

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Ida DJURDJEVIČ

**SPREMLJANJE DIFERENCIACIJE CELIC LINIJE CALU-3 Z
VRSTIČNIM ELEKTRONSKIM MIKROSKOPOM**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**MONITORING THE DIFFERENTIATION OF THE CELLS FROM
CALU-3 CELL LINE WITH SCANNING ELECTRON MICROSCOPE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Del diplomske naloge je bil opravljen v Laboratoriju za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo na Kemijskem inštitutu, (L11), drugi del pa v laboratorijih Katedre za fiziologijo, antropologijo in etologijo na Oddelku za Biologijo.

Komisija za študijske zadeve Oddelka za biologijo je 9. 3. 2012 potrdila temo diplomske naloge. Za mentorja diplomske naloge je imenovala prof. dr. Kazimirja Drašlarja, za somentorja dr. Simona Casermana (KI), za recenzenta prof. dr. Roka Kostanjška in za predsednika doc. dr. Gregorja Zupančiča.

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednik: doc. dr. Gregor Zupančič
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Član: prof. dr. Kazimir Drašlar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Član: dr. Simon Caserman
Kemijski inštitut Ljubljana, Laboratorij za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo
- Član: prof. dr. Rok Kostanjšek
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 13. 9. 2012

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svojega diplomskega dela v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je elektronska oblika naloge identična tiskani verziji.

Ida Djurdjevič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
DK 612.2:611.018.7:778.317(043.2)=163.6
KG celična linija/Calu-3/vrstični elektronski mikroskop/SEM/
KK
AV DJURDJEVIČ, Ida
SA DRAŠLAR, Kazimir (mentor)/CASERMAN, Simon (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2012
IN SPREMLJANJE DIFERENCIACIJE CELIC LINIJE CALU-3 Z VRSTIČNIM ELEKTRONSKIM MIKROSKOPOM
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP IX, 45 str., 19 sl., 19 vir.
IJ SI
JI sl/en
AI Epitelijske celične linije so osnova *in vitro* modelov epitelija, na katerih raziskujemo vplive različnih dejavnikov na epitelij in njegov odgovor nanje. V diplomskem delu smo spremljali učinke dveh različnih načinov gojenja celic celične linije dihalnega epitelija Calu-3 ter skušali opredeliti, kateri način omogoča vzpostavitev *in vitro* modela epitelija, ki bi bolje odražal lastnosti epitelija dihalnih poti. Celice smo gojili v pogojih LCC in AIC. Površino epitelijev smo posneli z vrstičnim elektronskim mikroskopom. S pomočjo mikrografij smo spremljali spremembe apikalnih površin celic v celični kulturi v različnih časovnih obdobjih. Spremljali smo pojavljanje značilnih površinskih morfoloških epiteljskih struktur, pojav vezikularnih struktur in mukusa na površini. Že na posnetkih celic, narejenih kmalu po sajenju, smo lahko zaznali pojavljanje vseh predhodno naštetih struktur. Dokazali smo, da so prisotne podobne epiteljske strukture pri obeh načinih gojenja, prav tako so se pri obeh načinih pojavile vezikularne strukture. Višja TEER se je vzpostavila pri epiteliju gojenem na način LCC, kar nakazuje na izrazitejšo tvorbo tesnih stikov med celicami. Prisotnost mukusa smo opazili le pri gojenju na način AIC. Različna je bila tudi prerast celic na prepustni membrani, saj so pri gojenju na način AIC celice razraščale višje in morda tudi v več plasteh. Z ranitvenim testom smo spremljali preraščanje epitelija po poškodbi. Zaraščanje je potekalo zelo hitro. Deleče in migrirajoče celice na ranitvenem robu niso bile morfološko različne od ostalih celic.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC 612.2:611.018.7:778.317(043.2)=163.6
CX cell line/Calu-3/scanning electron microscope/SEM/
CC
AU DJURDJEVIČ, Ida
AA DRAŠLAR, Kazimir (supervisor)/CASERMAN, Simon (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology
PY 2012
TI MONITORING THE DIFFERENTIATION OF THE CELLS FROM CALU-3
CELL LINE WITH SCANNING ELECTRON MICROSCOPE
DT Graduation thesis (University studies)
NO IX, 45 p., 19 fig., 19 ref.
LA Sl
AL sl/en
AB Epithelial cell lines are the basis of *in vitro* epithelial models through which enable the exploration of the effects of various factors on the epithelium and its subsequent response. The thesis explores the effects of two different cell culturing methods of cell line Calu-3 to determine which of the two methods can establish a model of the epithelium that would better reflect certain characteristics of airway epithelium. Cells were cultured in LCC and AIC conditions. Epithelium surface was imaged by scanning electron microscope. Using micrographies the growth and differentiation of cell culture in time were followed. Afterwards, we monitored the emergence of typical epithelial structures and the presence of vesicular structures and mucus on the surface. The presence of all previously mentioned structures was detected on the micrographies of the cells taken shortly after planting. We demonstrated that the epithelial-like structures are similar for both methods of cultivation; in both methods we also found vesicular structures. Higher TEER values were established in the epithelium grown in LCC, suggesting better organised tight junctions between cells. We observed the presence of mucus on cells exclusively while growing via AIC. Evenmore, cells cultivated using AIC spread higher and probably in several layers. Using scratch test, we were monitoring the overgrowth of denudated area of the epithelium after the injury. Overgrowth was very rapid. Dividing and migrating cells on the margin were not morphologically different from the other cells.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PRILOG	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VIII
SLOVARČEK	IX
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 Gojenje celic v <i>in vitro</i> pogojih	3
2.2 Respiratorni epitelij	8
3 MATERIAL IN METODE.....	10
3.1 Celična kultura in gojenje	10
3.1.1 Materiali	10
3.1.2 Metode	11
3.2 Meritve prekosepitijske električne upornosti celičnega sloja	12
3.3 Mikroskopiranje	12
3.3.1 Materiali	12
3.3.2 Metode	13
3.3.2.1 Priprava vzorcev za mikroskopiranje z vrstičnim elektronskim mikroskopom	13
3.3.2.2 Izhodne celice	14
3.3.2.3 Ranitveni test	15
4 REZULTATI	16
4.1 Prekoepitijska električna upornost celičnega sloja	16
4.2 Mikroskopiranje	17
4.2.1 Izhodne celice	17
4.2.2 Strukturne spremembe površine celic gojenih na način LCC	18
4.2.3 Strukturne spremembe površine celic gojenih na način AIC	24
4.2.4 Ranitveni test	32
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	33

5.1	Prekoepitelijska električna upornost	34
5.2	Mikroskopiranje	34
5.2.1	Izhodne celice	34
5.2.2	Primerjava med LCC in AIC	35
5.2.3	Ranitveni test	39
5.2.4	Sklepi	40
6	POVZETEK.....	42
7	VIRI.....	43

ZAHVALA

KAZALO SLIK

	str.
<i>Slika 1: Celična diferenciacija.....</i>	5
<i>Slika 2: Evolucija celične linije.....</i>	6
<i>Slika 3: Slika respiratornega epitelija s submukozno plastjo).....</i>	9
<i>Slika 4: Dihalni epitelij na različnih delih dihalne poti</i>	9
<i>Slika 5: Prekoepitelijska upornost celične kulture Calu-3 gojene na način AIC in LCC.....</i>	16
<i>Slika 6: SEM mikrografije sveže odmrznjenih celic celične linije Calu-3.....</i>	19
<i>Slika 7: SEM mikrografije celične kulture gojene v pogojih LCC, 5 dni po saditvi.....</i>	20
<i>Slika 8: SEM mikrografije celične kulture gojene v pogojih LCC, 8 dni po saditvi.....</i>	21
<i>Slika 9: SEM mikrografije celične kulture gojene v pogojih LCC, 12 dni po saditvi.....</i>	22
<i>Slika 10: SEM mikrografije celične kulture gojene v pogojih LCC, 15 dni po saditvi.....</i>	23
<i>Slika 11: SEM mikrografije celične kulture gojene v pogojih LCC, 22 dni po saditvi.....</i>	24
<i>Slika 12: SEM mikrografije celične kulture gojene v pogojih AIC, 5 dni po saditvi.....</i>	26
<i>Slika 13: SEM mikrografije celične kulture gojene v pogojih AIC, 8 dni po saditvi.....</i>	27
<i>Slika 14: SEM mikrografije celične kulture gojene v pogojih AIC, 12 dni po saditvi.....</i>	28
<i>Slika 15: SEM mikrografije celične kulture gojene v pogojih AIC, 15 dni po saditvi.....</i>	29
<i>Slika 16: SEM mikrografije celične kulture gojene v pogojih AIC, 22 dni po saditvi.....</i>	31
<i>Slika 17: SEM mikrografije celične kulture gojene v pogojih LCC prikazujejo proces zaraščanja.....</i>	33
<i>Slika 18: SEM mikrografija biopsije zdravega tkiva pljuč.....</i>	37
<i>Slika 19: SEM mikrografije epiteljske površine sapnika.....</i>	38

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

- AIC – gojenje celic v pogojih z apikalnim stikom z zrakom (ang. air-interfaced culture)
- ATCC – ameriška zbirka tipskih kultur (ang. American Type Culture Collection)
- CFTR – beljakovina CFTR (ang. cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)
- CPD – sušenje pri kritični točki (ang. critical point drying)
- EDTA – etilendiamintetraocetna kislina (ang. ethylenediaminetetraacetic acid)
- LCC – gojenje celic v pogojih z apikalno pokritostjo z gojiščem (ang. liquid-covered culture)
- PET – polietilen tereftalat (ang. polyethylene terephthalate)
- RZV – relativna zračna vlažnost
- SEM – vrstični elektronski mikroskop (ang. scanning electron microscope)
- TEER – prekoepitelijska električna upornost (ang. transepithelial electrical resistance)
- μ - mikro

SLOVARČEK

In vitro – besedna zveza, ki se nanaša na procese in poskuse, ki potekajo v nadzorovanem okolju zunaj živega organizma.

In vivo – besedna zveza, ki se nanaša na procese in poskuse, ki potekajo v živem organizmu.

Konfluentna razrast – kontinuirani sloj celic, ki prerastejo celotno površino rastne membrane.

Viabilnost – živost, sposobnost za življenje in razvoj.

1 UVOD

V zadnjih desetletjih je postala uporaba celičnih kultur zelo pogosta pri študiju različnih življenjskih procesov. Modeli epitelijev *in vitro* so postali eden glavnih pripomočkov pri začetnih raziskavah vpliva zdravilnih učinkovin na epitelije ter študiju njihovega prehajanja v krvno-limfni sistem. Eden od modelov humanega dihalnega epitelija, ki ga trenutno uporabljajo v raziskavah, temelji na gojenju celic celične linije Calu-3 (Foster in sod., 2000, Florea in sod., 2003).

Celična linija Calu-3 izvira iz humanega adenokarcinoma bronhialnega epitelija. Celice v pogojih gojenja *in vitro* tvorijo enoslojno prerast površine in tesne stike med seboj ter so zato primeren model epitelija. Odlikuje jih tudi zmožnost tvorbe mukusa, ki se ob ustrezni kultivaciji nalaga na površini epitelijske plasti (Grainger in sod., 2006). Prisotnost mukusa obeta vzpostavitev kompleksnejšega in relevantnejšega modela nativnega epitelija. Viri navajajo različno diferenciacijo celic *in vitro* v odvisnosti od pogojev gojenja. Tako naj bi imele celice, gojene na način AIC, izrazitejše epitelijske strukture. Pokrival naj bi jih tudi gost mukus. Ta naj ne bi bil prisoten na površini celic, gojenih na način LCC (Hangi in sod., 2010, Stentebjerg-Andersen in sod., 2010, Grainger in sod., 2006).

Vrstični elektronski mikroskop je eno od najprimernejših orodij za spremljanje morfoloških znakov diferenciacije celic oziroma razlike v razvoju pri gojenju v različnih pogojih. Omogoča opazovanje površinskih struktur z visoko ločljivostjo in globinsko ostrino. V nasprotju z drugimi orodji omogoča opazovanje večje površine in s tem enostavnejše pridobivanje več informacij, kar nam omogoča večjo reprezentativnost le-teh. Apikalne strani epitelijev imajo pogosto značilne morfološke posebnosti in so pri epitelijih, ki zamejujejo večje lumne, lahko dostopne.

Cilji naloge:

- Standardizacija postopka priprave preparatov celične linije Calu-3 za vrstično elektronsko mikroskopijo.
- Spremljanje diferenciacije celic celične linije Calu-3 pri gojenju *in vitro* s pomočjo vrstičnega elektronskega mikroskopa. Opazovanje strukturnih razlik, ki nastanejo pri različnih pogojih gojenja celic oziroma so posledica različne starosti celične kulture.

- Opredeliti morfološke razlike apikalnih površin celic, nastale zaradi različnih pogojev gojenja. Potrditi *in vitro* model, ki bo bolje odražal stanje *in vivo*.

Diplomska naloga torej temelji na naslednjih hipotezah:

- Kultura celične linije Calu-3 izraža značilne epitelijske morfološke strukture v odvisnosti od pogojev gojenja.
- Meritve TEER nakazujejo dinamiko nastajanja tesnih stikov kot pokazatelj vzpostavitve integritete epitelijskega modela.
- Celice pri gojenju na način AIC tvorijo epitelijski model, ki bolje izraža strukturne lastnosti značilne za bronhialni epitelij *in vivo*.

2 PREGLED OBJAV

2.1 Gojenje celic v *in vitro* pogojih

Celična kultura je pogosto homogena populacija celic v umetno vzpostavljenem okolju, ki zagotavlja potrebne nutiente, primerno podlago, temperaturo, vlažnost in plinsko atmosfero, kar celicam omogoča obstoj in rast. V takih, deloma definiranih in stalnih pogojih, je mogoče opazovati in meriti odgovore celic na različne dražljaje ali spremenjene pogoje, saj izmerjeni odziv lahko pripišemo znanemu celičnemu tipu. Naša kultura ni homogena, saj izvor celic Calu-3 ni točno določen, kar je posledica pridobitve domnevno submukoznega žleznega celičnega vzorca iz plevralnega izliva. Ker so celice rakastega izvora, prispeva k nehomogenosti vzorca tudi njihova genetska nestabilnost.

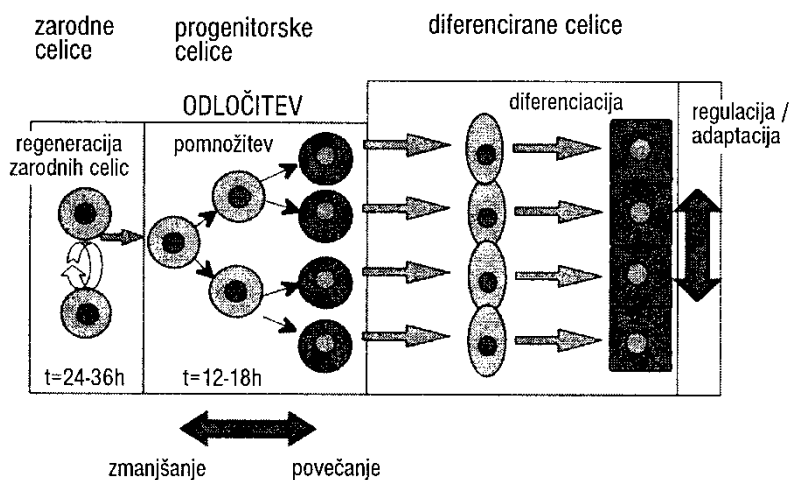
V raziskavah imajo celične linije nekaj prednosti pred celicami, ki so del tkiv in organov, hkrati pa tudi mnoge pomanjkljivosti. Pri celičnih kulturah je lažje zagotoviti primerljive in definirane pogoje poskusa in s tem tudi nadzorovano spreminjanje le teh. Poleg tega so prednosti tudi v relativno preprostem shranjevanju in posredovanju celic, kar omogoča primerljivost rezultatov med raziskovalnimi skupinami. S testiranjem na celičnih linijah se zmanjša testiranje na živalih itd. Omejitve celičnih kultur so zlasti v potrebi po delu v striktno aseptičnih pogojih, saj lahko hitro pride do kontaminacije počasi rastočih živalskih celic s hitreje rastočimi bakterijami, plesnimi ali kvasovkami. Celice je potrebno vzdrževati, saj niso sposobne samostojnega preživetja v *in vitro* pogojih. Strošek vzdrževanja kulture je v primerjavi s cenami živalskih tkiv precej višji. Za kulture rakastega izvora sta značilni genetska in fenotipska nestabilnost, ki lahko vodita v dediferenciacijo in s tem neprimerljivost celic z izvorno kulturo oziroma izvornimi celicami v tkivu (Freshney, 2000).

Celično kulturo lahko vzgojimo iz vzorca krvi ali delca tkiva (biopsije). Medceličnino in medcelične povezave v koščku tkiva encimsko razgradimo in tako dobimo suspenzijo posamičnih celic. Celice, ki postopek preživijo, se razmnožujejo pritrjene na podlago kot enosloj ali v suspenziji. Za pritrnitev morajo imeti celice primerno podlago, šele nato se lahko razmnožujejo in jo prerastejo. Podlaga je lahko steklo, če ima rahlo negativen naboj,

ali plastika (polistiren), če je obdelana z visoko energetskim ionizirajočim sevanjem (Batista, 2005). Celice najprej izločijo proteoglikane in proteine ekstracelularnega matriksa, ti se vežejo na nabito površino, šele nato se celice s specifičnimi receptorji vežejo nanje in začnejo širiti po podlagi. V povezave med celicami in pritrditve celic na podlago so vključeni trije razredi transmembranskih proteinov. V prvi razred uvrščamo adhezijske molekule, ki so vključene v medcelične povezave homolognih celic. To so CAM molekule (od Ca^{2+} neodvisne) in kadherini (od Ca^{2+} odvisni). Za povezave med celico in substratom je odgovoren drugi razred adhezijskih molekul, integrini. Tretja skupina adhezijskih molekul so transmembranski proteoglikani, ki se povezujejo z drugimi proteoglikani in kolagenom. Celične adhezijske molekule se povezujejo z elementi citoskeleta. Intergini in kadherini so npr. povezani z aktinskimi ali intermediarnimi filamentami (Freshney, 2000).

