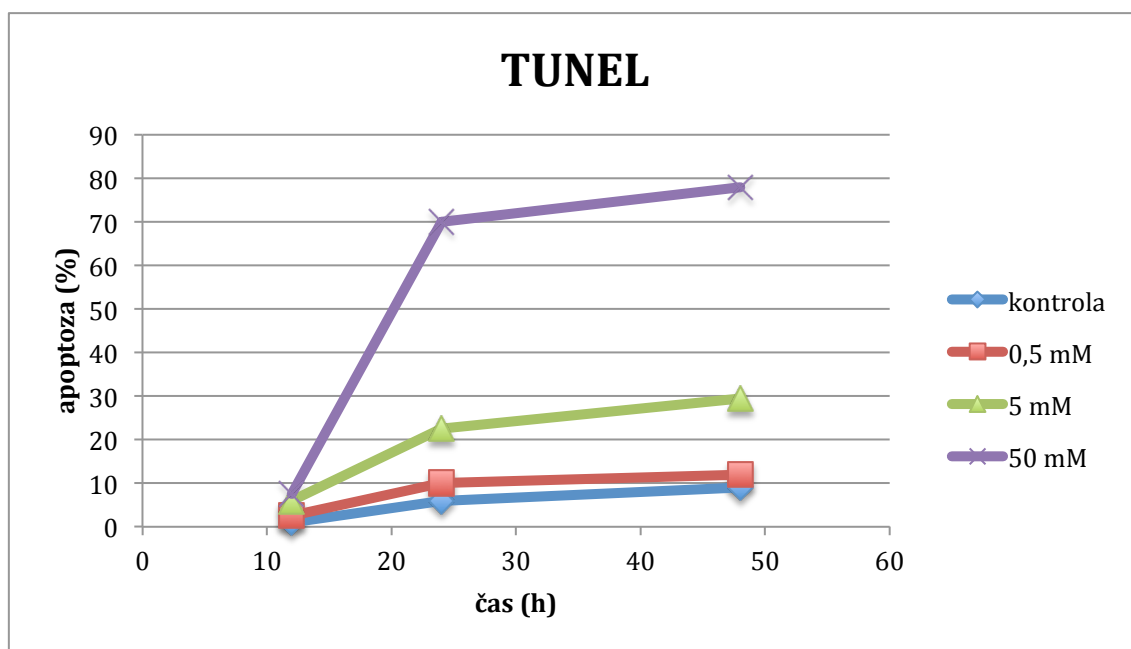
Z metodo TUNEL smo ugotovili, da je delež celic s fragmentirano DNA pri nizkih koncentracijah paklitaksela naraščal počasi. Pri najvišji koncentraciji paklitaksela pa je bil delež celic s fragmentirano DNA po 24 in 48 urah visok in je dosegel podobne deleže kot pri imunocitokemičnem določanju antigena M30 (Slika 9). V kontrolnih vzorcih je bil delež celic s fragmentirano DNA nizek.



Slika 7: Deleži celic HeLa, ki izražajo antigen M30, brez dodatka paklitaksela (kontrola) in po 12, 24 in 48 urah indukcije apoptoze z različnimi koncentracijami paklitaksela (0,5, 5 in 50 mM)



Slika 8: Deleži celic HeLa, ki izražajo antigen r-kaspazo 3, brez dodatka paklitaksela (kontrola) in po 12, 24 in 48 urah indukcije apoptoze z različnimi koncentracijami paklitaksela (0,5, 5 in 50 mM)



Slika 9: Deleži celic HeLa s fragmentirano DNA (TUNEL) brez dodatka paklitaksela (kontrola) in po 12, 24 in 48 urah indukcije apoptoze z različnimi koncentracijami paklitaksela (0,5, 5 in 50 mM)

V našem poskusu na humani celični liniji HeLa smo ugotovili, da vsi trije kazalci apoptoze (delež celic s fragmentirano DNA ter delež celic, ki izražajo antigen M30 in r-kaspazo3), naraščajo s koncentracijo paklitaksela in časom izpostavljenosti slednjemu.

Iz rezultatov metode TUNEL smo ugotovili, da po indukciji celične linije HeLa s paklitakselom, z metodo TUNEL določimo naraščanje celic v apoptozi, vendar pa je delež celic s fragmentirano DNA visok v bolj napredovanih fazah apoptoze, ko pride do obilnejše fragmentacije DNA.

Podobno kot mi so naraščanje v deležu apoptoze na celični liniji HeLa po indukciji s paklitakselom z metodo TUNEL določali tudi Kyung in sodelavci. Za razliko od našega eksperimenta so celice tretirali le s 50 μ M koncentracijo paklitaksela in določali delež celic s fragmentirano DNA po 12, 24 in 48 urah. Tako kot mi so ugotovili, da je delež pozitivnih celic s časom izpostavljenosti paklitakselu naraščal (29).

