

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Erika Rus

**RAZVOJ METODE ZA VREDNOTENJE DIFERENCIACIJE CELIC Caco – 2 NA
MODELU ČREVESNEGA EPITELIJA Z VRSTIČNIM ELEKTRONSKIM
MIKROSKOPOM**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DEVELOPMENT OF THE METHOD FOR EVALUATION OF Caco-2 CELL
DIFFERENTIATION IN THE MODEL OF INTESTINAL EPITHELIUM BY
SCANNING ELECTRON MICROSCOPE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2014

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 1. in 2. Stopnje oz. Senata Oddelka za biologijo je 7. 12. 2012 potrdila naslov diplomske naloge. Za mentorja diplomske naloge je imenovala prof. dr. Kazimirja Drašlarja, za somentorja dr. Simona Casermana in za recenzenta prof. dr. Roka Kostanjška.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Nada ŽNIDARŠIČ
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: 27. 10. 2014

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.

Erika Rus

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
DK UDK 576.34:621.385.833.2(043.2)=163.6
KG celična linija/Caco-2/vrstični elektronski mikroskop/SEM
AV RUS, Erika
SA DRAŠLAR, Kazimir (mentor)/CASERMAN, Simon (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2014
IN RAZVOJ METODE ZA VREDNOTENJE DIFERENCIACIJE CELIC Caco – 2
NA MODELU ČREVESNEGA EPITELIJA Z VRSTIČNIM ELEKTRONSKIM
MIKROSKOPOM
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 49 str., 34 sl., 39 vir.
IJ Sl.
JI Sl/en
AI Namen naloge je bil postaviti vzporednice med standardnim spremljanjem razvoja kulture s pomočjo meritev vrednosti TEER in strukturnimi spremembami na celičnem sloju po starosti od nasaditve. Celično kulturo Caco-2 smo fiksirali pri različnih časih po nasaditvi in jih posneli z elektronskim mikroskopom. Preparate smo fiksirali po dveh protokolih: enostopenjska fiksacija z aldehidi in dvostopenjska z aldehidi in osmijem. Slednja se je izkazala za boljšo metodo, kljub temu da je dražja, vsebuje fiksativ več toksičnih snovi, smo jo uporabljali pri vseh nadaljnjih raziskavah razvijajočih se celic v kulturi. Na elektronskih mikrografijah vidimo, da se gostota in dolžina mikrovilov s časom gojenja praviloma povečuje. Če pa opazujemo več celic znotraj enega preparata, opazimo veliko raznolikost med celičnimi površinami. Celice znotraj istega preparata so na različnih stopnjah morfološke diferenciacije v funkcionalne enterocite. Meritve TEER kažejo dinamiko nastajanja tesnih stikov oziroma so pokazatelj vzpostavitve integritete epitelijskega modela. Meritve jasno kažejo rast upornosti s starostjo epitelijskega modela. Vzpostavitev tesnih stikov sledi fazi preraščanja rastne površine, to pa se tudi odraža v hitrem skoku TEER. Razvoj dolžine mikrovilov prehiteva vzpostavitev integritete epitelijskega modela in z njo ni neposredno povezan.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 576.34:621.385.833.2(043.2)=163.6
CX cell line/Caco-2/ scanning electron microscope/SEM/
AU RUS, Erika
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 2014