Fenotip celic, ki jih gojimo v *in vitro* pogojih kot celično linijo, je pogosto precej drugačen od tistega, ki je značilen za tkivo, iz katerega celice izhajajo. To je zaradi prisotnosti mnogih faktorjev, ki vplivajo na fenotip *in vivo* in jih ni v *in vitro* mikrookolju. Mikrookolje celične kulture med drugim ne vključuje homeostatskih regulacij, prisotnih *in vivo*, kot so živčni in endokrini sistem. Zato je lahko celični metabolizem *in vitro* bolj konstanten, a hkrati tudi manj reprezentativen za tkivo, iz katerega izhaja (Freshney, 2000).

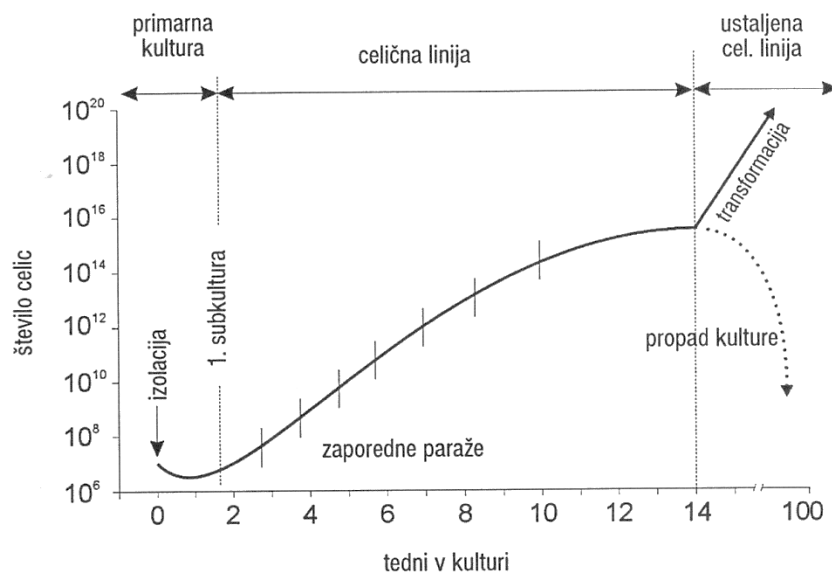
Diferenciacija je proces, ki vodi do vzpostavitve fenotipa, značilnega za funkcionalno odraslo celico *in vivo* (Freshney, 2000). Vstop zarodne celice v proces diferenciacije je v naravnem okolju praviloma nepovraten. Proces terminalne diferenciacije vodi celico po točno določeni poti do odraslega fenotipa. Za tem se celica ne spreminja več. V organizmih poznamo dve poti diferenciacije. V tkivih, ki se stalno obnavljajo, imamo določeno število totipotentih nediferenciranih celic, ki se po potrebi pretvorijo v prekursorske celice, ki napredujejo po poti terminalne diferenciacije. Pri tkivih, ki se le malo obnavljajo, se lahko odrasle že diferencirane celice pričnejo spet deliti samo v primeru poškodbe (Batista, 2005).



Slika 1: Celična diferenciacija (Batista, 2005)

V določenih primerih, npr. ob nastanku malignega tkiva ali gojenju v kulturi, pride do dediferenciacije. Dediferenciacija je izguba diferenciacijskih lastnosti odrasle celice.

Zato da ohranimo stalen fenotip v celični kulturi, moramo s subkultivacijo vzdrževati nizko gostoto celic. Ko je zapolnjena vsa rastna površina in dosežejo celice strnjeno prerast, lahko prevelika gostota privede do omejitve rasti celic, spremembe njihovega videza, medsebojnega tesnejšega povezovanja in preraščanja podlage v več plasteh. Zato s subkultivacijo celice razredčimo in jih nasadimo v nove posode. Po prvi pasaži (presaditvi) tako dobimo celično linijo. Po nekaj pasažah se celična linija selekcionira na osnovi selekcijskih pritiskov, ki vladajo v kulturi. Vse bolj prevladujejo hitro deleče se celice, počasi rastoče pa so vse manj zastopane. Po določenih pasažah je celična linija stabilnejša in nespremenjena za nekaj generacij, dokler po 40–50 pasažah zaradi genetskega staranja (krajšanja telomer) ne propade. Iz nekaterih celičnih linij nastanejo zaradi genetskih sprememb (delecije in mutacije p53 gena) trajne celične linije. Pride do transformacije *in vitro*, celice hitro rastejo in nimajo omejene življenjske dobe, so torej »nesmrtni«. To je velikokrat povezano s tumorigenostjo. Spremenijo se jim rastne značilnosti, izgubijo lahko potrebo po pritrditvi in kontaktno inhibicijo, s tem pa tudi ni več prisotne omejitve rasti zaradi prevelike gostote celic (Batista, 2005).



Slika 2: Evolucija celične linije (Batista, 2005)

Celične linije se uporabljajo kot modeli za proučevanje medceličnih povezav in interakcij, znotrajceličnih funkcij, prehajanja različnih učinkovin in s tem pri razvoju zdravil. Njihove prednosti so številne. Ob dotoku hranil jih lahko razmeroma enostavno gojimo, so lahko dostopne ter tudi s celičnimi delitvami ohranjajo svoje lastnosti. To je pomembno zaradi ponovljivosti poskusov, saj imajo celične linije vedno znova iste lastnosti (Jamnikar, 2011).

Ena od rakastih celičnih linij, ki so že izvorno transformirane, je celična linija Calu-3. Ta izvira iz humanega adenokarcinoma bronhialnega epitelija. Celice v pogojih gojenja *in vitro* kažejo lastnosti polariziranega, diferenciranega in funkcionalnega humanega pljučnega epitelija, kot so zmožnost tvorbe tesnih celičnih stikov v kulturi in zmožnost ekspresije beljakovine CFTR (ang. cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) (Foster in sod., 2000; Hanghi in sod., 2010). Celice domnevno izvirajo iz bronhialnih submukoznih žlez, ki so v človeških pljučih izvor površinskih tekočin, mucinov in drugih imunološko aktivnih substanc. Ostali tipi pljučnih celic, kot npr. stebričaste celice, bazalne celice in pneumocite tipa II (alveolarne), pa so manj aktivni s sekretornega vidika in imajo manjši vpliv na sestavo pljučnega mukusa (Zhu in sod., 2010). Te lastnosti so pripomogle k temu, da je to trenutno ena glavnih celičnih linij za raziskave permeabilnosti pljučnega epitelija *in vitro* (Grainger in sod., 2006; Zhu in sod., 2010).

Čeprav je cilj večine raziskav ugotavljanje prehajanja učinkovin preko enosloja Calu-3, je bilo napravljanih tudi nekaj morfoloških raziskav. Kljub nekaterim odstopanjem so rezultati raziskav večinoma predlagali, da je gojenje Calu-3 celic na način AIC (air interfaced culture) primernejše in bližje nativnemu epiteliju, od gojenja celic v pogojih LCC (liquid covered culture). To pa predvsem zaradi drugačnega, bolj stebričastega epitelija, ki nastane pod pogoji AIC. Pomembna je bila tudi prisotnost mukusa, ki prekriva tako gojen epitelij, in prisotnost daljših, površinskih, cilijam podobnih strktur, ki so bile po navedbah virov v večji meri prisotne le v pogojih AIC (Grainger in sod., 2006).

2.2 Respiratorni epitelij

Respiratorni epitelij prekriva dihalni trakt, kjer sodeluje pri vlaženju in obrambi pred patogeni in tujki, ki lahko preidejo v dihalni sistem in v njem tvorijo okužbe oziroma drugače poškodujejo tkivo.

Dihalni sistem je sestavljen iz dihalnih poti, dihalnih mišic, živcev in poprsne opne. Če se omejimo na dihalne poti, lahko sistem razdelimo na zgornji del, ki ga sestavlja: nosna votlina, žrelo, grlo in sapnik ter na spodnji dihalni trakt, ki ga sestavlja bronhialno drevo in sicer: spodnji del sapnika, ki se razdeli v dve sapnici (bronhija), v pljučih se sapnici delita v vedno več manjših sapnic in nazadnje v sapničice (bronhiole). Te se na koncih razširijo še v pljučne mešičke (alveole) (Thibodeau in Patton, 2006).

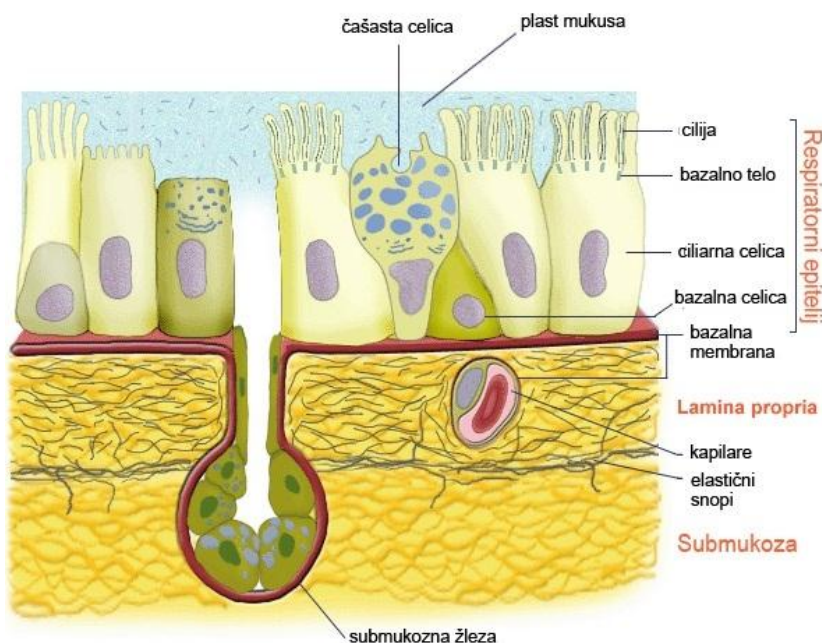
Respiratorni epitelij se v dihalnem sistemu razlikuje, glede na to, v katerem delu leži in kakšne so njegove funkcije. Epitelij, ki je del zgornjega dihalnega trakta, je ciliaren, psevdostatifiran in stebričast. Sestavlja ga namreč več tipov celic. Vse celice se pritrdijo na bazalno membrano in tvorijo enosloj, vendarle so njihova jedra razporejena v različnih višinah, kar daje vtis večplastnega epitelija. Zato mu pravimo psevdostatifiran epitelij.

Celice, ki sestavljajo epitelij zgornjega dela dihalnega trakta, lahko razdelimo na več tipov:

- Ciliarne celice so stebričaste epiteljske celice s specializiranimi strukturami na površini, cilijami.
- Čašaste celice imajo tako ime zaradi njihove oblike. So prav tako stebričaste epiteljske celice, ki izločajo mukusne granule. Mukus skrbi za vlaženje respiratorne poti in izločanje tujkov iz respiratornega trakta.
- Bazalne celice so majhne, prizmatske celice s sposobnostjo diferenciacije v druge celične tipe, ki sestavljajo epitelij. Ob poškodbah lahko te celice migrirajo na izpraznjeno površino bazalne membrane, kjer diferencirajo in s tem vzpostavijo ponovno zdrav epitelij.

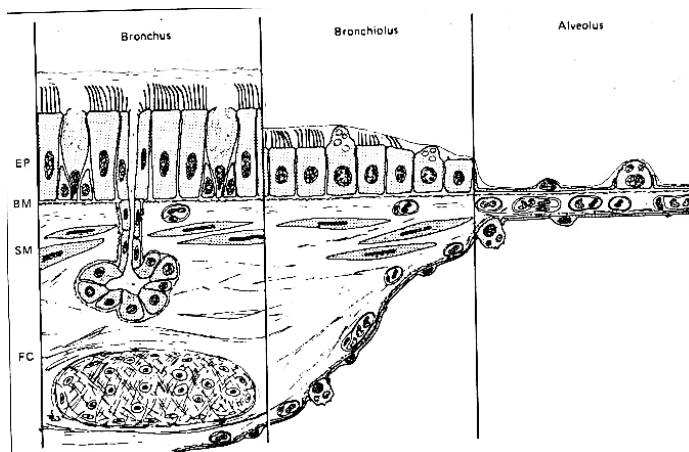
Pri tvorbi mukusa sodelujejo tudi celice, ki so pogreznjene pod ravnino epitelija, pod lamino propio (lastno plast) in so z izvodilom povezane z lumnom nad epitelijem. To so submukozne žleze. Te ob čašastih celicah skrbijo za navlažitev dihalnih poti. Z mukusom ujamejo prašne delce in kapljice, ki lebdi v vdahnjenem zraku. Mukus z ujetimi delci

nato ciliarne celice z gibanjem cilij premikajo proti žrelu. Tam se mukus izloči s kašljem ali pa ga pogoltnemo in dezinfeciramo z želodčno kislino ter razkrojimo s prebavnimi encimi (Mescher, 2010; Morales, 2008).



Slika 3: Slika respiratornega epitelijskega tkiva s submukozno plastjo (Morales, 2008 http://alexandria.healthlibrary.ca/documents/notes/bom/unit_2/L-32%20Histology%20of%20the%20Respiratory%20System%201.xml)

V spodnjih dihalnih poteh se ob prehodu proti pljučnim mešičkom spreminja tudi epitelij. Ciliaren stebričast epitelij se postopoma spreminja v kubičnega. Čšaaste celice so prisotne še samo v večjih bronhiolih in jih kasneje ni več, v vezivu ni žlez in hrustanca, vezivo obkrožajo gladke mišice, v respiratornih mešičkih samo še posamezni mišični snopi (Warshawsky H. in Morales, 2008).



Slika 4: Dihalni epitelij na različnih delih dihalne poti (vir: <http://depts.washington.edu/envh/lung.html> po Bergofsky, 1991)

3 MATERIAL IN METODE

3.1 Celična kultura in gojenje

3.1.1 Materiali

Humano bronhialno celično linijo Calu-3 smo pridobili iz zbirke ATCC (American Type Cell Culture Collection - ATCC, Rock-ville, ZDA).

Celice smo gojili v plastenkah (Corning Costar, Amsterdam, Nizozemska) površine 150 cm² z ravnim gojiščem, naslednje sestave:

88 % osnovnega gojišča (Minimum essential medium eagle - MEME, SIGMA M5650, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Nemčija),

10 % toplotno obdelanega seruma govejih zarodkov (HIFBS, SIGMA F4135),

1 % 100-kratne raztopine neesencialnih amino kislin (MEM Non-essential amino acid solution 100X, SIGMA M7145),

1 % 100-kratne raztopine L-glutamina (200 mM, PAA M00410-2744, PAA laboratoriji, Pasching, Avstrija).

Ob presajanju celic smo uporabili še tripsin (0,25 % EDTA, SIGMA T4049), ki je sprostil celice z raste podlage.

V drugem delu smo celice nasadili na plastične koške na prepustno membrano iz poliestra (transwell) s površino 1,1 cm² in porami velikosti 0,4 μm (Corning Costar). Celice smo pred nasaditvijo prešteli s pomočjo hemocitometra na invertnem mikroskopu. Pred štejetjem smo jih izpostavili barvilu tripan modrim (0,4 %, SIGMA T8154), za potrditev viabilnosti.

Za gojenje na koških smo namesto ravnega gojišča uporabljali testno gojišče naslednje sestave:

88 % osnovnega gojišča (Dublecco's modified Eagle's medium - DMEM SIGMA D5921),

10 % toplotno obdelanega seruma govejih zarodkov (HIFBS, SIGMA F4135),

1 % 100-kratne raztopine L-glutamina (200 mM, PAA M00410-2744, PAA laboratoriji, Pasching, Avstrija),

1 % 100-kratne raztopine Antibiotik-antimikotik (ANTI-ANTI, GIBCO 15240, Gibco, Invitrogen).

Celice smo gojili v inkubatorju (Thermo electron corporation, ZDA) pri 95 % vlažnosti, 37 °C in 5 % CO₂ v zraku.

Za merjenje prekoepiteljske električne upornosti smo uporabili Epithelial Volt-Ohm meter Millicel ERS-2 (Merck Millipore, Nemčija) s prilagojeno elektrodo.

3.1.2 Metode

Humano bronhialno celično linijo Calu-3 smo pridobili iz zbirke ATCC. Pri našem delu smo uporabili celice med 22. in 32. pasažo. Celice smo med pasažami gojili v plastenkah površine 150 cm² s 30 ml ravnega gojišča in vzdrževali v inkubatorju z vlažno atmosfero (95 % RZV), s 5 % CO₂ v zraku in pri 37 °C. Rastno gojišče smo zamenjali dvakrat na teden. Gojišče smo hranili v hladilniku do 30 dni. Pred menjavo gojišča smo le to segreli na 37 °C in s tem zavarovali celice pred temperaturnim šokom. Celice smo presajali enkrat na teden z redčenjem v razmerju 1 : 3. Za odlepljenje celic smo uporabili 4 ml raztopine tripsina z 0,25 % EDTA.

Za gojenje v pogojih AIC (air-interfaced culture) in LCC (liquid-covered culture) smo nasadili 10⁵ celic na plastične koške s prepustno poliestrsko membrano (PET) debeline 10 µm in velikostjo por 0,4 µm. Gojenje na difuzijsko prepustni plastiki omogoča naravno pot oskrbe epiteljskih celic z nutrienti iz bazalne smeri. Pod membrano koška (bazalno) smo dodali 1500 µl testnega gojišča, v košek (apikalno) pa 500 µl testnega gojišča. Polovici nasajenih koškov smo dan po sajenju, ko so se celice pritrdile na membrano koška, odvzeli testno gojišče na apikalni strani (500 µl). S tem smo celice izpostavili pogojem AIC. Testno gojišče smo nato na bazalni strani menjali vsak drugi dan. Ob menjavi gojišča smo s slednjim tudi spirali apikalno stran. Pri gojenju v pogojih LCC je bilo gojišče zamenjano vsak drugi dan na obeh straneh, tako na bazalni kot apikalni. Celice, uporabljene za pripravo mikroskopskih preparatov v diplomski nalogi, so bile odvzete 5, 8, 12, 15 in 22 dni po saditvi.