Delež fragmentirane DNA so na celičnih linijah Ishikawa in HeLa preučevali tudi Ponayiotis in sodelavci. Celice so inducirali z nizko koncentracijo paklitaksela (10 nM) ter prav tako določali delež fragmentirane DNA v različnih časih. Po 24 urah indukcije je bil rezultat TUNEL metode negativen. Po 48 urah so določili nizek delež fragmentirane DNA, ki pa je z daljšanjem izpostavitve paklitakselu naraščal. Po 72 urah so bile skoraj vse celice z metodo TUNEL pozitivne (30).

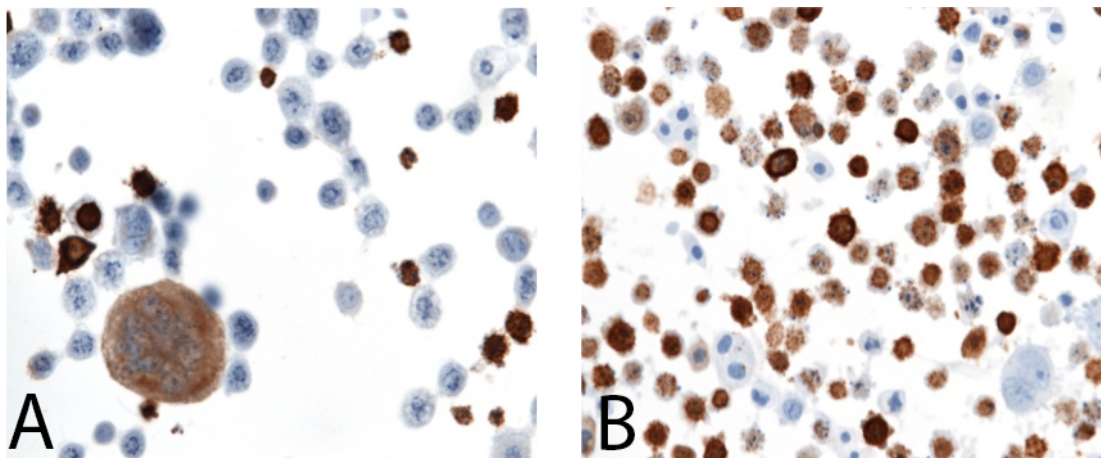
Tako kot z metodo TUNEL, ki je standardna in najbolj uveljavljena metoda za določanje apoptoze, smo tudi z ICK metodo lahko določili razlike v naraščanju deleža apoptoze. Kot bolj uporaben označevalec apoptoze se je izkazal antigen M30. Z indukcijo celične linije z naraščajočimi koncentracijami paklitaksela smo ugotovili tudi naraščanje deleža celic, ki izražajo antigen M30. Tak rezultat lahko obrazložimo s tem, da se protitelo proti M30 v procesu apoptoze specifično veže na novo nastali epitop s kaspazami razcepljenega citokeratina 18 v epitelijskih celicah, med katere sodijo tudi celice HeLa in celice očesne veznice. Poleg tega se protitelo proti M30 uporablja izključno za določanje apoptotičnih celic, ne pa tudi živih in nekrotičnih celic, kar predstavlja prednost pred TUNEL metodo, s katero lahko določimo tudi fragmentirano DNA nekrotičnih celic (25).

Čeprav se cepljenje citokeratina 18 zgodi v začetnih fazah apoptoze in pred fragmentacijo DNA, ki je značilna za kasnejše faze apoptoze, iz naših rezultatov vidimo, da z imunocitokemičnim določanjem antigena M30 lahko določimo visok delež celic v apoptozi tudi takrat, ko je deleže celic s fragmentirano DNA visok. Iz tega sklepamo, da z ICK metodo lahko določimo antigen M30 tudi v napredovanih fazah apoptoze.

Izražanje antigena M30 v procesu apoptoze so preučevali tudi Leers in sodelavci. Ugotovili so, da se v začetnih fazah apoptoze citokeratini 18 kljub proteolitičnem cepljenju kaspaz ohranijo v citoplazmi v obliki filamentov. Z napredovanjem apoptoze se kot posledica fosforilizacije reorganizirajo v granularne strukture. Zaradi te lastnosti se epitop antigena M30 ohrani tudi v naprednejših fazah apoptoze, izjemoma končne faze apoptoze, ko pride do izgube epitopa (27).

Podobno so ugotovili tudi Grassi in sodelavci. Preučevali so izražanje antigena M30 v apoptotičnih hepatocitih. Ugotovili so, da je bila reakcija z antigenom M30 pozitivna takrat, ko je bil rezultat metode TUNEL negativen in tudi, ko je bil rezultat TUNEL metode pozitiven. Tako so potrdili prisotnost antigena ne le v začetnih, ampak tudi kasnejših fazah apoptoze (31).