TI DEVELOPMENT OF METHOD FOR EVALUATION OF Caco-2 CELL DIFFERENTIATION IN THE MODEL OF INTESTINAL EPITHELIUM BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPE
DT Graduation thesis (University studies)
NO IX, 49 p., 34 fig., 39 ref.
LA SI
AL sl/en
AB The purpose of the thesis was to draw parallels between the standard monitoring of the development of cell culture by means of TEER measurements and monitoring structural changes of the cellular layer at different stages during cultivation. Caco-2 cell culture were fixed at various times after seeding and recorded with the electron microscope. Samples were fixed according to two protocols: one-leg fixation with aldehydes and two-stage fixation with aldehydes and osmium. The latter has proven to be a better method, although it is more expensive and its' fixative contains more toxic substances. Therefore, this protocol was used for all subsequent studies of cells in culture. Electron micrographs show that the density and length of microvilli tends to increase over time during cultivation. However, if we observe more cells inside one sample, we see a great diversity between the cell surfaces. Cells of the same specimen are at different stages of morphological differentiation into functional enterocytes. TEER measurements show the dynamics of formation of close contacts and are the indicator of the establishment of the epithelium integrity. Measurements clearly show the increase of resistance in correlation with the aging of epithelial cells model. The establishment of close contacts is in correlation with the outgrowing of the cultivation surface, and this is also reflected in the rapid jump of TEER. Development of microvilli length outruns the establishment of epithelial integrity model and is not directly connected with it.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VIII
SLOVARČEK	IX
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 Gojenje celic v pogojih in vitro	3
2.1.1 SPLOŠNO	3
2.1.2 RAZISKAVE S KULTURAMI CELIC	6
2.1.3 CELIČNA LINIJA CACO-2	7
2.2 Črevesni epitelij	10
3 MATERIAL IN METODE	13
3.1 Gojenje celic v pogojih in vitro	13
3.1.1 NAMNOŽEVANJE IN VZDRŽEVANJE CELIC	13
3.1.2 GOJENJE CELIC V POSKUSU	15
3.1.3 PREVERJANJE STANJA CELIC	16
3.1.4 MERJENJE PREKOEPITELIJSKE UPORNOSTI	16
3.1.5 GOJITEV CELIC NA STEKLENI PODLAGI	17
3.2 Priprava preparatov za vrstično elektronsko mikroskopijo	18
3.2.1 SPIRANJE VZORCA	18
3.2.2 FIKSACIJA	18
3.2.3 DEHIDRACIJA	19
3.2.4 SUŠENJE VZORCA PRI KRITIČNI TOČKI	19
3.2.5 NAMESTITEV PREPARATA NA NOSILEC IN NAPRAŠEVANJE	19
3.3 Elektronska mikroskopija	19
4 REZULTATI	20
4.1 Fiksacija preparatov	20
4.1.1 ENOSTOPENJSKA FIKSACIJA	20
4.1.2 POSLEDICE PUŠČANJA PREPARATOV V ALKOHOLU	21
4.1.3 DVOSTOPENJSKA FIKSACIJA	23
4.1.4 RAZPOKE NA ROBOVIH CELIC	23
4.2 Razvoj celične kulture	25
4.2.1 PREKOEPITELIJSKA ELEKTRIČNA UPORNOST CEL. SLOJA	26
4.2.2 STRUKTURNE SPREMEMBE S ČASOM PO NASADITVI	27
4.2.3 RAST DOLŽINE MIKROVILOV S STAROSTJO KULTURE	38
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	39
5.1 RAZVOJ CELIČNE KULTURE	39
5.2 ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA	42
6 POVZETEK	44
7 VIRI	45