3.2 Meritve prekosepitijske električne upornosti celičnega sloja

Merjenje prekoepitelijske električne upornosti (ang. transepithelial electrical resistance, TEER) je standardni postopek v celičnih laboratorijih, ki omogoča oceno dinamike rasti celic, razvoja celične kulture, vitalnosti in integritete tkiva. Prekoepitelijska električna upornost je električna upornost celične plasti in predstavlja vsoto upornosti celic, medceličnih prostorov in nosilne membrane. Prekoepitelijsko električno upornost epitelijskega modela celic Calu-3 smo merili z epitelijskim Volt-Ohm metrom Millicell ERS-2 s prilagojeno elektrodo. Apikalno in bazolateralno stran epitelijskega modela Calu-3 smo obdali s svežim temperiranim testnim gojiščem. Prav tako je bila v testnem gojišču umerjena tudi elektroda. Upornost epitelijskega modela je bila izmerjena vsak drugi dan po menjavi gojišča in pred odvzemom koškov za fiksacijo za elektronsko mikroskopijo. S tem smo dobili podatek o stanju epitelijskega modela in možnost primerjave z rezultati o kulturi v drugih laboratorijih.

3.3 Mikroskopiranje

3.3.1 Materiali

Pri pripravi vzorcev za vrstično elektronsko mikroskopijo smo uporabili: izotonično raztopino fosfatnega pufra (10X PBS, GIBCO 70013, Gibco, Invitrogen), natrijev kadmilat (Christine Gropl, R1104, Avstrija), fiksativa - glutaraldehyd (25 %, SPI-CHEM, spi#2607, ZDA) in formaldehyd (Fluka-Chemika, Sigma-Aldrich, Nemčija), 96 % etanol (Merck, Nemčija), absolutni etanol (Carlo Erba, Italija), komprimiran CO₂ (Messer Slovenija) in ozmijev tetraoksid (OsO₄, 4 %, SPI-CHEM, lot#1141030, ZDA).

Vzorce smo sušili v napravi za sušenje vzorcev pri kritični točki Balzers (CPD 030). Napraševali smo s platino v napravi Bal-Tec (SCD 050).

Za pripravo krovnih stekelc za pritrditev izhodnih celic smo uporabili raztopino alcian modrega (Alcian Blue 8GX, Sigma, A5268-10G) in led očetno kislino (Acetic acid (glacial) 100 %, Merck, 1.00063.1000).

3.3.2 Metode

3.3.2.1 Priprava vzorcev za mikroskopiranje z vrstičnim elektronskim mikroskopom

Za vrstično elektronsko mikroskopijo smo koške z vpetimi membranami in celičnim enoslojem pripravili po naslednjem protokolu:

- Spiranje vzorca z izotonično raztopino fosfatnega pufru (1X PBS, pH 7,2)
[Odstranitev gojišča] 2 X 1 min
- Spiranje vzorca s kakodilatnim pufrom (0,1 M; pH 7.2)
[Odstranitev gojišča in fosfatov] 1 min

Kakodilatni pufer: 0,4 M, pH 7,2 (osnovna raztopina)

- 4,28 g Na kakodilata smo raztopili v 25 ml destilirane vode
- pH smo umerili na 7,2 z 0,2 M HCl
- raztopino smo dopolnili do 50 ml z destilirano vodo

- Fiksacija I. NAŠ 45 min

Fiksativ NAŠ (pH 7,2) Uporabili smo vedno svež fiksativ
1 % glutaralhid, 0,5 % formalhid, 0,1 M kakodilatni pufer
Priprava: 0,4 ml glutaraldehida (25 %) (EM grade)
0,2 ml formalina (25 %)
2,5 ml 0,4 kakodilatnega pufru pH 7,2
Dopolnili z destilirano vodo do 10 ml

- Spiranje s kakodilatnim pufrom (0,1 M, pH 7,2) 5 X 3 min
- Fiksacija II. OsO₄ 1% V 0,1 M kakodilatnemu pufru (v temi) 30 min
- Spiranje s kakodilatnim pufrom (0,1 M, pH 7,2) 5 X 3 min
- Dehidracija etanolu 50 % 3 min
70 % 3 min
80 % 3 min
90 % 3 min
100 % 3 X 3 min
- Prevajanje EtOH /CO₂

- Sušenje CO₂/CPD

Sušenje pri kritični točki CO₂ smo izvedli v napravi za sušenje vzorcev pri kritični točki. Nosilno membrano s posušenim slojem celic smo izrezali iz okvirja koška in jo z ogljikovimi nalepkami pritrdili na kovinske nosilce. Preparate smo prenesli v aparaturo za napraševanje in jih naprašili s platino. Mikroskopirali smo jih z vrstičnim elektronskim mikroskopom FE-SEM JSM-7500F (JEOL, Japonska).

3.3.2.2 Izhodne celice

V naši raziskavi smo si poleg različno starih epitelijev Calu-3 želeli ogledati izhodiščno stanje celic pred nasaditvijo v plastenke z rastnim gojiščem. Za pripravo preparatov izhodnih celic smo uporabili okrogla krovna stekelca (s premerom 10 mm), ki smo jih v kasnejših korakih postopka neposredno pritrdili na nosilce za vrstično elektronsko mikroskopijo.

Na razmaščene krovnike smo nakapljali raztopino alcian modrega z namenom, da bi se celice prilepile na stekelca. Raztopino smo pripravili po sledečem postopku: 0,5 g alcian modrega smo raztopili v 50 ml destilirane vode. Po mešanju smo raztopino centrifugirali (20 min / 10000 g) in supernatant filtrirali skozi 0,2 µm filter. V 5 ml tako pripravljene raztopine smo dodali 50 µl očetne kisline.

Stekelca smo nato večkrat sprali in posušili. Na posušena stekelca smo nanegli suspenzijo celic in jih pustili 20 minut, da so se prilepile na površino. Zatem je sledil postopek fiksacije in sušenja, opisan pri pripravi vzorcev za mikroskopiranje.

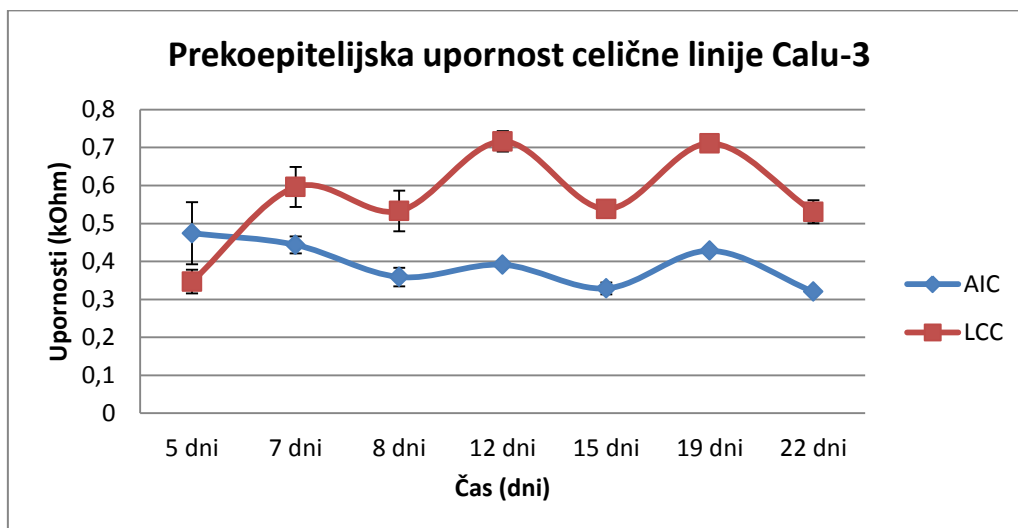
3.3.2.3 »Ranitveni« test

Namen ranitvenega testa je bil spremljanje dinamike zaraščanja vrzeli v celični plasti in s tem strukturnih in funkcionalnih lastnosti celic, vključenih v ta proces. V ranitveni test smo vključili nekaj koškov s celicami, gojenimi v pogojih LCC. Ta je potekal tako, da smo na celičnem sloju Calu-3 s konicami pipetnih nastavkov naredili 3 prostorsko odmaknjene raze. Prvo razo smo naredili 20. dan gojitve celične kulture, drugo razo na drugem mestu pa 21. dan gojitve. Zadnji, 22. dan gojitve, smo 3 ure pred fiksacijo naredili še tretjo razo. Najstarejša raza je bila ob fiksaciji stara torej 2 dni, druga je bila stara 1 dan, tretja in hkrati »najmlajša« pa 3 ure. Tako tretirani preparati so bili nato po standardiziranem postopku pripravljene za mikroskopijo.

4 REZULTATI

4.1 Prekoepitelijska električna upornost celičnega sloja

Namen naloge je bil postaviti vzporednice med standardnim spremljanjem razvoja kulture s pomočjo meritev TEER vrednosti in strukturnim odražanjem na celičnem sloju. Prekoepitelijska električna upornost celičnega sloja se je značilno razlikovala pri dveh načinih gojenja, AIC in LCC (slika 5). Upornosti zaporednih merenj pri obeh pogojih gojenja nihajo. Glede na to, da je nihanje obeh kultur v fazi, gre najverjetneje za vpliv periodike hranjenja kulture, deloma pa tudi na ne povsem nadzorovane pogoje temperature med meritvijo in stanja aparata. Upornost celic gojenih na način AIC je nižja kot pri načinu LCC. Zato nas je zanimalo, če se te razlike odražajo tudi na celičnih strukturah.



Slika 5: Prekoepitelijska upornost celične kulture Calu-3 gojene na način AIC in LCC. Na sliki so prikazane tudi standardne deviacije za vsako meritev.

4.2 Mikroskopiranje

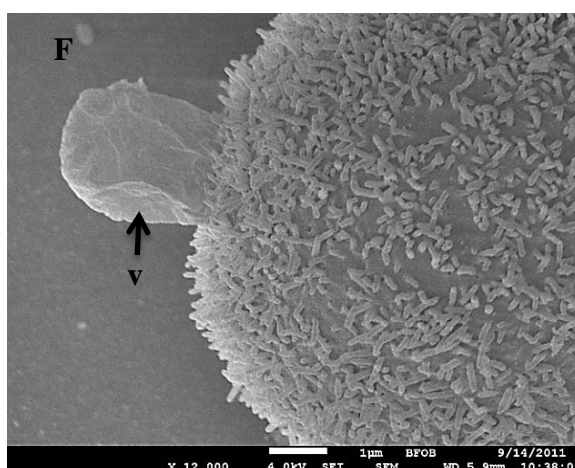
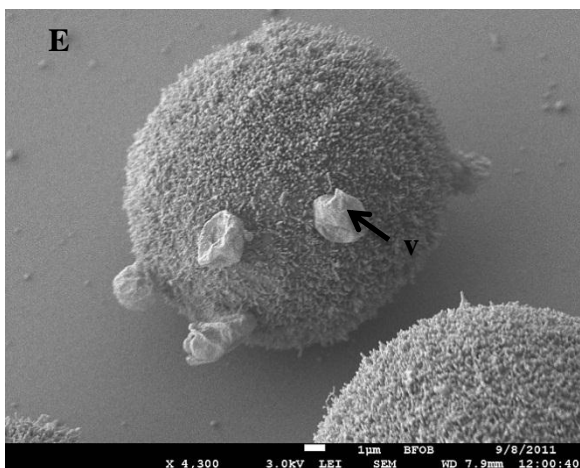
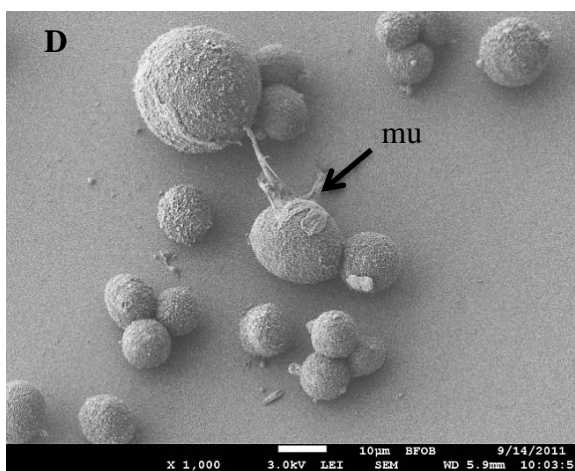
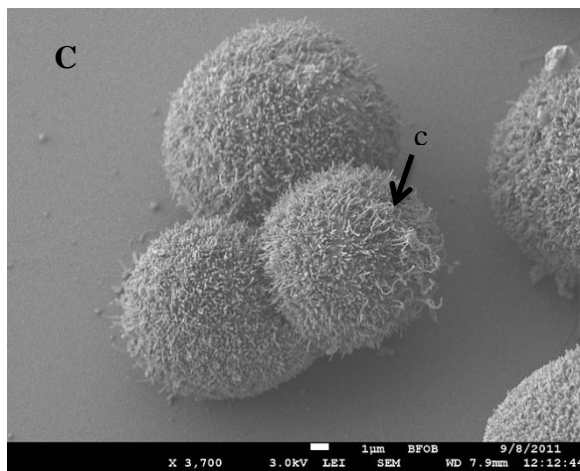
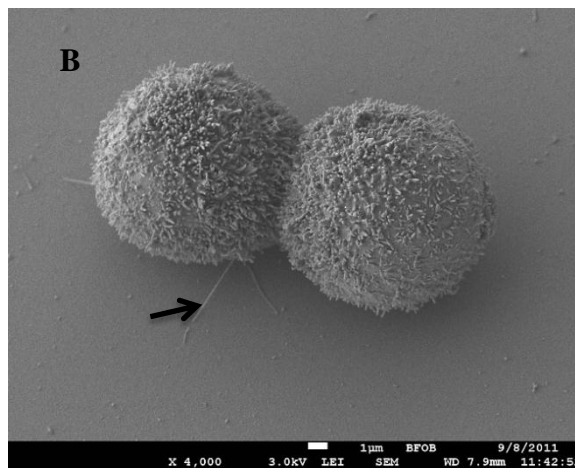
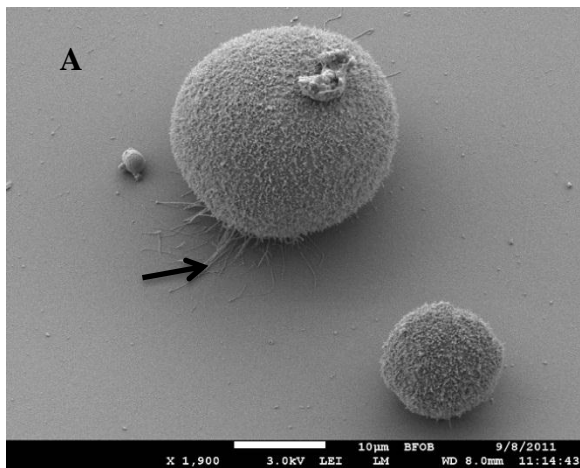
S pomočjo vrstičnega elektronskega mikroskopa smo opazovali površino celic, da bi opredelili strukturne spremembe na površini celic linije Calu-3, ki so nastale z razvojem kulture. S tem bi določili potek diferenciacije teh celic v odvisnosti od pogojev gojenja. Spremljali smo razvoj modela celičnega epitelijskega vzporedno ob gojenju na način AIC in LCC. Mikroskopirali smo kulture pri starostih 5, 8, 12, 15 in 22 dni. Ogledali smo si izhodne celice, da bi videli začetno »stanje« celic pred vzpostavitvijo celične kulture. Na koncu smo s pomočjo ranitvenega testa preverili površinske strukturne spremembe celic na rastnem robu ob zaraščanju vrzeli med celicami.

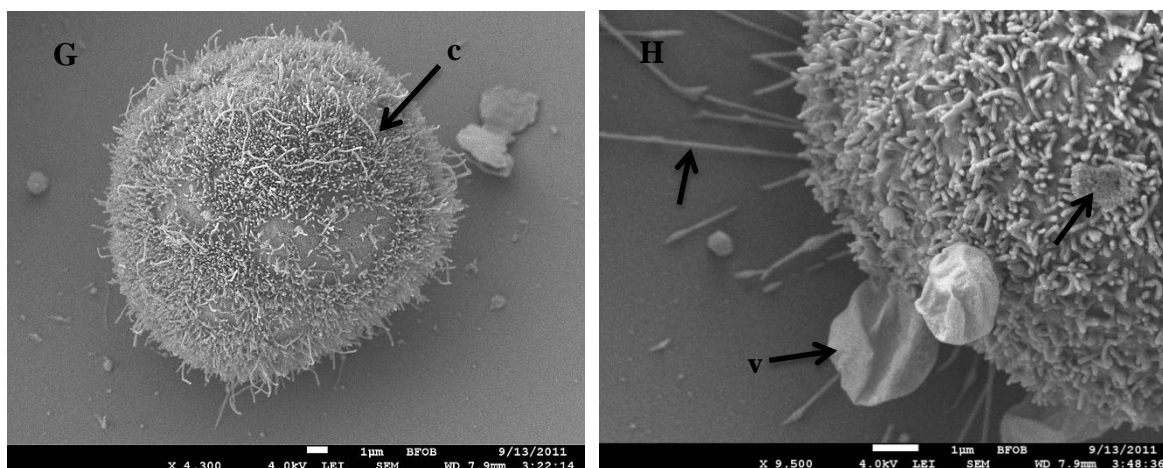
V okviru diplomske naloge smo iz treh poskusnih serij pripravili 42 vzorcev za vrstično elektronsko mikroskopijo ter posneli 760 SEM mikrografij. V rezultatih predstavljam reprezentativni izbor posnetkov. Za razliko od virov, ki kažejo mikrografije samo pri večjih povečavah, vsebuje naš izbor tudi posnetke, narejene pri manjših povečavah. Priraščenost celičnega sloja na togo podlago ter medsebojna tesna sklenjenost celičnega sloja sta vzrok za razpoke različnih širin, ki so vidne na večini mikrografij. Ti artefakti so domnevno nastali v postopku priprave preparatov. Razpoke v večini primerov potekajo po robovih celic, kar nam odpira možnosti nadaljnjih raziskav lastnosti celičnih povezav.

4.2.1 Izhodne celice

Kot izhodno stanje celic celične kulture smo pregledali sveže odmrznjene celice celične linije Calu-3, s kakršnimi začenjamo poskusno serijo. Celice kažejo površinske značilnosti kulture pred saditvijo. Celično suspenzijo pred saditvijo sestavljajo celice, ki so bile izpostavljene delovanju tripsina in zamrzovanju, kar bi lahko vplivalo tudi na poškodovanost nekaterih celic.