Prikaz imunocitokemične reakcije z antigenom M30 na citospinih celične linije HeLa



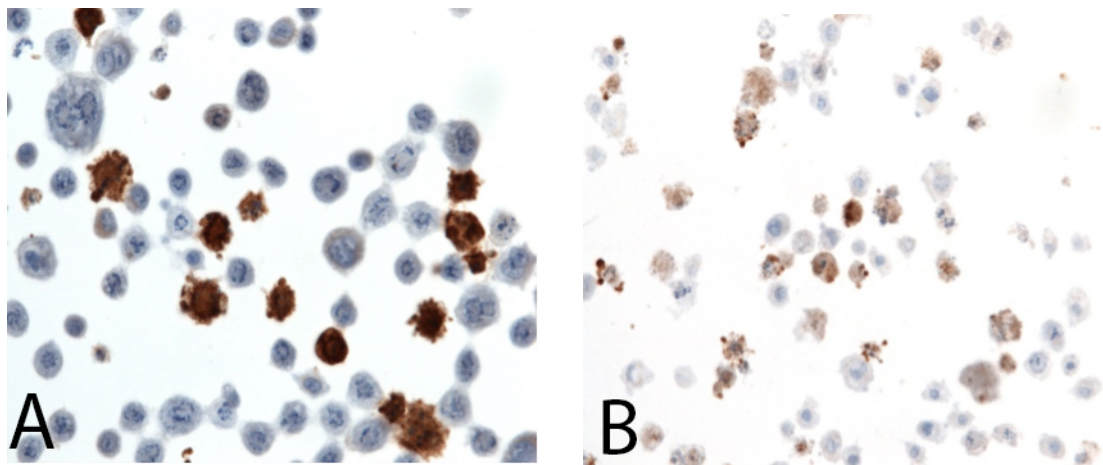
Slika 10: Pozitivna imunocitokemična reakcija z antigenom M30 na citospinih, pripravljenih iz celic HeLa, po 24 urah indukcije apoptoze s 5 mM koncentracijo paklitaksela (A); pozitivna imunocitokemična reakcija z antigenom M30 na citospinih, pripravljenih iz celic HeLa, po 24 urah indukcije apoptoze s 50 mM koncentracijo paklitaksela.

Na sliki 10 A vidimo, da je imunocitokemična reakcija z antigenom M30 prisotna v posameznih celicah HeLa, ki imajo že močno skrčeno citoplazmo kot tudi v celici, kjer morfoloških sprememb značilnih za apoptozo še ni videti. Tako sklepamo, da antigen M30 lahko določimo v celicah v začetnih fazah apoptoze kot tudi v fazah, ko je proces apoptoze napredovan. Na sliki 10 B številne celice izražajo za apoptozo značilne morfološke spremembe kot so skrčenje citoplazme in nastanek apoptotičnih teles.

Poleg imunocitokemičnega določanja antigena M30 nas je zanimalo, kolikšen delež celic HeLa v apoptozi lahko določimo z r-kaspazo 3. Ugotovili smo, da smo pri vseh koncentracijah paklitaksela in v vseh časih indukcije določili naraščanje v deležu celic v apoptozi, izjemoma po 48 urah indukcije z najvišjo koncentracijo paklitaksela, ko porasta v deležu apoptoze nismo več zaznali. Iz rezultatov sklepamo, da je r-kaspaza dober označevalec apoptoze v fazah, ko do obilnejše fragmentacije DNA še ne pride.

Tak rezultat lahko razložimo s tem, da je cepljenje kaspaze 3 značilno v začetnih fazah apoptoze, vendar pa se antigen r-kaspaze 3 za razliko od antigena M30 ne ohrani v citoplazmi celic tudi v napredovanih fazah apoptoze.

Prikaz imunocitokemične reakcije z r-kaspazo 3 na citospinih celične linije HeLa



Slika 11: Pozitivna imunocitokemična reakcija z r-kaspazo 3 na citospinih, pripravljenih iz celic HeLa, po 24 urah indukcije apoptoze s 5 mM koncentracijo paklitaksela (A); pozitivna imunocitokemična reakcija z r-kaspazo 3 na citospinih, pripravljenih iz celic HeLa, po 24 urah indukcije apoptoze s 50 mM koncentracijo paklitaksela (B).

Slika 11 A prikazuje močno pozitivno reakcijo z r-kaspazo 3 v apoptotičnih celicah, ki imajo skrčeno in uvihano citoplazmo. Na sliki 11 B vidimo, da so celice morfološko bolj spremenjene kot na sliki 11 A, citoplazma celic je bolj skrčena in intenzivnost pozitivne reakcije je šibkejša. Tak rezultat je lahko posledica tega, da je imunocitokemična reakcija z r-kaspazo 3 manj intenzivna v apoptotičnih celicah, katerih morfološke spremembe značilne za apoptozo so bolj napredovane.