Rus E. Razvoj metode za vrednotenje celic Caco-2 na modelu črevesnega epitelijskega tkiva z vrstičnim elektronskim mikroskopom.
Dipl.delo, Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2014

ZAHVALA
PRILOGE

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Celična diferenciacija	4
Slika 2: Rastna krivulja	6
Slika 3: Ponazoritev rasti epitelijskega modela Caco-2 na prepustni umetni membrani	8
Slika 4: Transmisijska elektronska mikografija vertikalnega prereza dveh celic Caco-2 pri starosti 21 dni Puščica označuje tesne stike med sosednjimi celicami.....	9
Slika 5: Črevesni epitelij: a-celoten načrt, b-gube, prekrite z mukozo, c-resice tankega črevesja	10
Slika 6: Ultrastrukturalne prilagoditve absorpcije in sekrecije: a-resice prekrite z mukoznim epitelijem, ki sestoji iz absorpcijskih celic in redkejših čašastih celic, b-absorpcijska celica, c-mikrovili	11
Slika 7: Ponazoritev povečanja absorpcijske površine zaradi posameznih morfološko-anatomskih prilagoditev	12
Slika 8: Ploščica s plastičnimi koški iz poliestra (transwell) s prepustno membrano	15
Slika 9: Postavitev elektrod pri meritvi TEER	17
Slika 10: Celice Caco-2: 14 dni po nasaditvi, fiksirane po enostopenjski fiksaciji z aldehidi	20
Slika 11: Celice Caco-2: 14 dni po nasaditvi, fiksirane po enostopenjski fiksaciji z aldehidi	21
Slika 12: Celice Caco-2: 3 dni po nasaditvi	22
Slika 13: Celice Caco-2: 8 dni po nasaditvi.	22
Slika 14: Caco-2 celice: 23 dni po nasaditvi, fiksirane z dvostopenjsko fiksacijo	23
Slika 15: Celice Caco-2: 14 dni po nasaditvi	24
Slika 16: Celice Caco-2 6 dni po nasaditvi - nasajene na stekelce.....	24
Slika 17: Prekoepitelijska upornost celične kulture Caco-2, nasajene na poliesterske koške	26
Slika 18: Celice Caco-2: 2 dni po nasaditvi	27
Slika 19: Caco-2 celice: 2 dni po nasaditvi - celice nasajene na stekelce	28
Slika 20: Celice Caco-2: 2 dni po nasaditvi	28
Slika 21: Celice Caco-2: 5 dni po nasaditvi	29
Slika 22: celice Caco-2 5 dni po nasaditvi - celice nasajene na stekelce	30
Slika 23: Celice Caco-2: 8 dni po nasaditvi	31
Slika 24: Celice Caco-2: 11 dni po nasaditvi	32
Slika 25: Celice Caco-2 11 dni po nasaditvi	32
Slika 26: Celice Caco-2: 11 dni po nasaditvi	33
Slika 27: Celice Caco-2: 11 dni po nasaditvi	33
Slika 28: Celice Caco-2: 14 dni po nasaditvi	34
Slika 29: Celice Caco-2 14 dni po nasaditvi	35
Slika 30: Celice Caco-2 14 dni po nasaditvi	35
Slika 31: Celice Caco-2: 23 dni po nasaditvi	36
Slika 32: Celice Caco-2: 23 dni od nasaditve.....	37
Slika 33: Rast dolžine mikrovilov	38
Slika 34: Primerjava rastne krivulje z meritvami prekoepitelijske upornosti	39

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

TEER - merjenje prekoepitelijske električne upornosti (ang. transepithelial electrical resistance, TEER) je standardni postopek, ki omogoča oceno dinamike rasti celic, razvoja celične kulture, vitalnosti in integritete tkiva.

CPD - sušenje pri kritični točki (ang. critical point drying) je metoda za sušenje vzorcev za vrstično elektronsko mikroskopijo.

SEM – vrstični elektronski mikroskop (ang. scanning electron microscope).

SLOVARČEK

In vitro – oznaka za procese in poskuse, ki potekajo v nadzorovanem okolju zunaj živega organizma.

In vivo – oznaka za procese in poskuse, ki potekajo v živem organizmu.

Konfluentna razrast – razrast celične kulture v strnjenem sloju, ki prerastejo celotno rastno površino.

Viabilnost – živost, sposobnost za življenje in razvoj.

Enterociti ali črevesne absorpcijske celice - preproste stebričaste epitelijske celice, ki jih najdemo v tankem in debelem črevesju.

Kritična točka - točka, kjer sta pri določenih pogojih (temperatura, tlak) gostoti plina in tekočine enaki. Izparilna toplota pri kritični točki in nad njo je enaka nič in razlik med obema fazama ni več. Pri kritični točki in nad njo obstaja homogeni ravnotežni sistem, ki se imenuje superkritična tekočina. Pri kritični točki prehaja tekočina v plinasto stanje brez fazne meje, zato sile površinske napetosti ne nastajajo (Atkins,1980, Watson in sod., 1980).

1 UVOD

Enterociti črevesnega epitelija imajo prepoznavno oblikovano apikalno površino z visoko gostoto mikrovilov, ki prispeva k močnemu povečanju površine celic v črevesnem lumnu. To je pomembno, saj preko te površine poteka selektivno privzemanje nutrientov in drugih snovi iz prebavljene hrane.

S celičnimi modeli *in vitro* želimo v čim večji meri ponazoriti delovanje in funkcijo ustreznih celic v telesu. Zaradi sklopljenosti struktur s pripadajočimi funkcijami in strukturnih podobnosti celic v kulturi s tistimi v telesu lahko sklepamo na dobro ohranjenost lastnosti celic v celični kulturi.

Meritev električne upornosti epitelija je uveljavljena metoda za hitro oceno stanja diferenciranosti epiteljske kulture, ki pa ne prikaže strukture celic. S pomočjo SEM smo sledili strukturnim spremembam celic, ki se pojavljajo ob njihovi rasti, in jih primerjali z meritvami TEER. Če pa želimo dobiti primerljive podatke, moramo narediti metodo ponovljivo.