Celice so bile videti nepoškodovane, kroglaste in različnih velikosti (slika 6). Vse celice so že pokrivali mikrovili, pri nekaterih smo opazili tudi daljše izrastke (sliki 6C in 6G). Pri nekaterih celicah smo opazili izrastke s katerimi so se pritrjale in razširjale po podlagi (slike 6A, 6B in 6H). Veliko celic je imelo na svoji površini večje število praznih mešičkov (slike 6A, 6B in 6H). Veliko celic je imelo na svoji površini večje število praznih mešičkov (slike 6E, 6F in 6H). Njihova oblika je najverjetneje artefakt priprave preparatov. Na nekaterih celicah so vidni ostanki, ki bi lahko bili notranjost izlitih mešičkov (slika 6H).

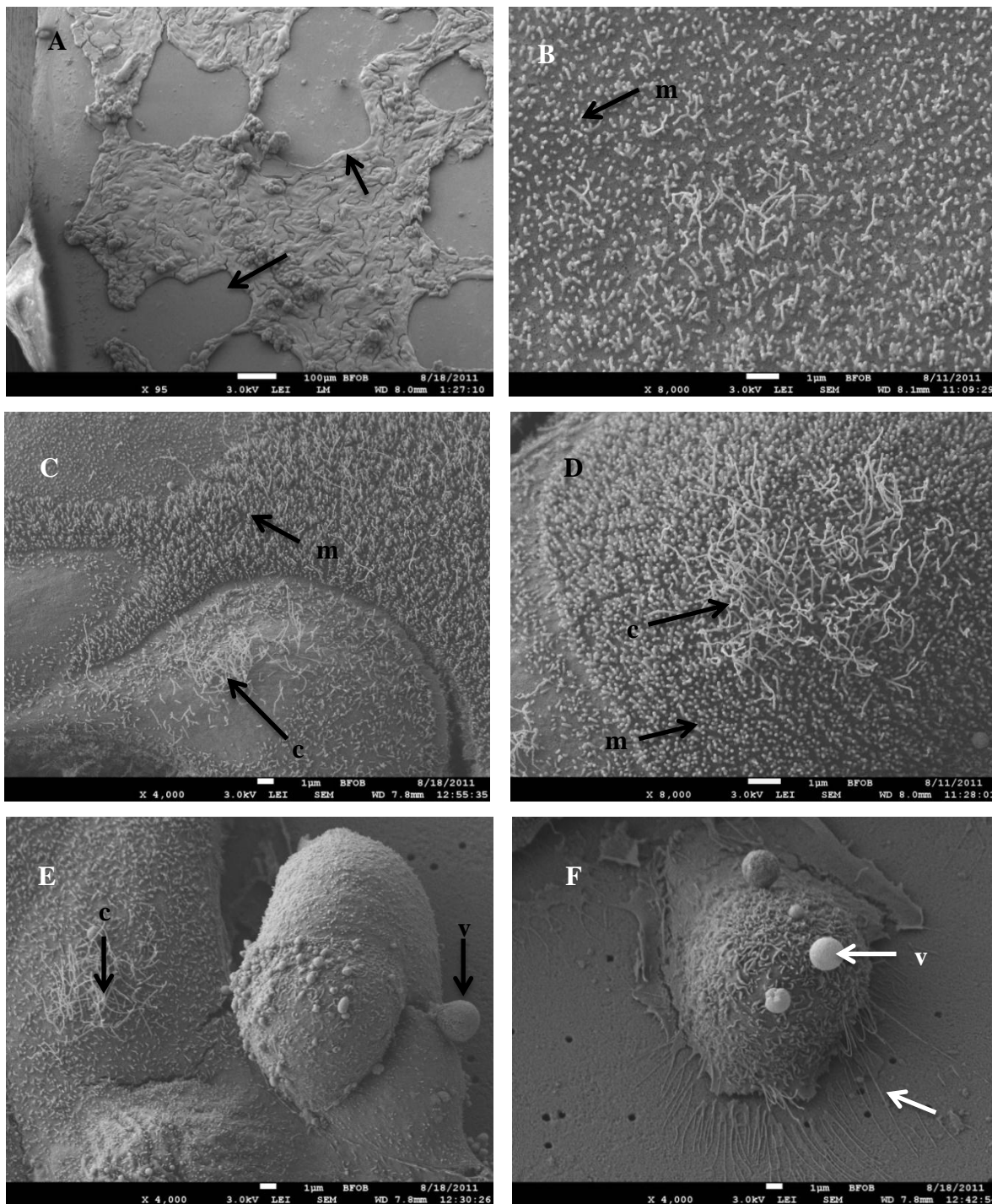




Slika 6: SEM mikrografije sveže odmrznjenih celic celične linije Calu-3. Na vseh slikah vidimo, da površino celic preraščajo mikrovili in nekateri še daljši, cilijam podobnimi izrastki (c). Z nekaterimi izrastki se celice pritrdjajo na površino, kar je razvidno iz slik A, B in H (puščice v omenjenih slikah). Na sliki D je na površini opazna mukusu podobna struktura (mu). Na slikah E, F in H so na celičnih površinah prisotne vezikularne strukture (v), na površini celice na sliki H pa lahko opazimo ostanek notranjosti take strukture (puščica). Merilce pod slikama A in C predstavlja 10 μm , pod ostalimi pa 1 μm .

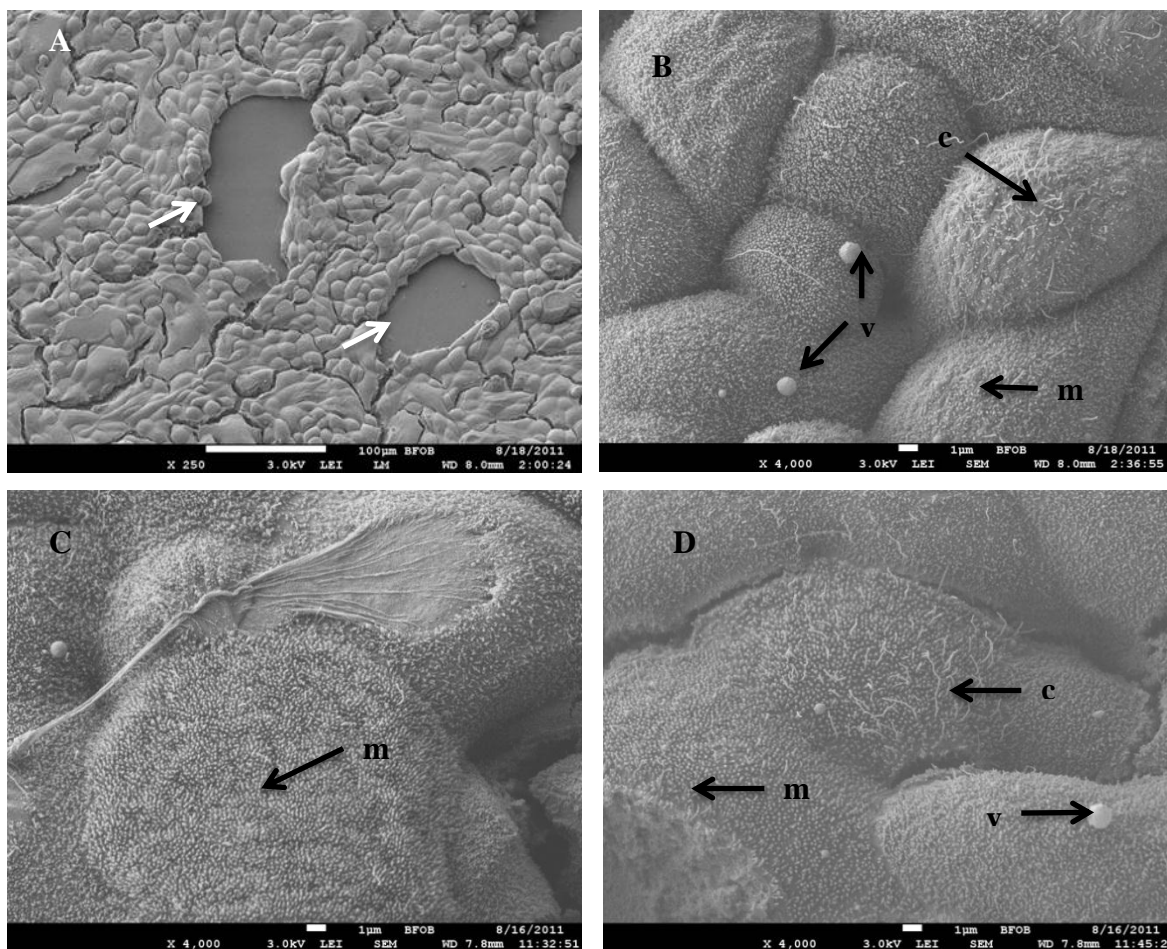
4.2.2 Strukturne spremembe površine celic gojenih na način LCC

Po petih dneh gojitve na način LCC celice še niso v celoti prerasle membrane (slika 7A). Celice so bile med seboj precej raznolike. Veliko celic so pokrivali krajši mikrovili (slike 7B, 7C in 7D), na nekaterih so bili opazni daljši izrastki (slike 7C, 7D in 7E). Na površini celic smo opazili tudi večje število vezikularnih struktur (slike 7E in 7F).



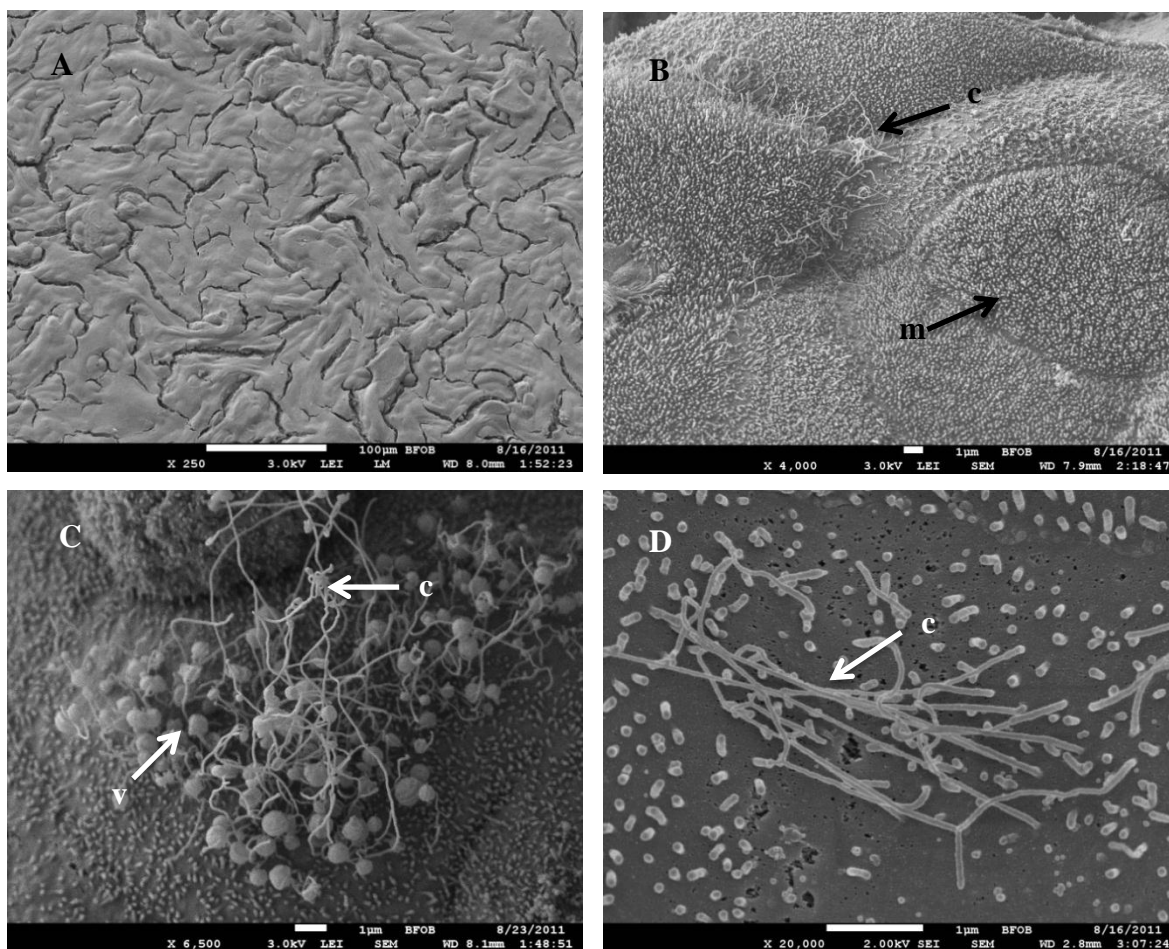
Slika 7: SEM mikrografije celične kulture gojene v pogojih LCC, 5 dni po saditvi. Na sliki A se vidi razrast celic po membrani z nepreraščenimi predeli. Izrazite epiteljske strukture – mikrovili (m) - so na sliki B. Prav tako so celice pokrite z mikrovili na slikah C, D in E, kjer se lepo vidi variabilnost v poraščenosti površin celic, daljši izrastki bi bili lahko cilije (c). Na slikah E in F so na površini celic opazne vezikularne strukture (v). Na sliki F so vidni tudi izrastki, s katerimi se celica pritrdja na podlago (puščica). Merilce pod sliko A predstavlja 100 μm, pod ostalimi 1 μm.

Po osmih dneh gojenja celic v pogojih LCC je bila površina membrane koška bolj poraščena, vendar celice še vedno niso dosegle konfluentnosti (slika 8A). Na površinah celic smo opazili večje število daljših mikrovilov (slike 8B – D), variabilnost pokritosti celic z mikrovili je bila še vedno zelo velika. Ponovno so bili opazni daljši izrastki (sliki 8B in 8D) in vezikularne strukture (slike 8B – D).



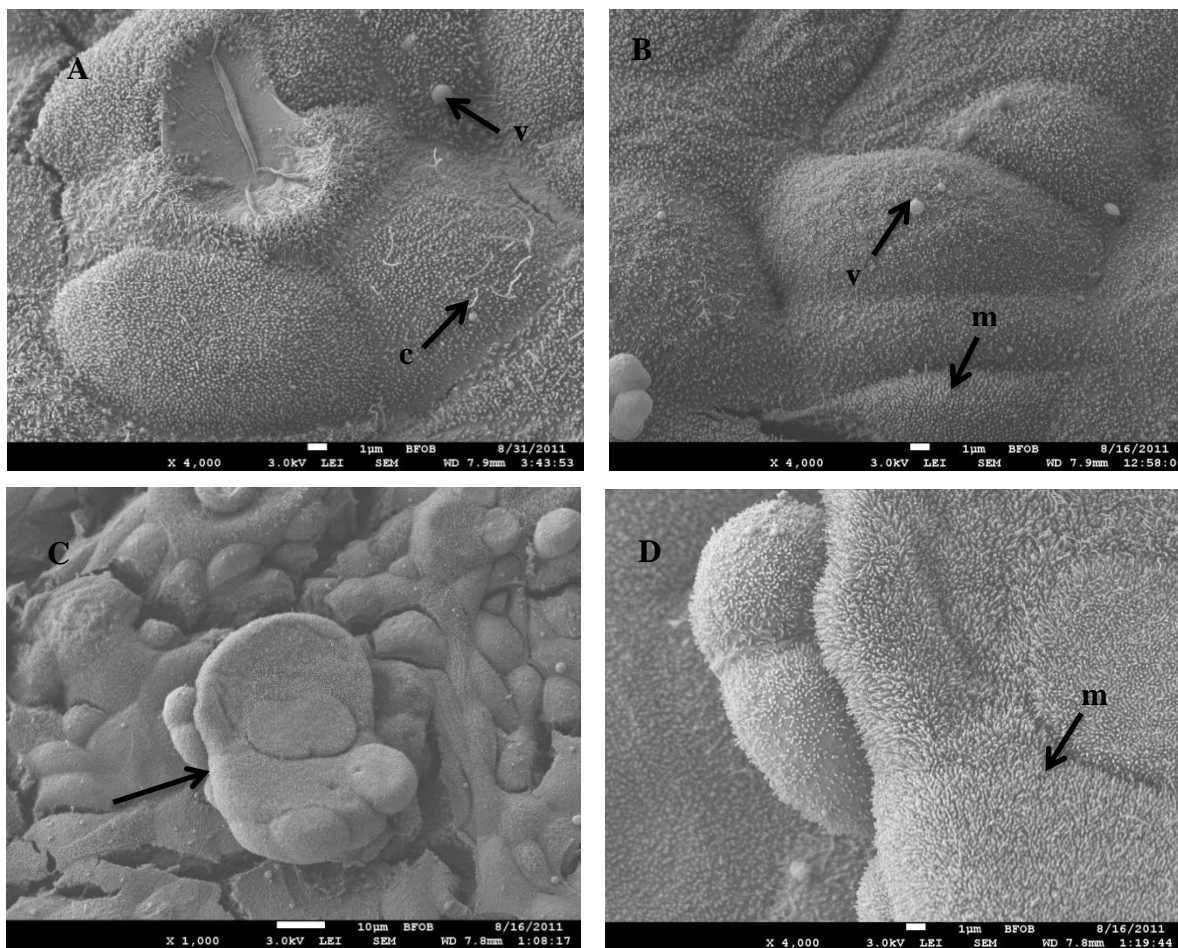
Slika 8: SEM mikrografije celične kulture gojene v pogojih LCC, 8 dni po saditvi. Na sliki A vidimo nepopolno pokritost membrane s celicami Calu-3. Mikrovili (m) na slikah B, C in D so postali gostejši in daljši. Ponovno so vidni posamezni daljši, cilijam podobni izrastki (c) (sliki B in D). Na slikah vidimo tudi vezikularne strukture (v). Merilce pod sliko A predstavlja 100 µm, pod ostalimi predstavljajo merilca 1µm.

Po 12 dneh gojitve so celice v večji meri dosegle konfluentno prekritost površine (slika 9A). Očitno je, da celice v celoti preraščajo membrano. S starostjo celic se je povečalo število in gostota mikrovilov ter razlike med celicami (diferenciacija) (sliki 9B in 9C).