4.2 IMUNOCITOKEMIČNO DOLOČANJE DELEŽA APOPTOTIČNIH CELIC V CITOLOŠKIH VZORCIH OČESNE VEZNICE BOLNIKOV Z GLAVKOMOM

V skladu s kriteriji za vključitev v študijo je bilo na Očesni kliniki Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani odvzetih 80 vzorcev očesne veznice. V skupino bolnikov z glavkomom, ki uporabljajo kapljice z BAK-om, je bilo v testno skupino vključenih 53 preiskovancev ter v kontrolno skupino 27 bolnikov z glavkomom brez terapije. Spol in starost preiskovancev ter terapija so prikazani v Preglednici B v Prilogi. Na citospinih smo z ICK metodo določili delež celic, ki izražajo antigen M30 in r-kaspazo 3. Povprečne vrednosti celic s pozitivno imunocitokemično reakcijo so za posamezen vzorec prikazane v Preglednici C v Prilogi.

Da bi ugotovili, ali je porazdelitev podatkov normalna (Gaussova), smo uporabili Shapiro-Wilk-ov test.

Preglednica 2: Značilnosti povprečnih deležev apoptotičnih celic v kontrolnih vzorcih in vzorcih bolnikov s topično terapijo, ki izražajo antigen M30 in r-kaspazo 3

	kontrolna skupina (%M30)	testna skupina (%M30)	kontrolna skupina (%r-kasp. 3)	testna skupina (% r-kasp. 3)
N	27	53	27	53
povprečna vrednost ± SE	0,03 ± 0 ,01	0,09 ± 0,21	0,09 ± 0,04	0,28 ± 0,16
min.-maks. vrednost	0,00 - 0,20	0,00 - 0,85	0,00 - 1,00	0,00 - 8,85
SD	0,06	0,15	0,21	1,21

Legenda: N: število vzorcev, SE: standardna napaka, SD: standardna deviacija

Preglednica 3: Ugotavljanje porazdelitve povprečnih vrednosti deležev celic očesne veznice v apoptozi, ki izražajo r-kaspazo 3 in antigen M30, med skupinama preiskovancev s Shapiro-Wilk-ovim testom

	kontrolna skupina (% M30)	testna skupina (% M30)	kontrolna skupina (%r-kaspaza 3)	testna skupina (%r-kaspaza 3)
N	27	53	27	53
p vrednost	p< 0,001 (S)	p< 0,001 (S)	p< 0,001 (S)	p< 0,001 (S)

Legenda: N: število vzorcev, p≤ 0,05: razlika v porazdelitvi podatkov glede na normalno porazdelitev je značilna.

S pomočjo Shapiro-Wilk-ovega testa smo ugotovili, da je p< 0,001 tako za kontrolne vzorce kot tudi vzorce bolnikov s topično terapijo, ki izražajo antigen M30 in r-kaspazo-3. Povprečne vrednosti deležev apoptotičnih celic se v kontrolnih vzorcih kot tudi vzorcih bolnikov s terapijo, ne porazdeljujejo normalno.

Za nadaljno statistično analizo smo uporabili Mann-Whitney U test, ki je neparametrični test in neparametrična varianta parametričnega Studentovega t-testa za normalno

porazdeljene neodvisne vzorce. Mann-Whitney U test primerja razlike v rangih neodvisnih vzorcev, ki se ne porazdeljujejo normalno in testira razliko v obliki ter razpršenosti podatkov med dvema skupinama (32). Z Mann-Whitney U testom smo nameravali ugotoviti, ali med kontrolnimi vzorci in vzorci bolnikov s topično terapijo obstajajo značilne razlike v deležu apoptotičnih celic, ki izražajo antigena M30 in r-kaspazo 3.

Preglednica 4: Primerjava povprečnih deležev apoptotičnih celic, ki izražajo antigen M30 in r-kaspazo 3, med skupinama preiskovancev z Mann-Whitney U testom

	N		povprečje rangov	p vrednost
antigen M30	kontrolna skupina.	27	32,20	0,014
	testna skupina	53	44,73	
r-kaspaza 3	kontrolna skupina	27	32,52	0,362
	testna skupina	53	42,02	