CILJI NALOGE:

- Razvoj postopkov za ponovljivo pripravo preparatov za vrstično elektronsko mikroskopijo.
- Spremljanje strukturne diferenciacije celic črevesnega epitelija Caco-2 v pogojih »*in vitro*«.
- Primerjava strukture površine z rezultati meritev TEER in ugotavljanje korelacije.

Diplomska naloga temelji na naslednjih delovnih hipotezah:

- S prilagoditvijo metode lahko dosežemo visoko kakovost preparatov, s standardizacijo pa ponovljivost in primerljivost preparatov.
- Izraženost mikrovilarnih struktur celic Caco-2 narašča s starostjo preiskovane kulture in prekoepitelijsko upornostjo.

Pričakovani rezultati so bili:

- Meritve prekoepitelijske upornosti kot splošno sprejeti pokazatelj stopnje diferenciacije epitelijskega tkiva in vitro.
- Posnetki epitelijskega modela z vrstičnim elektronskim mikroskopom pri različni starosti.
- Analiza posnetkov in pridobitev merljivih parametrov.
- Ocena kakovosti epitelijskega modela na osnovi pridobljenih podatkov.
- Smernice za nadaljnje optimizacije postopka.

2 PREGLED OBJAV

2.1 GOJENJE CELIC V POGOJIH IN VITRO

2.1.1 Splošno

Celična kultura je populacija celic, gojena *in vitro* izven donorskega organizma. Primarne kulture po presaditvi v pogoje *in vitro* so praviloma heterogene. Z metodami selekcije in kloniranja pa lahko dosežemo večjo homogenost kulture. S spontano ali načrtovano transformacijo lahko postane celična kultura trajna celična linija. Uporaba trajnih linij omogoča lažje opazovanje in eksperimentiranje, saj omogočajo delo na primerljivi kulturi v več laboratorijih in v daljšem časovnem obdobju. Prednost gojenja celic *in vitro* pred uporabo poskusnih organizmov je v lažjem zagotavljanju enakih in boljše definiranih pogojev poskusa, s tem pa preprostejše vrednotenje in večja ponovljivost rezultatov. Hkrati pa se moramo pri rabi celične kulture, zavedati omejitev in razlik glede na strukture *in vivo* ter omejene primerljivosti fizioloških funkcij. Zadržki pred uporabo celic v kulturi so v izgubi nekaterih tkivno specifičnih lastnosti celic, ki so pogojene z mikrookoljem. Odsotnost tkivne kompleksnosti se odraži v spremenjeni prostorski ureditvi tkiva in motnjah v interakcijah med celicami in medceličnino. Odsotnost živčnega in endokrinega sistema lahko vodi v spremenjeno ali onemogočeno prilagajanje, s tem pa izgubo specifičnih celičnih funkcij. Toda če upoštevamo te razlike, nam lahko celične kulture služijo kot dober model za proučevanje delovanja izbranih procesov v celicah z višjo stopnjo avtonomnosti (Batista, 2005, Cencič, 2012).

Običajno celice, ki izvirajo iz čvrstih tkiv, rastejo pritrjene na podlago v enem sloju. Po saditvi se morajo celice najprej pritrčiti in raztegniti po podlagi, šele nato se začnejo deliti. Celice se lahko pritrdijo na steklo, če ima rahlo negativen naboj, ali na plastiko (polistiren), če je posebno obdelana. Celice najprej izločijo proteine in proteoglikane izvenceličnega matriksa, ki se pritrdijo na rastno podlago, in se šele potem vežejo nanje preko membranskih receptorjev (Batista, 2005).

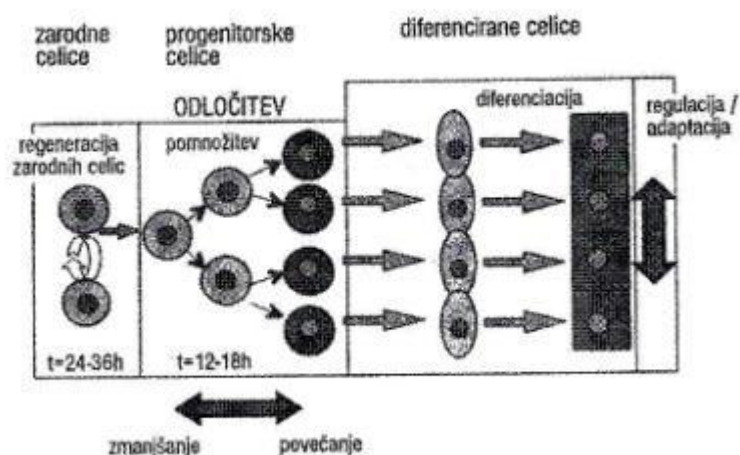
Molekule, ki so vključene pri pritrjanju celice na podlago in medceličnimi stiki na sosednje celice, so povezane z elementi citoskeleta.