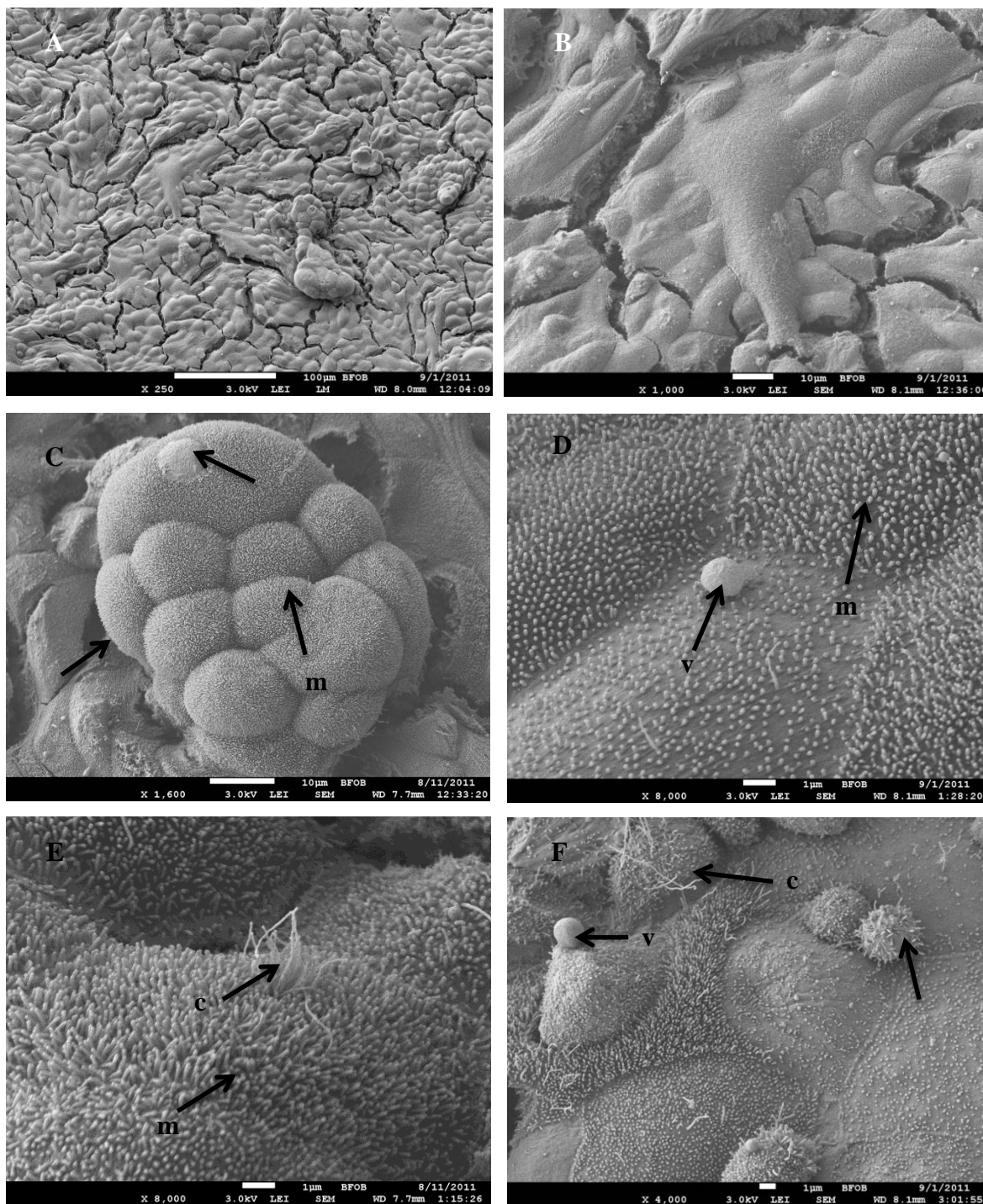
Slika 9: SEM mikrografije celične kulture gojene v pogojih LCC, 12 dni po saditvi. Slika A kaže, da so celice dosegle konfluentnost, to je stanje, ko celice v celoti prekrivajo membrano. Variabilnost v epitelijskih izrastkih na celicah vidimo na sliki B, na slikah C in D pa so izrazito daljši izrastki, ki bi lahko bili cilije (c). Slika C poleg daljših struktur prikazuje večje število vezikularnih struktur (v). Merilce pod sliko A predstavlja 100 μm , pod ostalimi slikami 1 μm .

Po 15 dnevem gojenju je pokritost celične membrane podobna kot pri starosti 12 dni, a je tukaj že bolj opazna tudi razrast celic v višino (sliki 10C in 10D).



Slika 10: SEM mikrografije celične kulture gojene v pogojih LCC, 15 dni po saditvi. Celice so tukaj že bolj razrasle in višje, kar je najbolj izrazito na slikah C in D. Mikrovili (m) gosto poraščajo celice, ponovno so opazne vezikularne strukture (v), ki jih lahko vidimo na slikah A in B, ter daljši izrastki (c), opazni na sliki A. Merilce pod sliko C predstavlja 10 µm, pod ostalimi 1 µm.

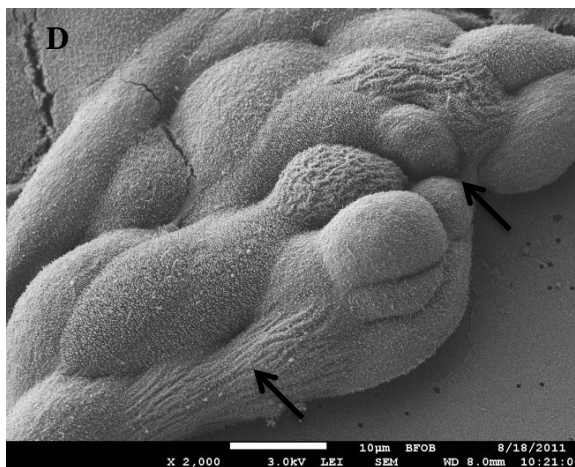
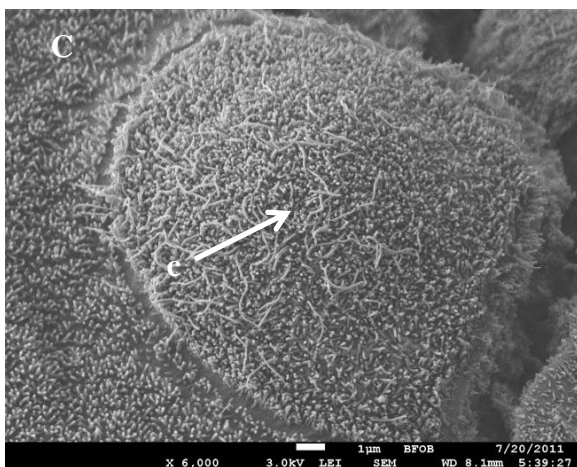
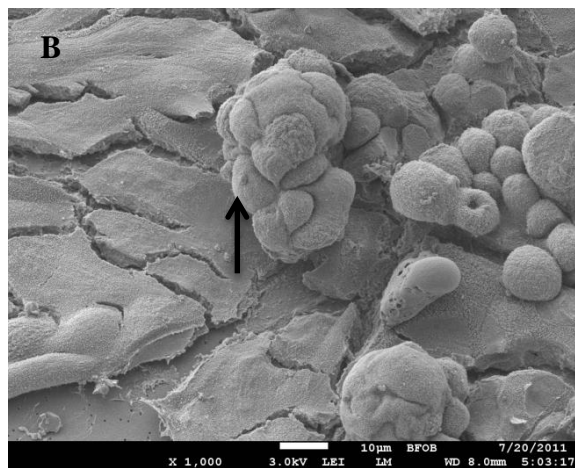
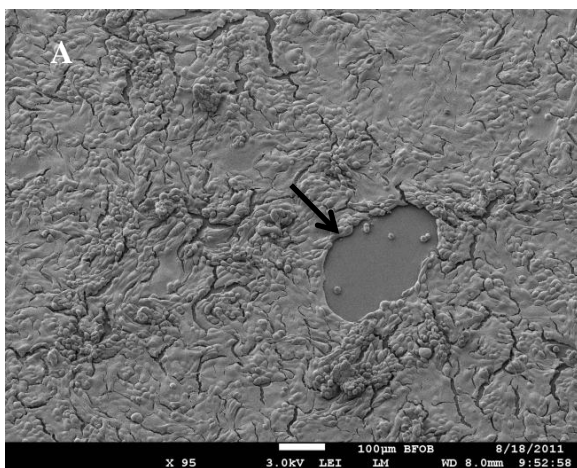
Po 22 dneh gojenja v pogojih LCC imajo celice na svoji površini gosto izražene mikrovile (sliki 11D in 11E), tudi variabilnost med posameznimi celicami je velika (sliki 11C in 11F).

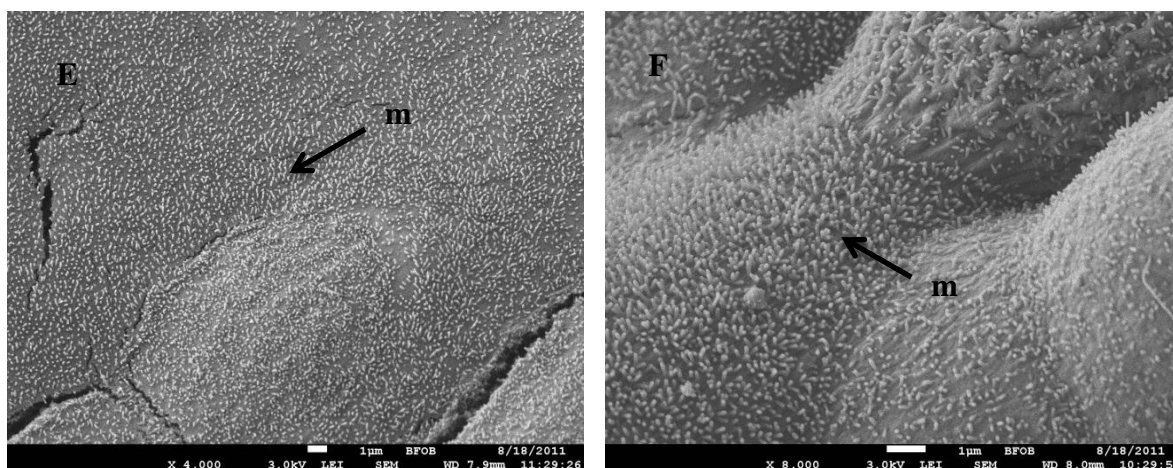


Slika 11: SEM mikrografije celične kulture gojene v pogojih LCC, 22 dni po saditvi. Celice izraščajo v višje plasti (sliki A in C). Pokritost celic s strukturami je še vedno zelo variabilna, pojavljajo se različni vzorci v porasti celic (sliki C in F). Ponovno je na površini precej vezikularnih struktur (v) (sliki D in F) in daljših, cilijam podobnih izrastkov (c) (sliki E in F). Merilce pod sliko A predstavlja 100 µm, pod slikama B in C 10 µm, pod slikami D, E in F 1 µm.

4.2.3 Strukturne spremembe površine celic gojenih na način AIC

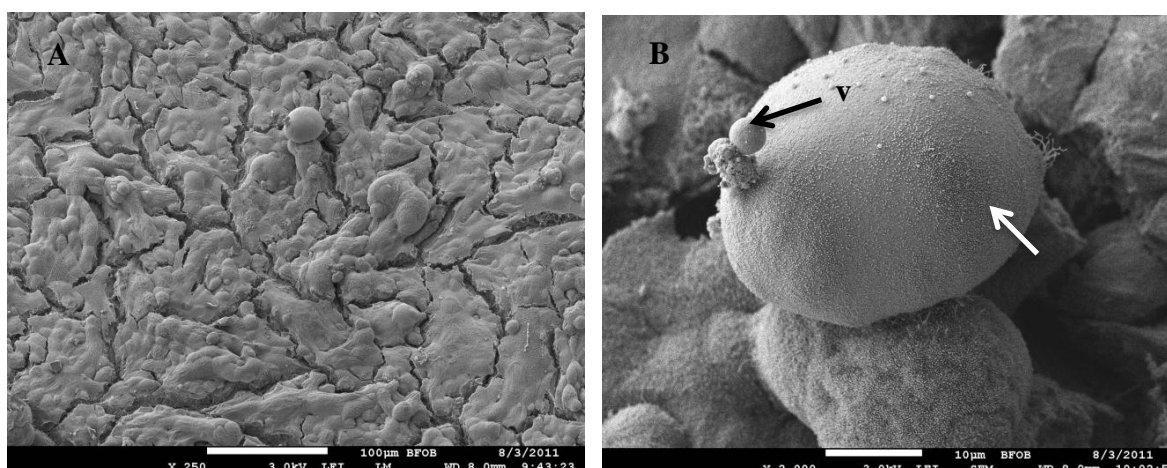
Pri gojenju celic na način AIC so po 5 dneh gojitve preraščale že večino površine rastne membrane (slika 12A). Poleg krajših izrastkov so bili na površinah celic opazni tudi daljši izrastki (slika 12C). Celice so se že razraščale tudi v višino (sliki 12B in 12D).

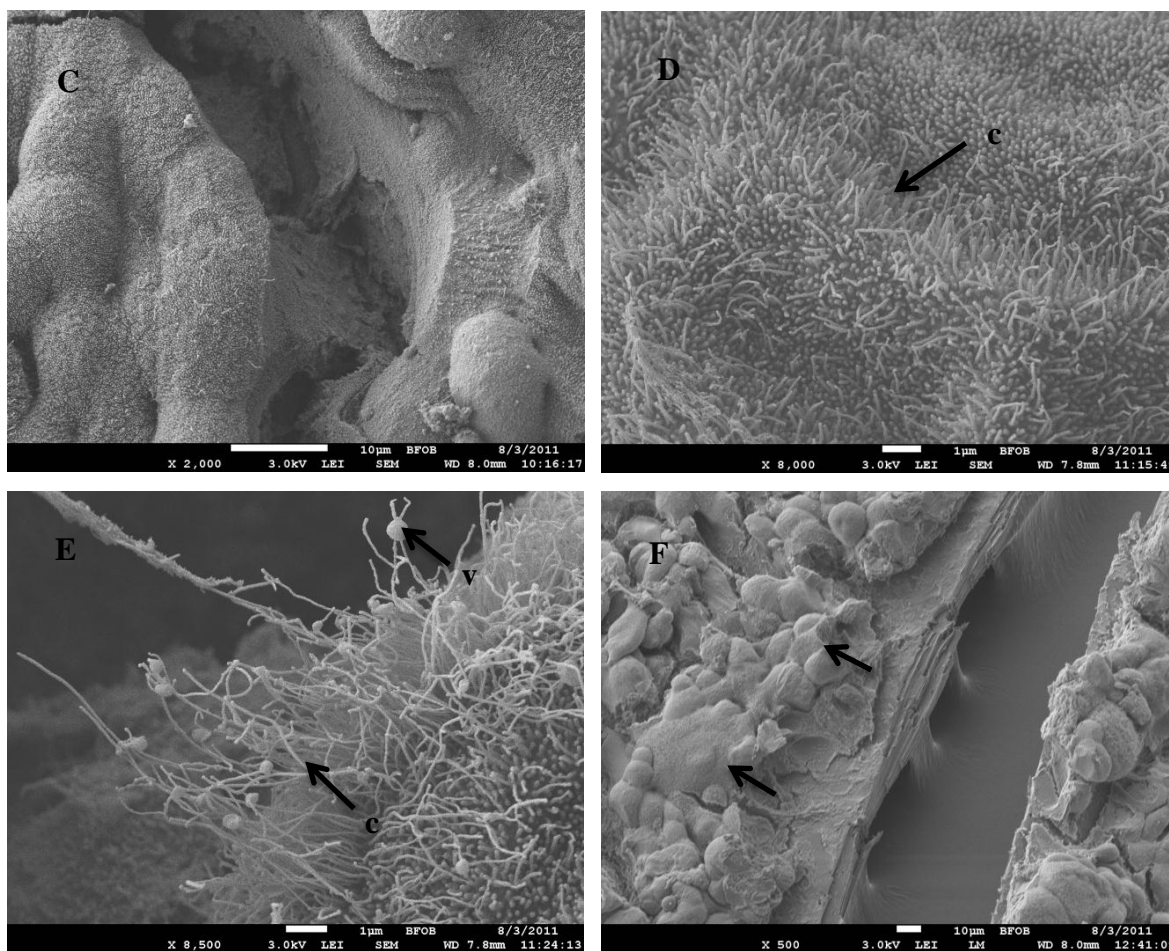




Slika 12: SEM mikrografije celične kulture gojene v pogojih AIC, 5 dni po saditvi. Celice še niso dosegle konfluentnosti, kar je razvidno iz neporašenih območij (puščica) na sliki A. Na slikah E in F vidimo, da so nekatere celice prekrivali krajši mikrovili (m), druge celice pa daljši izrastki (c) (slika C). Slike B, D in F prikazujejo celično razrast, slika D prikazuje robne celice ob neporašeni površini. Merilce pod sliko A predstavlja 100 µm, pod slikama B in D 10 µm, pod ostalimi 1 µm.