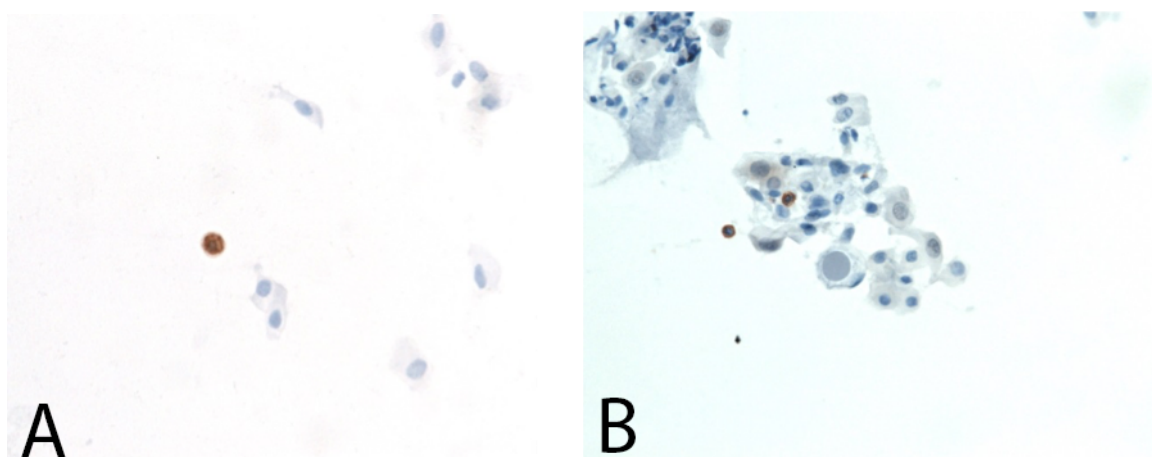
Legenda: antigen M30: primerjava rangov povprečnih deležev apoptotičnih celic, ki izražajo antigen M30 v kontrolnih vzorcih in vzorcih bolnikov s topično terapijo; r-kaspaza-3: primerjava rangov povprečnih deležev apoptotičnih celic, ki izražajo r-kaspazo 3 v kontrolnih vzorcih in vzorcih bolnikov s topično terapijo; $p \leq 0.05$: razlika v rangih med skupino kontrolnih vzorcev in vzorcev bolnikov s topično terapijo je značilna.

S pomočjo Mann-Whitney U testa smo ugotovili, da je razlika v rangih med vzorci kontrolne skupine in skupine bolnikov s terapijo, ki izražajo antigen M30, značilna ($p = 0,014$). Značilnih razlik v izražanju r-kaspaze 3 med preiskovanima skupinama ni ($p = 0,362$). Iz rezultatov Mann Whitney U testa smo ugotovili, da je antigen M30 uporaben označevalec apoptotičnih celic v celičnih vzorcih očesne veznice pri pacientih, ki za zdravljenje glavkoma prejemajo kapljice z vsebnostjo benzalkonijevega korida.

Imunocitokemično določanje antigena r-kaspaze se glede na rezultate ne izkaže kot zanesljiv označevalec epitelijskih celic očesne veznice v apoptozi.

Pri pregledu literature smo zasledili, da so Gown in sodelavci v histoloških preparatih iz različnih zdravih tkiv z imunohistokemično metodo ugotovili pozitivno reakcijo z r-

kaspazo 3 v apoptotičnih polimorfonuklearnih levkocitih (33). Ker nas je zanimalo, ali so v vzorcih očesne veznice prisotni tudi levkociti, smo na dodatnih citospinih izvedli imunocitokemično reakcijo s protitelesom proti transmembranskemu glikoproteinu CD 45, ki je specifičen za levkocite. V posameznih celicah, ki so po velikosti ustrezale celicam, ki izražajo r-kaspazo 3, smo določili pozitivno reakcijo s CD 45 in tako potrdili prisotnost levkocitov med epitelijskimi celicami očesne veznice (Slika 12). Pozitivna reakcija s protitelesom proti r-kaspazi 3 lahko predstavlja tudi levkocite v apoptozi.



Slika 12: Pozitivna imunocitokemična reakcija z r-kaspazo 3 (A); pozitivna imunocitokemična reakcija s CD 45

Številne raziskave na celičnih linijah očesne veznice so pokazale, da topične antiglavkomske terapije povzročijo apoptozo celic (34). Arici in sodelavci so ugotovili, da je apoptoza celic očesne veznice posledica uporabe topične terapije in ne glavkoma (35).

Različni avtorji (36, 37, 38) so preučevali vpliv BAK-a na humanih epitelijskih celičnih linijah očesne veznice. Zanimal jih je vpliv različnih koncentracij BAK-a na spremembe celic očesne veznice. Ugotovili so, da BAK sproži apoptozo celic že pri nizkih koncentracijah in da je vpliv BAK-a na apoptozo odvisen od koncentracije in časa izpostavitve.

Iz naših rezultatov in raziskav drugih avtorjev smo ugotovili, da uporaba antiglavkomske topične terapije z vsebnostjo BAK-a vpliva na apoptozo celic očesne veznice. Z ICK metodo smo dokazali, da je antigen M30 dober označevalec celic v apoptozi.

Prednost našega eksperimenta je, da smo apoptozo lahko določili na citospinih, pripravljenih iz vzorcev očesne veznice pridobljenih s ščetkanjem očesne veznice. Imunocitokemičnega določanja deleža epitelijskih celic očesne veznice v apoptozi na

citospinih, pripravljenih iz celičnih suspenzij celic, odvzetih s ščetkanjem spodnje prehodne gube očesne veznice, v pregledani literaturi nismo našli.

Vpliv BAK-a so največkrat preučevali na eksperimentalnih živalih, na invaziven način odvzetih vzorcih očesne veznice in humanih celičnih linijah. Prednost slednjih je, da se lahko zagotovi veliko število celic, vendar pa je slabost raziskav na celičnih linijah ta, da se fenotipsko nekoliko razlikujejo od normalnega epitelijskega očesne veznice (36).