Pri izolaciji primarne kulture se ob proteolizni razgradnji tkiva ali ob presajanju pritrjene celične kulture z uporabo tripsina v večji meri razgradijo tudi proteini izvenceličnega matriksa, zato jih morajo celice ponovno sintetizirati, preden se pritrdijo, ali pa jim moramo zagotoviti ustrezen, z matriksom prekrit, substrat (Batista, 2005).

Fenotip celic, ki rastejo v kulturi kot celična linija, je pogosto drugačen od tistega, ki je značilen za tkivo, iz katerega celice izhajajo. Mnogi faktorji, ki ga regulirajo, so drugačni v pogojih *in vivo* in jih v *in vitro* mikrokolju ni.

Diferenciacija je proces, ki vodi v izražanje fenotipskih lastnosti, značilnih za odraslo celico (Batista, 2005). Vsa epiteljska tkiva so si v glavnih strukturnih lastnostih med seboj podobna. V veliki meri pa se razlikujejo po poteku diferenciacije, ki mnogokrat vodi v funkcionalno specializacijo določenega epitelijskega tkiva (Wanjg in sod., 1996).

Predstopnja procesa diferenciacije je delitev in usmerjena migracija celic. Med diferenciacijo nezrele celice pridobijo strukturne in funkcionalne lastnosti zrelih celic (Wu in sod., 1990, Romih in sod., 2005).



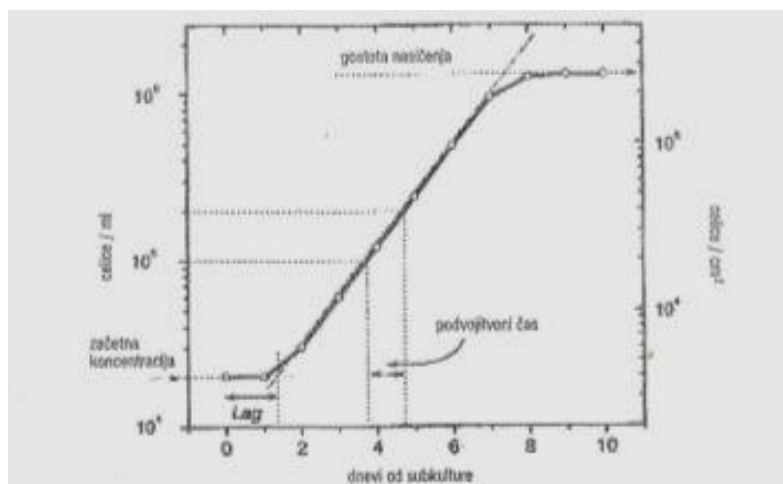
Slika 1: Celična diferenciacija (Batista, 2005)

Proces terminalne diferenciacije je, da se celica spreminja po točno določeni poti do točke, kjer je izražen odrasel fenotip. Ko jo doseže, pa se ne razvija več (Batista, 2005).

Celična linija Caco-2 je rakastega izvora in kot taka transformirana (Cencič, 2012). Transformacijo vidimo kot zaporedje dogodkov, ki vodijo v genetsko nestabilnost. Izraz izvira iz mikrobiologije, kjer transformacija pomeni spremembo fenotipa z vnosom novega genetskega materiala. Transformacija pri celičnih kulturah je spontana ali inducirana fenotipska sprememba kot rezultat trajne spremembe DNA. Povezana je z genetsko nestabilnostjo in tremi fenotipskimi spremembami, ki pa se lahko posamezno ali vse naenkrat odrazijo v eni celični liniji: nesmrtnost – izguba omejitve števila delitev, nepravilna kontrola rasti – izguba kontaktne inhibicije in potrebe po pritrdjevanju in malignost – odvisna od tumorskega potenciala celice (Batista, 2005).