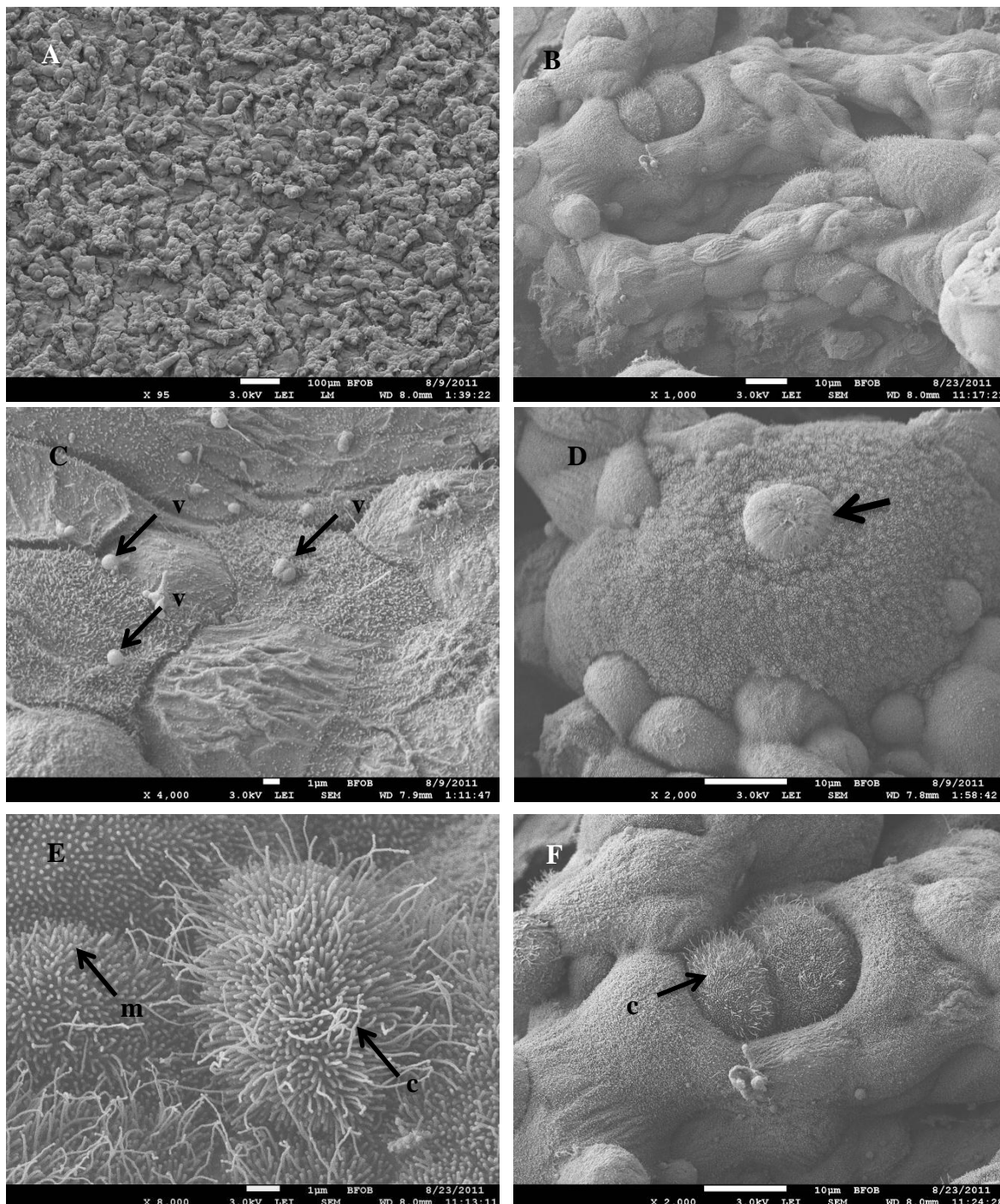
Po 8 dneh gojitve opazimo, da so celice dosegle konfluentno razrast (slika 13A). Poraščenost površine celic z mikrovili je zelo raznolika (slike 13B – E). Celice se vedno bolj razraščajo v višje plasti (sliki 13C in 13F). Na prisotnih razpokah ni več opaziti rastne podlage, kar bi lahko pomenilo, da so celice naložene v več plasteh (slika 13C). To bi lahko sodili tudi po stranskem videzu prerezane kulture (slika 13F). Prerez smo napravili z britvico pred fiksacijo in pripravo preparata za elektronsko mikroskopijo.





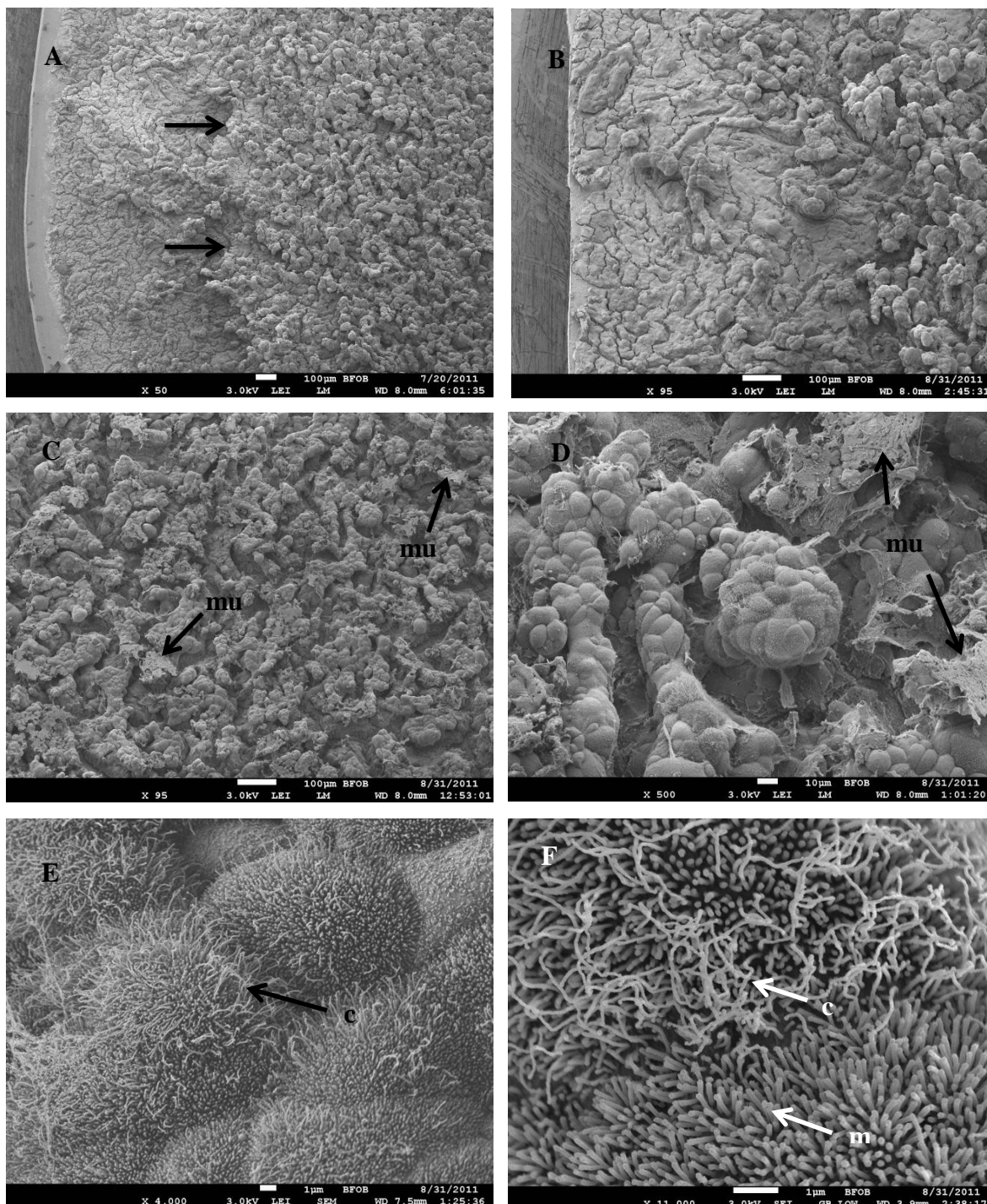
Slika 13: SEM mikrografije celične kulture gojene v pogojih AIC, 8 dni po saditvi. Na sliki A je vidna v celoti poraščena membrana gojitvenega koška s celicami, ki se razraščajo v višino. Slika B prikazuje celico dvignjeno nad ravnino drugih celic (puščica). Razpoka na sliki C ne razkriva dna oz. rastne membrane. Sliki D in E prikazujeta gosto poraščenost površine celic z daljšimi izrastki (c), na sliki E je tudi večje število vezikularnih struktur (v). Razrast celic v več plasteh je opazna na prerezu skozi celice na sliki F. Merilce pod sliko A predstavlja 100 μm, pod slikama B in C 10 μm, pod D, E in F 1 μm.

Po 12 dneh gojitve je raznolikost v razrasti vedno večja, vedno bolj izrazita je tudi poraščenost celičnih površin (slike 14D – F). Na površini celic je večje število vezikularnih struktur (s premerom nekaj μm) (slika 14C) .



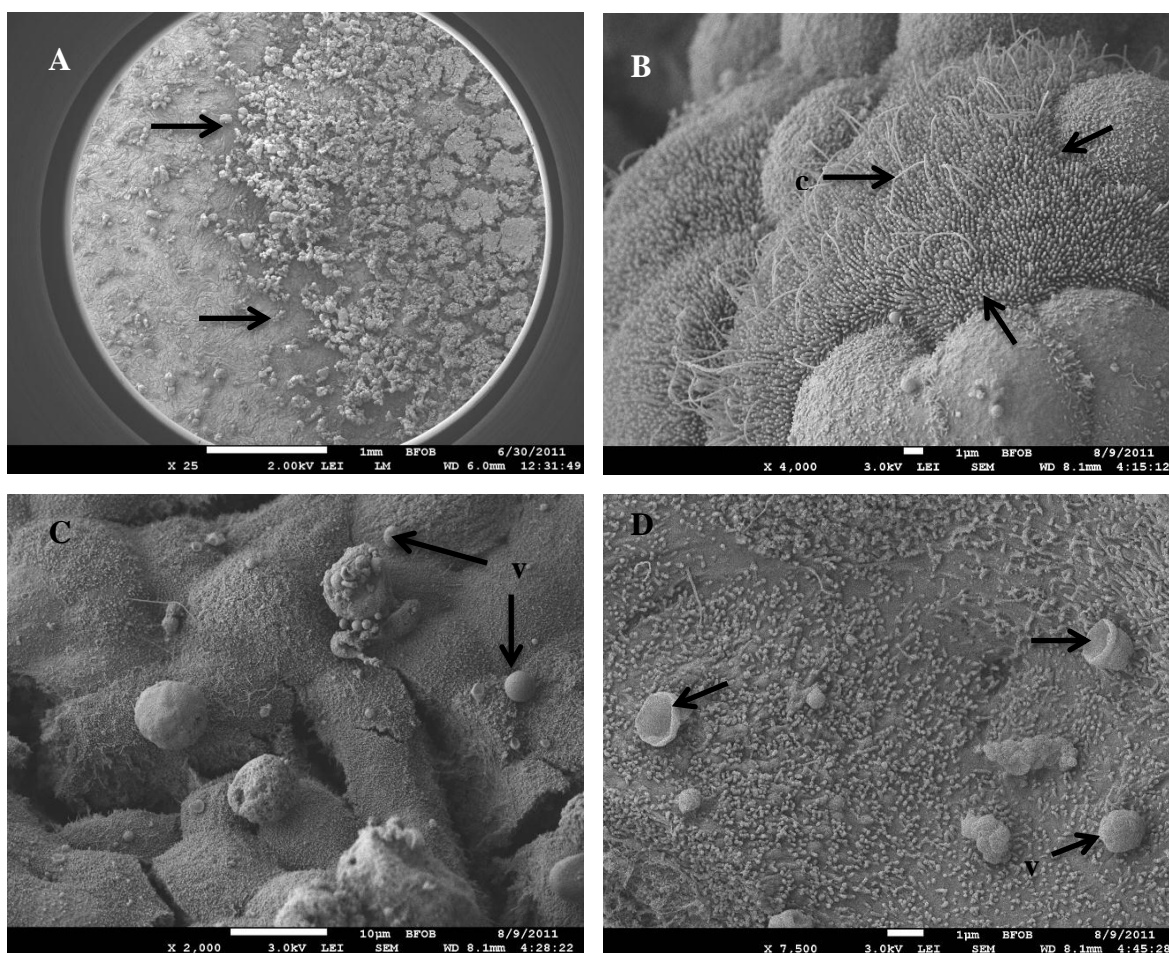
Slika 14: SEM mikrografije celične kulture gojene v pogojih AIC, 12 dni po saditvi. Na slikah je lepo razvidna vedno večja razrast celic z različnimi vzorci epitelnih izrastkov na celični površini (slike D, E in F). Na sliki C je večje število vezikularnih struktur (v). Merilce pod sliko A predstavlja 100 μm , pod slikami B, D in F 10 μm , pod slikama C in E 1 μm .

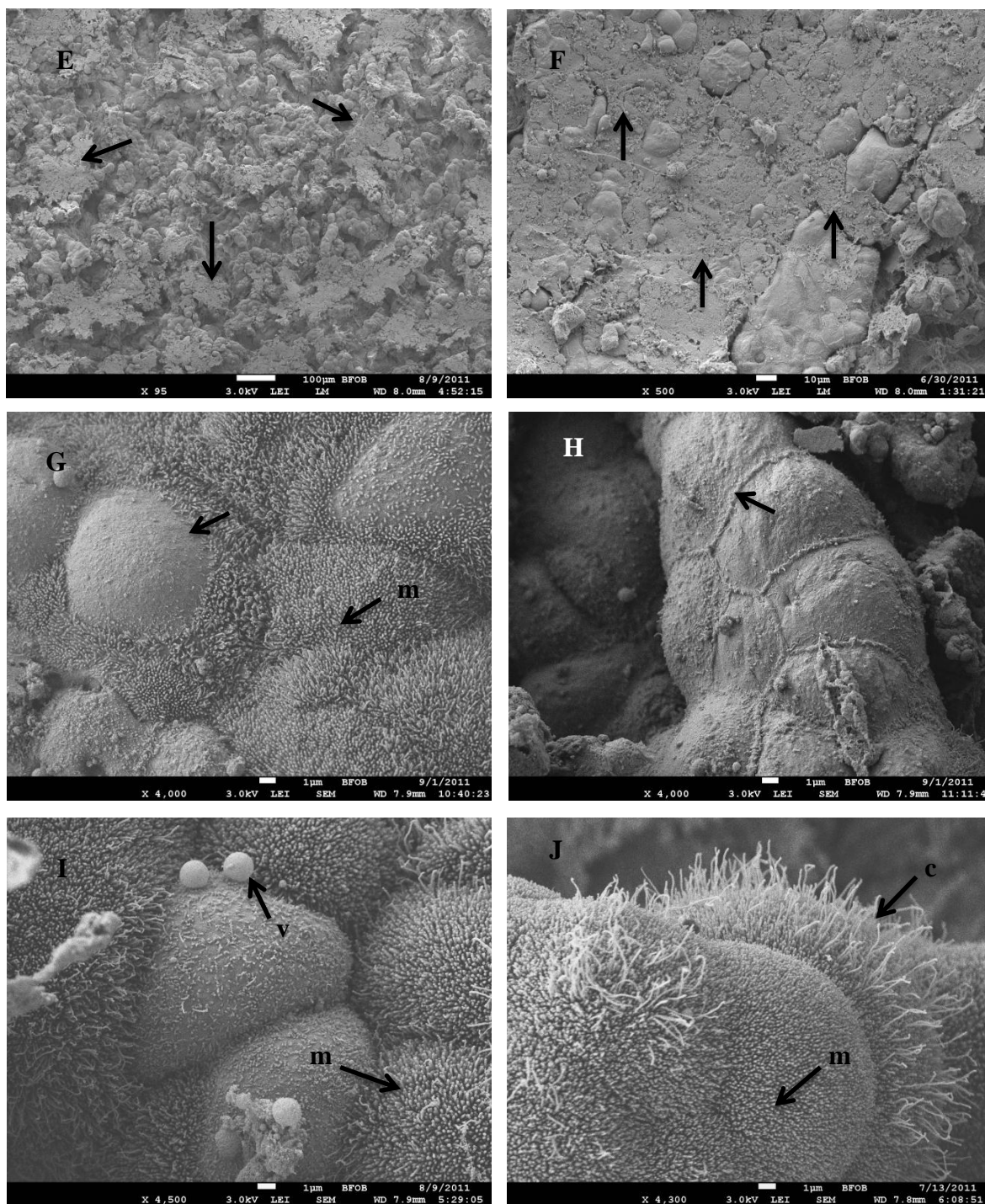
15 dni po saditvi je opazna značilna obročasta oblika v bližini zunanlega roba rastne površine, kjer so celice razraščene višje kot na ostalih delih vzorca (sliki 15A in 15B). Površina celic je precej porasla z mikrovili in daljšimi izrastki, ki bi lahko bile cilije (sliki 15E in 15 F). Ponekod je na površini celic opazen mukus (sliki 15C in 15D).



Slika 15: SEM mikrografije celične kulture gojene v pogojih AIC, 15 dni po saditvi. Sliki A in B prikazujeta »obroč« višje rastočih celic ob zunanjem robu. Na slikah C in D je opaznega kar nekaj mukusa (mu) na površini celic. Bogata poraščenost celičnih površin je prikazana na slikah E in F. Merilce pod slikami A – C predstavlja 100 µm, pod sliko D 10 µm, pod slikama E in F 1 µm.

Po 22 dneh rasti so celice dosegle močno razrast v višje plasti (sliki 16A in 16H), na slikah lahko vidimo, da nekatere preraščajo spodaj rastoče celice (slika 16B). Tudi tukaj je zelo izrazit pas višje rastočih celic (slika 16A). Poleg značilno poraslih celic z mikrovili smo opazili še veliko drugačnih morfoloških tipov. Nekatere celične površine so skorajda gole (slika 16H), druge pa zelo bogato porasle, tako z mikrovili kot z daljšimi, cilijam podobnimi izrastki (sliki 16B in 16J), spet tretje imajo neporasčen le del apikalne površine (slika 16G). Na veliko mestih so prisotne vezikularne strukture, opazamo pa veliko praznih membranskih mešičkov – najverjetneje ostankov počenih vezikularnih struktur (sliki 16C in 16D). Mukus je bil prisoten na več mestih, pri nekaj vzorcih pa prekriva skoraj celotno površino celic (sliki 16E in 16F).