5 SKLEPI

Namen našega dela je bilo postaviti metodo za imunocitokemično določanje deleža apoptotičnih celic v vzorcih očesne veznice bolnikov z glavkomom, ki za zdravljenje uporabljajo kapljice s konzervansom benzalkonijevim kloridom. Na osnovi dobljenih rezultatov smo ugotovili:

- z imunocitokemičnim določanjem dveh za apoptozo značilnih proteinov, razcepljeno kaspazo 3 (r-kaspazo 3) in s kaspazami razcepljen citokeratin 18 (antigen M30), lahko ugotovimo spremembe v deležu apoptotičnih celic na citospinih iz humane celične linije raka na materničnem vratu (HeLa)
- z imunocitokemičnim določanjem antigena M30 lahko zanesljivo določamo delež apoptotičnih celic na citospinih, pripravljenih iz vzorcev očesne veznice bolnikov z glavkomom
- antigen r-kaspaza 3 je nespecifičen označevalec celic očesne veznice v apoptozi, saj ga z imunocitokemično metodo lahko določimo tudi v levkocitih.

6 LITERATURA

1. Zhang Y, Herman B: Ageing and apoptosis. *Mechanisms of Ageing and Development* 2002; 123(4): 245-260.
2. Elmore S: Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 2007; 35(4): 495-516.
3. Savill J: Apoptosis and the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology* 1994; 5(1): 12-21.
4. Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL: Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental Cell Research* 2003; 283(1): 1-16.
5. Alberts B, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition, Garland Science, New York, 2002: 1010-1014.
6. Fulda S, Debatin KM: Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006; 25(34): 4798-4811.
7. Cande C, Cecconi F, Dessen P, Kroemer G: Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *Journal of Cell Science* 2002; 115(24): 4727-4734.
8. Buron N, Micheau O, Cathelin S, Lafontaine PO, Creuzot-Garcher C, Solary E: Differential mechanisms of conjunctival cell death induction by ultraviolet irradiation and benzalkonium chloride. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2006; 47(10): 4221-4230.
9. Maldonado V, De Anda J, Meléndez-Zajgla J: Paclitaxel-induced apoptosis in HeLa cells is serum dependent. *J Biochem Toxicol.* 1996; 11(4): 183-8.
10. Arnal I, Wade RH: How does taxol stabilize microtubules. *Current Biology* 1995; 5(8): 900-908.
11. Kutuk O, Letai A: Alteration of the mitochondrial apoptotic pathway is key to acquired paclitaxel resistance and can be reversed by ABT-737. *Cancer Research* 2008; 68(19): 7985-7994.
12. Wang TH, Wang HS, Soong YK: Paclitaxel-induced cell death - Where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer* 2000; 88(11): 2619-2628.
13. Barlow SB, Gonzalez-Garay ML, Cabral F: Paclitaxel-dependent mutants have severely reduced microtubule assembly and reduced tubulin synthesis. *Journal of Cell Science* 2002; 115(17): 3469-3478.

14. Miller AV, Hicks MA, Richardson AC, Windle JJ, Harada H: Paclitaxel-induced apoptosis is BAK-dependent, but BAX and BIM-independent in breast tumor. *Cancer Research* 2013; 73(8).
15. Masters JR: HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2(4): 315-319.
16. Rahbari R, Sheahan T, Modes V, Collier P, Macfarlane C, Badge RM: A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. *Biotechniques* 2009; 46(4): 277-84.
17. Jordan MA, Wendell K, Gardiner S, Derry WB, Copp H, Wilson L: Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Research* 1996; 56(4): 816-825.
18. Cvenkel B: Praktični pristop k obravnavi glavkoma. *Zdravstveni vestnik* 2010; 79: 19-26.
19. Baudouin C, Labbe A, Liang H, Pauly A, Brignole-Baudouin F: Preservatives in eyedrops: The good, the bad and the ugly. *Progress in Retinal and Eye Research* 2010; 29(4): 312-334.
20. Lens A, Nemeth SC, Ledford JK: *Ocular Anatomy and Physiology*, 2nd edition, SLACK incorporated, Thorofare, 2008: 50-53.
21. Kahook YM, Freeman DP: Preservatives in Topical Ophthalmic Medications: Historical and Clinical Perspectives. *Expert Review of Ophthalmology* 2009; 4(1): 59-64.
22. Tu EY, Shoff ME, Gao WH, Joslin CE: Effect of Low Concentrations of Benzalkonium Chloride on Acanthamoeba Survival and Its Potential Impact on Empirical Therapy of Infectious Keratitis. *Jama Ophthalmology* 2013; 131(5): 595-600.
23. Pauly A, Meloni M, Brignole-Baudouin F, Warnet JM, Baudouin C: Multiple Endpoint Analysis of the 3D-Reconstituted Corneal Epithelium after Treatment with Benzalkonium Chloride: Early Detection of Toxic Damage. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2009; 50(4): 1644-1652.
24. Salvesen GS: Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell Death and Differentiation* 2002; 9(1): 3-5.