Evkariontske celice, ki jih gojimo v celičnih kulturah, se delijo približno na 24 ur, vendar se dolžina cikla razlikuje glede na vrsto celične kulture. Celični cikel oz. celično podvajanje sestavljajo štirje usklajeni procesi: celična rast, podvojitev DNA, sinteza proteinov, pomembnih za celično delitev, in delitev celice (Cooper, 2000). V trajni celični kulturi je množitev celic omejena le z osnovnimi življenjskimi pogoji.

Če po saditvi celic v določeni koncentraciji spremljamo spreminjanje njihove gostote s časom, dobimo značilno rastno krivuljo. Rastni cikel razdelimo v tri faze: lag, log in plato (Slika 2).



Slika 2: Rastna krivulja (Batista, 2005)

Lag je faza prilagajanja po nasaditvi oziroma presaditvi celic. Tu je malo prirasta števila celic. Celice nadomeščajo elemente celične površine in izvenceličnega matriksa, ki so jih izgubile med tripsinizacijo, se pritrujejo in razširjajo po podlagi.

Faza Log je čas eksponentnega naraščanja števila celic in se praviloma konča po nekaj delitvah celic zaradi izčrpanja gojišča in pomanjkanja rastne površine.

Plato ponazarja izenačenje stopnje množitve in odmiranja celic. Pritrjene kulture so tu konfluentne, vsa rastna površina je zasedena in celice se med seboj tesno prilegajo (Batista, 2005).

2.1.2 Raziskave s kulturami celic

Sprva so celične linije rakastih celic štete za primeren model za preučevanje celičnih in molekularnih vidikov rakastih obolenj (Mueller-Klieser, 1997). V zadnjem času pa se te celice uveljavljajo tudi kot ustrezno orodje za študij normalnih fizioloških in ne le patoloških procesov na celični ravni, pri čemer je ključnega pomena karakterizacija malih aktivnih molekul in pregled presnovnih poti (Miura in sod., 1997, Kim in sod., 2011).

Viri navajajo, da so rakave celične linije dragoceno orodje za ovrednotenje delovanja izbranih učinkovin na posamezne presnovne procese (Mortensen in sod., 2008).

Uporaba celičnih linij za študij absorpcijskih procesov črevesne sluznice ne zahteva samo uporabo ustrezne zvrsti celic, ampak tudi zagotovitev ustrezne tkivne organizacije, ki ponazarja razmere *in vivo*.

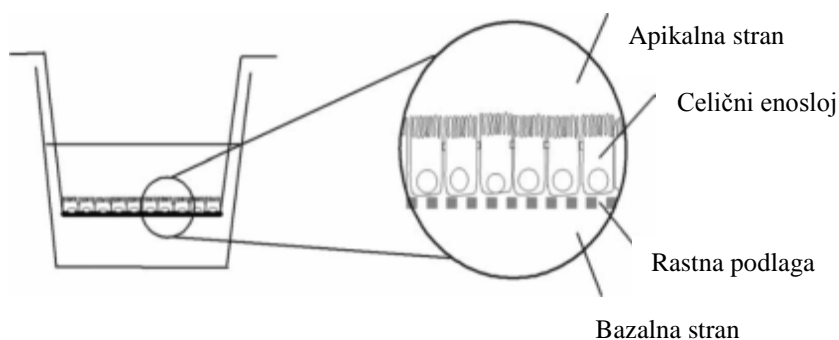
V sedemdesetih letih so se naboru dostopnih celičnih linij pridružile še celice, ki izvirajo iz prebavnega trakta. Izolirali so jih za študij mehanizmov nastanka rakastih obolenj in terapij za zdravljenje raka. Le nekaj desetletij kasneje se je zaradi težav pri pridobivanju diferencirane kulture celic črevesne sluznice pozornost preusmerila od normalnega tkiva na značilne lastnosti črevesne sluznice pri nekaterih od teh tumorskih celičnih linij. Ena od teh celičnih linij, Caco-2, je pokazala spontano tendenco po diferenciaciji *in vitro*. Prve študije na celični liniji Caco-2 so pokazale, da te celice skozi diferenciacijo postopoma izražajo nekatere strukturne in biokemične lastnosti enterocitov tankega črevesja (Pinto in sod., 1983). Celice rastejo v enosloju, kažejo cilindrično polarizirano morfologijo z mikrovili na apikalni strani, tesnimi stiki med sosednjimi celicami in izražajo hidrolazno encimsko aktivnost tankega črevesja na apikalni strani membrane.