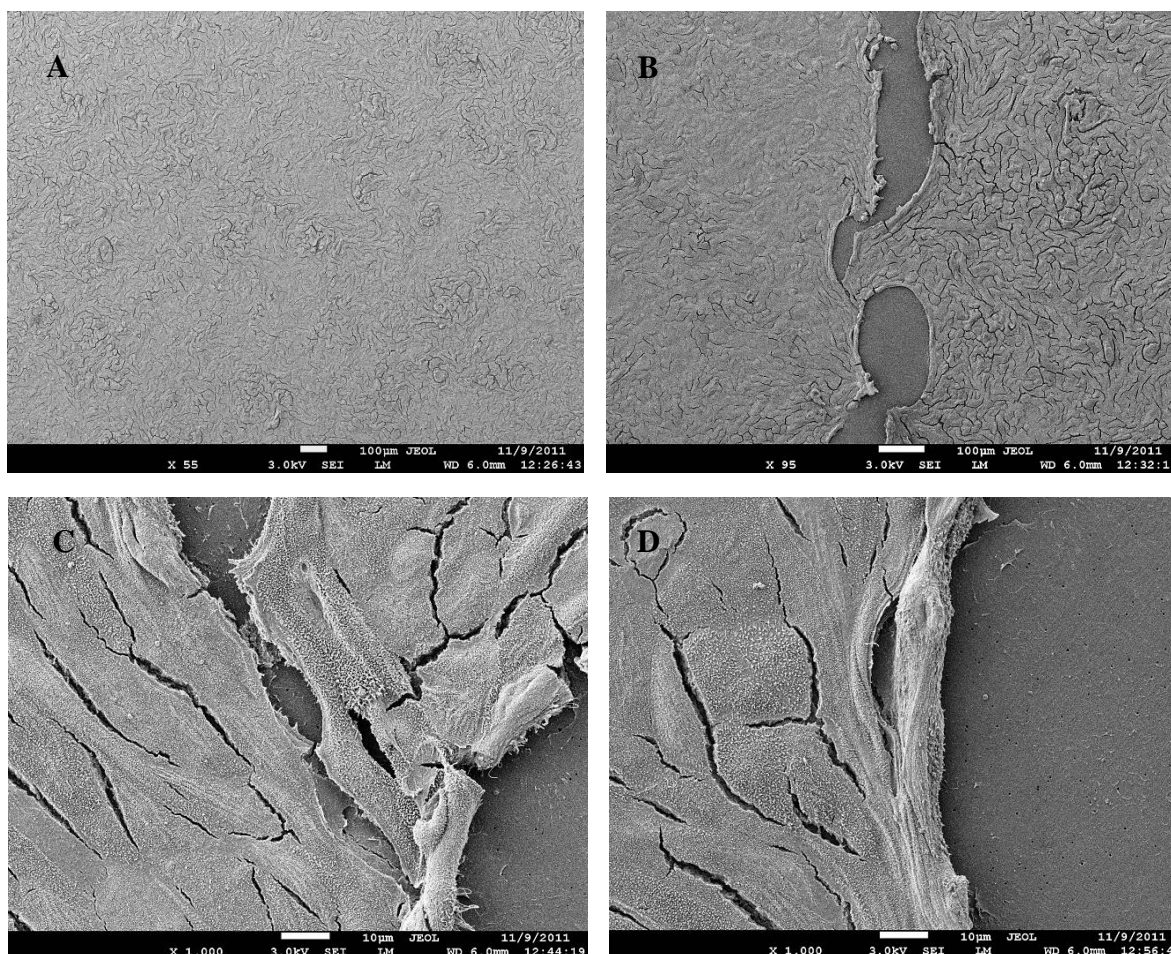


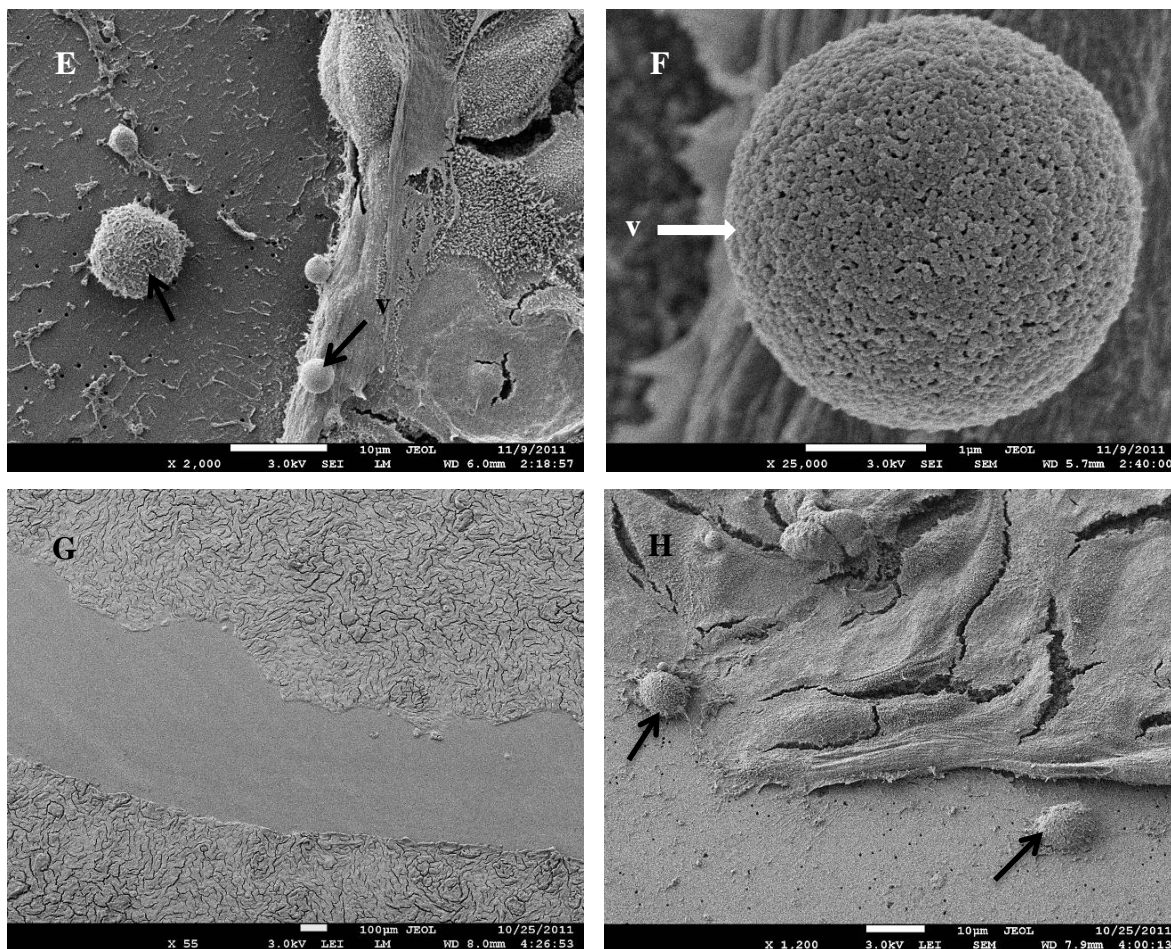
Slika 16: SEM mikrografije celične kulture gojene v pogojih AIC, 22 dni po saditvi. Slika A prikazuje obrobni »obroč« višje rastočih celic. Vezikularne strukture in celice na površini kulture lahko vidimo na slikah C in I (puščice), ostanke mešičkov pa na sliki D (puščice). Površino celic je na manj spranih vzorcih prekrival mukus, kar je razvidno na slikah E in F (puščice). Na ostalih slikah (B, G, H, I in J) je prikazana velika raznolikost v gostoti in tipu epitelnih struktur na celični površini. Merilce pod sliko E predstavlja 100 µm, pod slikama C in F 10 µm, pod ostalimi 1 µm.

4.2.4 »Ranitveni« test

Na kulturah v pogojih LCC smo spremljali proces zaraščanja načrtno povzročenih raz v celičnem sloju. Prvo razo smo povzročili 20. dan gojitve celične kulture, vsako naslednjo pa z enodnevnim zamikom. Najstarejša raza je bila v času fiksacije stara 2 dni in je bila v celoti zaceljena (slika 17A). Na preparatih nismo našli znakov, ki bi jih lahko povezovali s poškodbo. Celice so v tem času v celoti zapolnile vrzel in se niso razlikovale od okoliških celic.

Razo, ki smo jo naredili dan pred fiksacijo smo na preparatih še lahko opazovali. Tukaj je bil proces zapolnitve vrzeli najbolj značilen. Celice so se na robovih ob prosti podlagi odebelile in začele postopoma zapolnjevati prosti del (slike 17B – D). Ponekod na robu je opaznih nekaj samostoječih celic (slika 17). Najverjetneje gre za na novo odcepljene, migrirajoče mlade celice iz epitelijskega tkiva proti prazni podlagi.





Slika 17: SEM mikrografije celične kulture gojene v pogojih LCC prikazujejo proces zaraščanja. Na sliki A je prikazano mesto, kjer je bil narejena prva raza, ki se je že v celoti zacelila. Slike B, C, D, E in F prikazujejo 1 dan staro razo. Ta je na določenih delih že zaceljena, značilni so odebeljeni robovi ob še neporaščeni površini. Na neporaščnem delu vidimo tudi nekaj samostojnih celic (puščica) (slika E), ob robu pa tudi posamezne vezikularne strukture (v) (sliki E in F). Sliki G in H prikazujeta nekaj ur staro razo. Ta ima še sveže poškodovane robove, ponekod so že opazne posamezne celice, ki se razširjajo po prosti podlagi (slika H). Merilce pod slikami A, B in G predstavlja 100 μm, pod slikami C, D, E in H 10 μm, pod sliko F 1 μm.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 Prekoepitelijska električna upornost

Izmerjene vrednosti prekoepitelijske električne upornosti celičnega sloja Calu-3 so bile pri celicah, gojenih na način AIC nižje kot pri gojenju na način LCC. V naši raziskavi so bile te razlike manjše, kot v nekaterih predhodnih merjenjih, vendar so bila izmerjena odstopanja v isto smer (Grainger in sod., 2006). Razlike v upornosti pomenijo različne ionske tokove v tekočini med apikalno in bazalno stranjo. Ovira toku ionov so lahko povezave med celicami, zlasti tesni stiki, debelina celičnega sloja in mukusna plast. Pri gojenju na način AIC in LCC se oblikuje celični sloj različne debeline in različno debele mukusne plasti. Glede na to, da so tokovi manjši pri gojenju v pogojih LCC navkljub tanjšemu celičnemu sloju in odsotnosti izrazitega mukusnega sloja lahko sklepamo na večjo urejenost tesnih stikov pri tako gojenih celicah, s čimer ti prispevajo največji delež izmerjene upornosti. Te ugotovitve potrjujejo nekatere raziskave, kjer so dokazali višjo koncentracijo proteina ZO-1, ki je prisoten v tesnih stikih, pri gojenju v pogojih LCC (Grainger in sod., 2006). Prav tako so nekatere raziskovalne skupine ugotovile, da je prehajanje testnih učinkovin skozi kulturo, gojeno v pogojih LCC, počasnejše kot v primeru pogojev AIC (Cooney in sod., 2004).

5.2 Mikroskopiranje

5.2.1 Izhodne celice

Z mikroskopiranjem izhodnih celic smo dobili vpogled v izgled celic pred nasaditvijo v kulturo. Vse celice so imele izrazite površinske strukture, ki so značilne za kasnejši epitelij. Celice so pokrivali mikrovili, nekatere tudi daljši, cilijam podobni izrastki (slika 6). To kaže, da so vse te morfološke strukture prisotne že pri rasti v osnovni kulturi, s katero namnožimo celični material pred saditvijo na prepustne membrane, in da se med tripsinizacijo ohranijo v znatni meri. Zanimive so najdbe vezikularnih struktur na površini celic in mestoma prisoten mukus, na podlagi katerih bi lahko sklepali na zmožnost

izražanja značilnosti mukusnih in migetalčnih celic epitelijskega tkiva že pri sveže odmrznjenih celicah. Ker nediferenciranih celic v kulturi nismo opazili, sklepamo, da v izhodni kulturi prevladujejo epitelijske celice z zmožnostjo izražanja različnih strukturnih in fizioloških znakov, ki se v svojem izrazu prilagajajo danim razmeram.

5.2.2 Primerjava med LCC in AIC

Po pregledu naših vzorcev bi lahko izpostavila nekaj glavnih vzporednic in razlik med dvema načinoma gojenja epitelijskega tkiva Calu-3. Celice so si v začetnih dneh rasti podobne, pri obeh načinih izražajo površinske epitelijske strukture, mikrovile. Kljub različnemu načinu gojenja lahko na slikah 7D in 12C vidimo zelo veliko podobnost pri pojavljanju mikrovilarnih epitelijskih struktur na apikalni površini celic.

Po tednu rasti so razlike med načinoma gojenja vedno opaznejše. V tem času celice v obeh pogojih gojenja dosežejo konfluentno razrast. Pri rasti v pogojih AIC se celice povzpnejo v višino, v nekaterih primerih celice rastejo že v več plasteh (sliki 14A in 14B). Pri gojenju v pogojih LCC so celice v ravnini in bolj homogene (slika 9A).

V nasprotju z navajanjem virov (Grainger in sod., 2006) smo daljše izrastke podobne cilijam, opazili pri obeh načinih gojenja, zlasti pri kulturah, gojenih dalj časa. To nakazujejo slike 9A in 11E za celice, gojene v pogojih AIC, ter 14E in 15F za celice, gojene v pogojih LCC. V skladu s predhodnimi ugotovitvami (Grainger in sod., 2006) smo sicer tudi mi opazili več cilijam podobnih izrastkov pri gojenju v pogojih AIC. Za potrditev, da so strukture res cilije, bi bilo potrebno pripraviti preparat prereza površinskih struktur, ki bi ga pregledali na transmisijskem elektronskem mikroskopu. V raziskavi Graingerja s sod. (2006) na takih prerezi niso opazili mikrotubularnih struktur, značilnih za cilije.

Pri obeh načinih gojenja se na površini celic pojavijo tudi vezikularne strukture (sliki 9C in 10B za način LCC ter sliki 13E in 14C za način AIC). Izraz vezikularne strukture morda v tem primeru ni idealen, vendarle smo se zanj odločili na podlagi oblike prisotnih struktur. Čeprav izvora struktur nismo raziskali, sklepamo, da so povezane z izločanjem mukusa, kar je specifična značilnost celic proučevane celične linije.

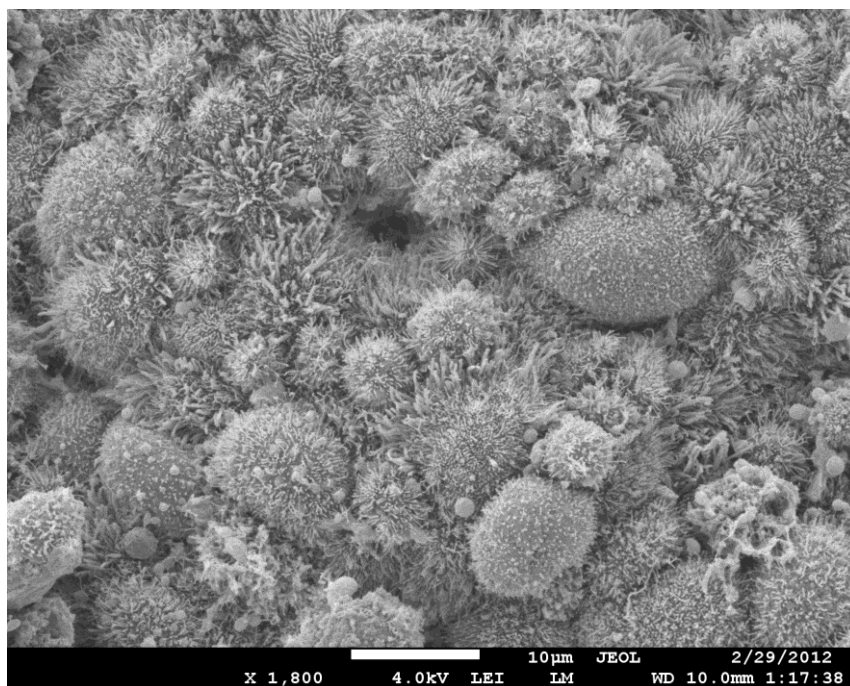
Mukus smo sicer v večjih količinah opazili le pri rasti v pogojih AIC. Ta je viden že pod svetlobnim mikroskopom in celo s prostim očesom. Mikrografije manj intenzivno spiranih vzorcev (z bolj razredčenim kakodilatnim pufrom) so ta opažanja potrdile (slika 16F). Na sliki mukus v celoti zapolnjuje vrzeli med celicami. Ob tem se zastavlja vprašanje, zakaj mukus ni prisoten tudi pri celicah, gojenih v pogojih LCC. Če drži, da celice izvirajo iz submukoznega žleznega tkiva, bi lahko pričakovali, da jim bo ta način gojenja bolj ustrežal. Submukozne žleze namreč ležijo pod epitelijem in ne prihajajo do neposrednega stika z zrakom. Najverjetneje je mukus prav tako prisoten pri epiteliju, gojenem v pogojih LCC, le da se tukaj lahko razredči z gojiščem in se z vsako menjavo gojišča na apikalni strani sprti vsaj deloma odstrani in se tako ne nalaga na površini. Mukus iz subepitelialnih žlez je tudi *in vivo* redkejši, saj se mora izločati skozi izvodilo (Ballard in Spadafora, 2007), kar je verjetno tudi v pogojih naših kultur.

Kljub podobnostim so strukturne razlike pri obeh načinih gojenja epitelija izrazite. Pri načinu LCC so celice bolj homogene, v večini rastejo v eni plasti na rastni membrani (sliki 11A in 14B). Pri gojenju v pogojih AIC se celice precej bolj razrastejo, rasti začnejo izrazito v višino (sliki 14B in 15B). Razpoke, ki so artefakt priprave preparatov in potekajo večinoma ob robu celic, ne segajo do rastne podlage, iz česar je mogoče sklepati, da je tukaj epitelij precej debelejši oziroma ponekod celo očitno večplasten (slika 13C). Epitelijske strukture (mikrovili in cilijam podobne strukture) so prisotne pri obeh načinih gojenja, vendarle več na površini celic, gojenih na način AIC.