25. Duan WR, Garner DS, Williams SD, Funckes-Shippy CL, Spath IS, Blomme E.A: Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *Journal of Pathology* 2003; 199(2): 221-228.
26. Ausch C, Buxhofer-Ausch V, Olszewski U, Hinterberger W, Ogris E, Schiessel R, Hamilton G: Caspase-cleaved cytokeratin 18 fragment (M30) as marker of postoperative residual tumor load in colon cancer patients. *Eur J Surg Oncol* 2009; 35(11): 1164-1168.
27. Leers MP, Kolgen W, Bjorklund V, Bergman T, Tribbick G, Persson B, Bjorklund P, Ramaekers FCS., Bjorklund B, Nap M, Jornvall H, Schutte B: Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *Journal of Pathology* 1999; 187(5): 567-572.
28. Walker JA, Quirke P: Viewing apoptosis through a 'TUNEL'. *Journal of Pathology* 2001; 195(3): 275-276.
29. Kim KS, Cho CH, Park EK, Jung MH, Yoon KS, Park HK: AFM-Detected Apoptotic Changes in Morphology and Biophysical Property Caused by Paclitaxel in Ishikawa and HeLa Cells. *Plos One* 2012; 7(1).
30. Theodoropoulos PA, Polioudaki H, Kostaki O, Derdas SP, Georgoulis V, Dargemont C, Georgatos SD: Taxol affects nuclear lamina and pore complex organization and inhibits import of karyophilic proteins into the cell nucleus. *Cancer Research* 1999; 59(18): 4625-4633.
31. Grassi A, Susca M, Ferri S, Gabusi E, D'Errico A, Farina G, Maccariello S, Zauli D, Bianchi FB, Ballardini G: Detection of the M30 neoepitope as a new tool to quantify liver apoptosis: timing. *Am J Clin Pathol.* 2004; 121(2): 211-9.
32. Brian S, Everitt CP: *Encyclopaedic Companion to Medical Statistics*, 2nd Edition, John Wiley & Sons, Ltd., 2010: 516.
33. Gown AM, Willingham MC: Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: Immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2002; 50(4): 449-454.
34. Dogan AL, Orhan M, Soylemezoglu F, Irkec M, Bozkurt B: Effects of topical antiglaucoma drugs on apoptosis rates of conjunctival epithelial cells in glaucoma patients. *Clinical and Experimental Ophthalmology* 2004; 32(1): 62-66.

35. Arici MK, Arici DS, Ozec AV, Dursun A, Toker MI, Erdogan H: Apoptotic effects of topical antiglaucoma medications on conjunctival epithelium in glaucoma patients. *European Journal of Ophthalmology* 2014; 24(1): 63-70.
36. Brasnu E, Brignole-Baudouin F, Riancho L, Warnet JM, Baudouin C: Comparative study on the cytotoxic effects of benzalkonium chloride on the Wong-Kilbourne derivative of Chang conjunctival and IOBA-NHC cell lines. *Molecular Vision* 2008; 14(46-53): 394-402.
37. Chang C, Zhang AQ, Kagan DB, Dip HL, Hutnik C: Mechanisms of benzalkonium chloride toxicity in a human trabecular meshwork cell line and the protective role of preservative-free tafluprost. *Clinical & Experimental Ophthalmology* 2015; 43(2): 164-172.
38. De Saint JM, Brignole F, Bringuier AF, Bauchet A, Feldmann G, Baudouin C: Effects of benzalkonium chloride on growth and survival of Chang conjunctival cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; 40(3): 619-630.

PRILOGE

Preglednica A: Zbirnik povprečnih vrednosti z ICK metodo določenih deležev celic HeLa v apoptozi ter deležev fragmentirane DNA s TUNEL metodo na dveh neodvisno gojenih serijah celic HeLa

oznake celičnih preparatov	čas indukcije (h)	konc. paklitaksela (mM)	povp. % M30 (I.+ II.)	povp. % r- kaspaze 3 (I.+II.)	povp. % frag. DNA (I.+II.)
A	12	kontrola	2,5	2,75	1,00
B	12	0,5	5	4,5	2,50
C	12	5	7,5	6,75	6,00
D	12	50	35	28	7,50
E	24	kontrola	2,75	3,25	6,00
F	24	0,5	17,75	18,25	10,00
G	24	5	18,75	14	22,50
H	24	50	75,75	41	70,00
I	48	kontrola	2,75	2,25	9,00
K	48	0,5	62	64	12,00
L	48	5	69,5	50,25	29,50
M	48	50	79,5	40,75	78,00