2.1.3 Celična linija Caco-2

Celična kultura Caco-2 je dobro poznan in uporaben model človeškega črevesnega epitelija. Celična linija izvira iz človeškega kolorektalnega adenokarcinoma. Uporablja se v raziskavah za preizkušanje absorpcije zdravil, njihove porazdelitve, presnove in izločanja. Enosloj Caco-2 se uporablja za pojasnitev transportnih mehanizmov prenosa zdravilnih učinkovin. Mnogi encimi in transportni proteini, ki aktivno privzemajo ali izločijo zdravila nazaj v črevesje so izraženi v celicah Caco-2 (Hubatsch in sod., 2007). Model se uporablja tudi v akademskih in industrijskih laboratorijih za študij mehanizmov absorpcije v črevesju, manj pogosto pa tudi za študij metabolizma.

Pri gojenju *in vitro* se spontano diferencira v celice, ki spominjajo na odrasle človeške črevesne enterocite. Celice Caco-2 se razraščajo v enem sloju in se povezujejo s sosednjimi celicami s tvorbo tesnih stikov. Takšna celična tvorba odraža permeabilnostne lastnosti epitelija in lahko služi tudi za model paracelularnega prehoda snovi skozi celični enosloj.

Takšna diferenciacija se zaključi 14-21 dni po nasaditvi (Waterman, 1980, Frontela-Saseta in sod., 2011).



Slika 3: Ponazoritev rasti epitelijskega modela Caco-2 na prepustni umetni membrani (Hubatsch in sod., 2007)

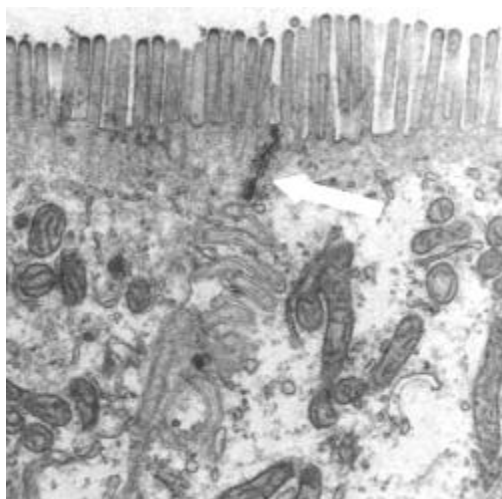
Celice Caco-2 se nasadi na prepustno umetno membrano, ki daje prost dostop ionov in hranljivih snovi z obeh strani celičnega enosloja. Ob takšni izvedbi je celična linija lahko postala širše izkoriščena kot fiziološki model črevesnega transporta in za študije toksičnosti (Artursson, 1990, Hidalgo in sod., 1989, Wilson in sod., 1990, Hilgers in sod., 1990). Prekoepitelijska električna upornost je postala pokazatelj integritete epitelijskega modela. Model je primeren za izvedbo permeabilnostnih meritev šele ob vzpostavitvi ustrezne povezanosti med sosednjimi celicami, ta pa se odraži v povišanju prekoepitelijske upornosti.

Za celično kulturo Caco-2 so značilne prvotne podpopulacije z različno morfologijo. Homogenost in stabilnost celične populacije so poskušali izboljšati z izoliranjem in karakterizacijo klonskih celičnih linij.

Celice Caco-2 se diferencirajo skozi zaporedne stopnje v izražanju morfoloških in biokemijskih značilnosti absorpcijskih enterocit (Vachon in sod., 1996).

Morfološke in biokemične podobnosti med celičnim enoslojem Caco-2 in črevesnim epitelijem so omogočile široko uporabo celic Caco-2 kot model in vitro za študij črevesne absorpcije molekul (Liang-Shang in sod., 1997, Hidalgo in sod., 1989).

Prednost takega modela je, da sta tako apikalna kot bazolateralna stran lahko dostopni, kar pomeni, da je primeren model za študije absorpcije kot tudi izločanja. Ta model je daleč najznačilnejši celični model za črevesni transport in je tudi odličen celični model transporta na splošno (Hu in sod., 2004).