Model epitelija na osnovi rakaste celične kulture je vsekakor težko ovrednotiti, saj lahko poleg lastnosti izvornega tkiva pričakujemo tudi mnoge težko pojasnljive lastnosti, ki izvirajo iz dereguliranega in poškodovanega rakastega genoma. Večje kromosomske anomalije tudi niso skupne za celotno populacijo celic v kulturi, kar dodatno oteži podajo zaključkov. Kultura *in vitro* epitelijskega modela ne doseže stabilnega stanja, temveč se, ko doseže trenutek največje podobnosti epiteliju *in vivo*, nadalje spreminja in vse bolj odstopa od želenega stanja. Zato je potrebno model kritično ovrednotiti iz različnih vidikov ter določiti optimalne pogoje rasti in časovno območje, v katerem lahko služi kot model pri vrednotenju izbranih lastnosti epitelija. V primeru Calu-3 dosežejo celice strnjeno prerast že zelo zgodaj in pri tem izražajo značilne membranske strukture. Tudi prekoepitelijska

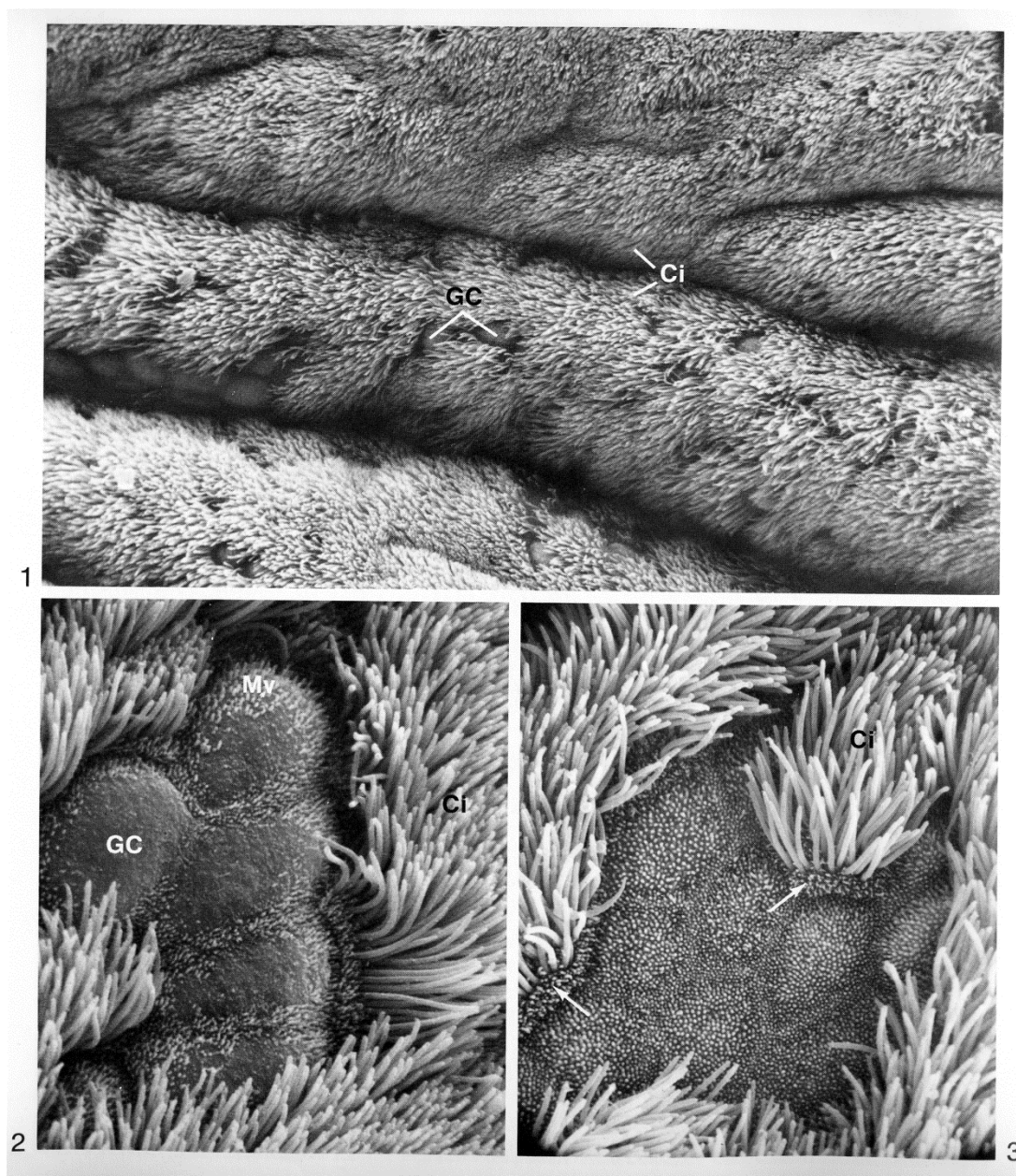
električna upornost se s časom ne povečuje več. Prevelika gostota lahko privede pri transformiranih celicah do preraščanja v več plasteh, kar smo opazili tudi pri naših celičnih kulturah. Pojav smo pri načinu AIC opazili že po osmih dneh gojenja v kulturi, torej po tem, ko celice dosežejo konfluentnost (slika 13F).

Ker smo želeli svoj epiteljski model neposredno primerjati z nativnim epiteljskim tkivom, smo z Onkološkega inštituta Ljubljana dobili nekaj biopsij tkiva pljuč. Na vzorcih, pridobljenih iz teh biopsij, smo z vrstičnim elektronskim mikroskopom poizkusili najti del z epiteljskimi celicami, ki bi ga lahko primerjali z našo celično linijo. Vzorci so bili sicer velikokrat precej deformirani zaradi odvzema, kljub temu smo na enem od vzorcev iz zdravega tkiva pljuč zasledili epiteljski predel, primerljiv našemu modelu epitelija.



Slika 18: SEM mikrografija biopsije zdravega tkiva pljuč. Na sliki vidimo površino primerljivo našemu modelu epitelija s kratkimi epiteljskimi izrastki (mikrovili) in vezikularnimi strukturami. Poleg mikrovilov vidimo tudi izrazitejše izrastke, ki so najverjetneje cilije.

Za dodatno primerjavo smo iz atlasa vrstične elektronske mikroskopije (Kessel in Kardon, 1979) pridobili nekaj slik respiratornega epitelija, narejenih z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Površino cilijarnih celic na slikah gosto pokrivajo cilije, kar je lepo razvidno iz slike 19, saj so te epiteljske strukture debelejše. Čašaste celice imajo na površini krajše strukture, mikrovile.



Slika 19: SEM mikrografije epiteljske površine sapnika (Kessel in Kardon, 1979). Vse tri mikrografije nam kažejo gosto porast površine ciliarnih celic s cilijami (Ci). Površina čašastih celic (Gc) pa se bistveno razlikuje. Velikokrat njihovo robno površino prekrivajo krajši mikrovili (Mv), kar smo opazili tudi pri nekaterih naših celicah (slika 16H).

Podobnost med slikami pljučnega epitelija in slikami naše celične linije je očitna, čeprav je gostota epiteljskih struktur nekoliko manjša pri celični liniji, kjer niti ne opazimo tako izrazitih cilijarnih struktur. Po slikah sodeč so nativni epiteliji enoslojni, celice rastejo v isti ravnini.

5.2.3 »Ranitveni« test

Z ranitvenim testom smo spremljali proces »celjenja« opazovanega epitelijskega tkiva po nastali poškodbi. Celice so se ob ranjenem delu ustrezno preuredile, videli smo odebeljen rob, kar bi bila lahko posledica preurejanja citoskeleta ob robnih celicah in migrirajoče se celice po neporaščeni površini (slika 17). Ves ta proces je potekal zelo hitro, saj so prej kot v dveh dneh celice popolnoma zapolnile poškodovani predel širine približno pol milimetra. Na starejših, že zaceljenih predelih morfoloških razlik na površinah celic ni bilo. Z ranitvenim testom smo želeli spremljati diferenciacijo na novo nastalega epitelijskega tkiva in celice, ki bi zapolnile prosto rastno podlago. Rezultati so nas vsaj deloma presenetili, saj smo upali na spremenjen fenotip celic na mestu poškodbe. Na osnovi površinskih epitelijskih struktur slednjih namreč nismo uspeli določiti, katere celice so starejše in katere na novo deljene. Med delitvijo ali samo preurejanjem celic torej ni prišlo do apikalnih morfoloških sprememb. Rakaste celice, kot Calu-3, imajo praviloma deregulirano proliferacijo in zato verjetno tudi ni pričakovati sklopljenosti s procesom celične diferenciacije (Kufe in sod., 2006) saj oba procesa po vsej verjetnosti lahko potekata asinhrono.

5.2.4 Sklepi

Z rezultati smo potrdili začetno hipotezo, da se morfologija celic iz celične linije Calu-3 razlikuje v odvisnosti od načina gojenja. V primerjavi z nativnim epitelijem imata oba načina gojenja nekaj svojih prednosti. Pri celicah, gojenih na način AIC, je glavna prednost prisotnost mukusa. Na ta način lahko pripravimo *in vitro* epiteljski model z mukusno bariero. Izraženost epiteljskih struktur je pri gojenju pod pogoji AIC praviloma izrazitejša kot pri gojenju pod pogoji LCC. Prednosti načina LCC so izrazitejši tesni stiki in enoslojen epitelij, s celicami v isti ravnini. Večja strukturna homogenost in integriteta torej omogočata ponovljivejše meritve epiteljske prehodnosti. Glavna pomanjkljivost je v odsotnosti mukusa (ta se sicer najverjetneje pojavlja, a v manjših količinah), vendar pa je slednje lahko tudi prednost, kadar želimo ločeno preučevati delovanje posameznih bariernih struktur epitelija.

Z meritvami TEER smo želeli ugotoviti dinamiko nastajanja tesnih stikov kot pokazatelja vzpostavitve integritete epitelija. Ker je bilo s prekoepiteljskimi meritvami na drugi celični liniji Caco-2 slednje že ugotovljeno, smo pričakovali potrditev naše hipoteze. Meritve prekoepiteljske upornosti so bile na žalost nižje od pričakovanih. Po vrednostih na sliki 5 lahko sicer okvirno določimo, kdaj celice dosežejo konfluentno prerast in vzpostavijo medcelične stike, vendar le za celice, gojene v pogojih LCC. Celice, gojene v pogojih AIC, so imele v celotni seriji razmeroma nizke vrednosti prekoepiteljske upornosti, kar nakazuje, da celice morda celo ob konfluentni prerasti niso vzpostavile izrazitih tesnih stikov. Na sliki 5 je tudi jasno razvidno, da vrednosti obeh kultur nihajo. Ker je nihanje v fazi, gre najverjetneje za vpliv periodike hranjenja kulture in nekaterih dejavnikov, ki jih ne moremo povsem nadzorovati. Tukaj je pomembna že temperatura in stanje aparata med merjenjem, prehranjenost celic itd. Naše hipoteze torej ne moremo potrditi, saj so vrednosti teh meritev očitno precej odvisne od dejavnikov, ki jih ne moremo v celoti nadzorovati.

Gojenje celic Calu-3 v pogojih AIC, ki so bližje pogojem nativnega epitelija, verjetno vodi v oblikovanje mukusnih epiteljskih celic z izrazitimi mikrovili. Vendar pa se zdi, da je zahteva po oblikovanju enoslojnega epitelija mukusnih celic prevelika saj so v naravnem okolju v enotni strukturi psevdostatificiranega epitelija prisotne tudi druge celice. Temu je

najverjetneje prilagojena tudi morfologija in fiziologija mukusnih celic, kar se lahko v monokulturi izkaže kot pomanjkljivost.

V zaključkih se torej nekoliko odmikamo od večinskega mnenja (Grainger in sod.,2006; Stentebjerg-Andersen in sod, 2011; Haghi in sod., 2010; Zhu in sod.,2010) in s tem deloma zavračamo našo hipotezo, da je AIC model bližji epiteliju dihalnih poti. S prednostmi in pomanjkljivostmi, ki jih navajamo lahko trdimo, da je posplošitev na način boljši ali slabši lahko zavajajoča. Model je lahko sprejemljiv za specifičen namen, če se izkaže s potrebnimi lastnostmi. Dober pa je šele po ustrezni primerjavi s stanjem *in vivo*. Celična linija Calu-3 je v modelu AIC bolj podobna stanju *in vivo* glede na prisotnost mukusa. Glede na integriteto celičnega sloja pa gre za precej slab model epitelijske bariere. Za raziskave je tako primeren tudi epiteljski model LCC, kar navaja tudi Pezron s sod. (2001). Oba modela se torej nekako dopolnjujeta, noben pa ni idealen, česar tudi nismo pričakovali.

6 POVZETEK

Epitelij dihalnih poti je izpostavljen zunanjemu okolju, zato se na biofizikalne in biološke stimuluse izrazito odziva. Preko mnogih celičnih poti in mehanizmov odgovarja na zunanje substance, stres, medicinska zdravljenja, ki bi lahko povzročila celjenje ali poškodbo dihalnega epitelija. Zaradi zahtevnosti in ovir pri vzgoji primarnega humanega epitelija iz dihalnih poti in omejenosti *in vivo* študij na živalih, se išče primerne epitelijske modele, ki bi nam pomagali pri razumevanju delovanja dihalnega epitelija (Zhu in sod., 2010).

V diplomskem delu smo zato spremljali razvoj celične linije Calu-3, pridobljene iz humanega adenokarcinoma bronhialnega epitelija. Gojili smo jo na dva načina. Prvi, LCC, je klasičen način gojenja celične kulture, kjer gojišče obliva tako apikalno kot bazolateralno stran celic. Drugi način gojenja, AIC, temelji na tem, da imajo celice apikalno stik z zračno atmosfero (kot tudi v nativnem dihalnem epiteliju). Pri obeh načinih smo s pomočjo vrstičnega elektronskega mikroskopa spremljali diferenciacijo celic celične linije po času v kulturi, ki je vključevala spremembe apikalnih epitelijskih struktur, prisotnost mukusa, vezikularnih struktur in pa sam način rasti celic. Ogleдали smo si strukturne lastnosti izvornih celic pred sajenjem na propustno podlago. Te so izražale že vse epitelijske strukture, prisotne pa so bile tudi vezikularne strukture in mukus. Z rinitvenim testom smo spremljali preraščanje postrgane podlage sredi konfluentne površine modela epitelija. Prerast je bila hitra in brez večjih strukturnih sprememb celic.

Razlike med načinoma gojenja so bile opazne. Najbolj izrazite so bile pri samourejanju celic in pri prisotnosti mukusa. Veliko je bilo tudi skupnih točk, kot je prisotnost vezikularnih struktur in več tipov površinskih epitelijskih struktur. Pri nobenem od obeh načinov gojenja model epitelija ni zadoščal vsem kriterijem podobnosti z dihalnim epitelijem. Zato je na mestu kritična presoja, če in kateri model je primeren za simulacijo izbranega procesa *in vivo*.

7 VIRI

- Ballard S. T., Spadafora D. 2007. Fluid secretion by submucosal glands of the tracheobronchial airways. *Respir Physiol Neurobiol*, 159(3): 271-277
- Batista U. 2005. Gojenje sesalskih celic v in vitro pogojih. Ljubljana, Študentska založba.
- Cooney D., Kazansteva M., Hickey A. J. 2004. Development of a size-dependent aerosol deposition model utilising human airway epithelial cells for evaluating aerosol drug delivery. *ATLA, Alternatives to laboratory animals*, 20: 788 - 796
- Florea B. I., Cassara M. L., Junginger H. E., Brochard G. 2003. Drug transport and metabolism characteristics of the human airway epithelial cell line Calu-3. *Journal of Controlled Release*, 87: 131 – 138
- Foster K. A., Avery M. L., Yazdanian M., Audus K. L. 2000. Characterization of the Calu-3 cell line as a tool to screen pulmonary drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 208: 1 – 11
- Freshney R. I. 2000. *Culture of animal cells: a manual of basic technique* 4th edition. ZDA, Wiley-Liss.
- Grainger C. I., Greenwell L. L., Lockley D. J., Martin G. P., Forbes B. 2006. Culture of Calu-3 cells at the air interface provides a representative model of the airway epithelial barrier. *Pharmaceutical Research*, 23(7): 1482 - 1490
- Haghi M., Young P. M., Traini D., Jaiswal R., Gong J., Bebawy M. 2010. Time- and passage-dependent characteristics of a Calu-3 respiratory epithelial cell model. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 36(10): 1207 – 1214
- Jamnikar U. 2011. *Biotehnološka zdravila*. GEA, 10, oktober 2011: 34 str.

- Kessel R. G., Kardon R. H. 1979. Tissues and organs: a text-atlas of scanning electron microscopy. San Francisco, ZDA. W. H. Freeman and Company.
- Kufe D. W., Bast R. C. Jr., Hait W., Hong W. K., Pollock R. E., Weichselbaum R. R., Holland J. F., Frei E. 2006. Holland - Frei cancer medicine 7, chapter 3, Cell proliferation and differentiation (Andreeff M., Goodrich D. W., Koeffler H. P.). Hamilton, Ont., Kanada. BC Decker.
- Mescher A. L. 2010. Junqueira's Basic Histology text and atlas, twelfth edition. ZDA, The McGraw-Hill Companies.
- Morales 2008. Histolog of the Respiratory System Part 1. McGill Molson Medical Informatics. http://alexandria.healthlibrary.ca/documents/notes/bom/unit_2/L-32%20Histology%20of%20the%20Respiratory%20System%201.xml (junij, 2012)
- Pezron I., Mitra R., Pal D., Mitra A. K. 2001. Insulin aggregation and asymmetric transport across human bronchial epithelial cell monolayers (Calu-3). Journal of Pharmaceutical sciences, 91(4): 1135 - 1145
- Stentebjerg-Andersen A., Notlevsen I. V., Brodin B., Nielsen C. U. 2011. Calu-3 cells grown under AIC and LCC conditions: Implication for dipeptide uptake and transepithelial transport of substances. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 78: 19 – 26
- Thibodeau G. A., Patton K. T. 2006. Anatomy & Physiology, sixth edition. ZDA, Mosby elsevier.
- University of Washington, Environmental and Occupational Toxicology I Department of Environmental Health. 1997. Toxicology of the lung (2). <http://depts.washington.edu/envh/lung.html> (junij, 2012)

Warshawsky H., Morales 2008. Histolog of the Respiratory System Part 2. McGill Molson Medical Informatics. http://alexandria.healthlibrary.ca/documents/notes/bom/unit_2/L-32%20Histology%20of%20the%20Respiratory%20System%202.xml (junij, 2012)

Zhu Y., Chidekel A., Shaffer T. H. 2010. Cultured human airway epithelial cellc (Calu-3): A model of human respiratory punction, structure, and inflammatory responses. Hindawi Publishing Corporation. Critical Care Research and Practice. Article ID 394578, 8 pages

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju, prof. dr. Kazimirju Drašlarju, za pomoč pri praktičnem delu diplome, za naklonjen čas ter za koristne nasvete med pisanjem diplome.

Hvala somentorju, dr. Simonu Casermanu, za pridobljene izkušnje v celičnem laboratoriju, za prijaznost, čas in vse nasvete ter popravke med izvedbo in pisanjem diplome.

Hvala Maji Marušić in Petri Sečnik za vso pomoč v celičnem laboratoriju. Hvala Eriki Rus za izdelane protokole, ki so mi bili v pomoč pri pripravi vzorcev.

Hvala doc. dr. Marjeti Terčelj, dr. med. za posredovanje biopsij pljučnega tkiva ter dovoljenje za objavo slik le teh v diplomskem delu.

Hvala recenzentu, prof. dr. Roku Kostanjšku, za dostopnost in skrben pregled diplomske naloge.

Hvala mami za materialno in sploh vsestransko podporo tekom študija.

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
Oddelek za biologijo

Ida DJURDJEVIČ

**SPREMLJANJE DIFERENCIACIJE CELIC LINIJE CALU-3 Z
VRSTIČNIM ELEKTRONSKIM MIKROSKOPOM**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012