Legenda: povp. % M30 (I.+II.): povprečne vrednosti deležev celic HeLa v apoptozi določenih z imunocitokemičnim določanjem antigena M30, ki sva jih na dveh neodvisno gojenih serijah celic HeLa ocenjevali dve ocenjevalki; povp. % r-kaspaze 3 (I.+II.): povprečne vrednosti deležev celic HeLa v apoptozi določenih z imunocitokemičnim določanjem antigena r-kaspaze 3, ki sva jih na dveh neodvisno gojenih serijah celic HeLa ocenjevali dve ocenjevalki; povp. % frag. DNA (I.+II.): povprečne vrednosti deležev celic HeLa s fragmentirano DNA določenih z metodo TUNEL na dveh neodvisno gojenih serijah celic HeLa

Preglednica B: Zbirnik podatkov o preiskovancih in terapiji

oznake preparatov	spol: Ž1, M2	starost	terapija: 1 DA, 2NE
G1	1	76	1
G2	1	78	1
G3	1	76	1
G4	2	88	1
G5	1	70	2
G6	1	66	2
G7	2	75	1
G8	1	61	2
G9	2	77	2
G10	1	71	1
G11	2	65	1
G12	1	76	1
G13	2	49	2
G14	1	59	2
G15	1	75	2
G16	1	88	1
G17	1	45	2
G18	1	77	1
G19	1	68	1
G20	1	67	1
G21	2	47	2
G22	2	55	2
G23	1	63	2
G24	1	72	1
G25	1	60	2
G26	2	52	2
G27	2	74	1
G28	2	76	1
G29	1	67	2

G30	1	63	1
G31	2	76	1
G32	1	71	1
G33	2	86	1
G34	1	71	1
G35	1	67	1
G36	1	74	1
G37	1	66	2
G38	1	74	2
G39	2	79	1
G40	1	59	1
G41	1	80	1
G42	2	65	1
G43	2	75	1
G44	1	61	1
G45	1	90	1
G46	1	82	1
G47	2	76	1
G48	1	71	1
G49	2	77	1
G50	1	81	1
G51	1	44	1
G52	1	86	1
G53	2	67	1
G54	2	54	1
G55	1	62	1
G56	2	69	1
G57	2	69	1
G58	1	62	1
G59	1	75	1
G60	1	72	1
G61	2	80	1

G62	2	63	2
G63	2	72	1
G64	2	55	1
G65	2	72	1
G66	1	71	1
G67	1	60	1
G68	2	67	1
G69	1	83	2
G70	1	66	1
G71	2	72	2
G72	2	62	2
G73	1	85	2
G74	1	65	2
G75	2	53	2
G76	1	65	1
G77	1	79	2
G78	2	34	2
G79	2	48	2
G80	2	50	2

Preglednica C: Zbirnik podatkov o povprečnih deležih apoptotičnih celic očesne veznice, ki izražajo antigen M30 in razcepljeno kaspazo 3 med skupino bolnikov z in brez topične terapije

število vzorcev	povp. % M30 (kont.)	povp % M30 (vz.)	povp. % r- kaspaze3 (kont.)	povp. % r- kaspaze3 (vz.)
1	0	0,1	0	0
2	0,2	0	0	0
3	0	0,45	0	0,2
4	0	0,25	0	0,3
5	0	0,6	0,1	0,05
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0,05	0,1	0,35	0,1
10	0	0	0,1	0,1
11	0	0,1	0,1	0,2
12	0,1	0	0	0
13	0	0,85	0	0,05
14	0,05	0,2	0,25	8,85
15	0	0	0	0,75
16	0,05	0,15	0,4	0
17	0	0,15	0	0,75
18	0	0,05	0	0,3
19	0,1	0,05	0,2	0
20	0	0,05	0	0,2
21	0,2	0,1	1	0
22	0	0,1	0,05	0,2
23	0	0,1	0	0,1
24	0	0,05	0	0
25	0	0	0	0,4
26	0,2	0,2	0,05	0
27	0	0,25	0	0,15

28		0		0
29		0,05		0
30		0,1		0,35
31		0,05		0
32		0		0,55
33		0		0,35
34		0		0,15
35		0		0
36		0,1		0,05
37		0,05		0
38		0		0
39		0,05		0
40		0,05		0,55
41		0		0,45
42		0		0
43		0		0
44		0		0
45		0		0
46		0,05		0
47		0,05		0
48		0,1		0
49		0,2		0
50		0,15		0
51		0		0
52		0		0
53		0,15		0,1

Legenda: povp. % M30 (kont.): povprečne vrednosti deležev celic očesne veznice v kontrolnih vzorcih, ki izražajo antigen M30; povp % M30 (vz.): povprečne vrednosti deležev celic očesne veznice v realnih vzorcih, ki izražajo antigen M30; povp. % r-kaspaza 3 (kont.): povprečne vrednosti deležev celic očesne veznice v kontrolnih vzorcih, ki izražajo antigen r-kaspazo 3; povp. % r-kaspaza 3 (vz): povprečne vrednosti deležev celic očesne veznice v realnih vzorcih, ki izražajo antigen r-kaspazo 3;