Slika 4: Transmisijska elektronska mikografija vertikalnega prereza dveh celic Caco-2 pri starosti 21 dni
 Puščica označuje tesne stike med sosednjimi celicami (Hubatsch in sod., 2007)

Še vedno je odprto vprašanje fenotipa diferenciranih celic Caco-2. Čeprav celična linija izvira iz adenokarcinoma debelega črevesja odraslega bolnika, se po doseženi konfluentnosti v kulturi diferencira v polariziran enosloj celic, ki izražajo tudi nekatere značilnosti epiteljskih celic ileuma pri plodu pred rojstvom.

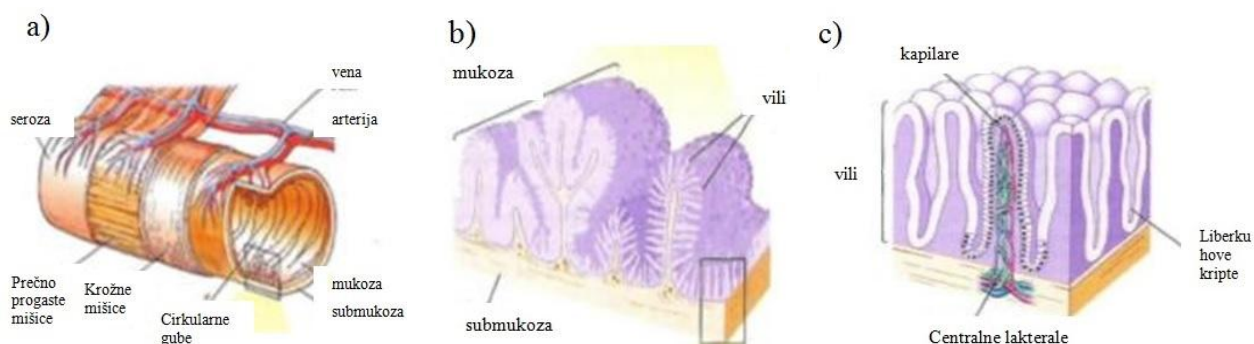
Enterociti tankega črevesa izražajo več prenašalnih proteinov na apikalni in bazolateralni strani membrane, ki dovoljujejo prekoepiteljske prenose prehransko pomembnih molekul iz črevesne vsebine v krvožilje. Specifični črevesni prenašalci za sladkorje, aminokislino, dvo- in tripeptide, vitamine, žolčne kisline, mikro hranila, vključno s težkimi kovinami in nukleotidi, so bili potrjeni v celicah Caco-2 (Hidalgo in sod., 1996). Danes lahko večini od teh pripišemo specifične genske zapise (Sambuy in sod., 2005). Primerjava prenosa snovi preko enosloja Caco-2 s prenosom snovi preko črevesnega epitelija in vivo, kaže, da se model lahko uporablja za napovedovanje transporta snovi po različnih poteh v črevesnem epiteliju. Najboljša medsebojna skladnost prenosa se pokaže pri snoveh, ki prehajajo s pasivnim precoceličnim prehodom. Pasivni prehod po paracelični poti (medcelični poti) je

manj uspešen v celičnem eonosloju kot pri meritvi *in vivo*. Podatki, pridobljeni do sedaj, kažejo, da je selektivnost te poti kljub temu primerljiva s črevesnim epitelijem.

Teoretične metode za napovedovanje absorpcije snovi se opirajo na fizikalno kemijske lastnosti molekul, kot so kapaciteta vezave lipofilnih ali hidrofilnih molekul. Dinamična polarizirana površina enosloja Caco-2 nam daje primerjave rezultatov z meritvami na izrezanih črevesnih segmentih. Zaradi tega se Caco-2 uporablja kot priročni referenčni model za teoretične napovedi absorpcije snovi (Artursson, 2001).

2.2 ČREVESNI EPITELIJ

Tanko črevo ima anatomske prilagoditve na vseh organizacijskih ravneh, od organela posamezne celice do celotne anatomije. Vse te prilagoditve so namenjene razširitvi površine za absorpcijo hranilnih snovi. Hitrost absorpcije je sorazmerna površini apikalne membrane celic epitelijskega črevesne sluznice. Veliko povečanje površine, ki jo tvorijo črevesne resice, veliko pripomore k absorpciji prebavljene snovi iz tekočin v črevesju (Eckert, 2001).

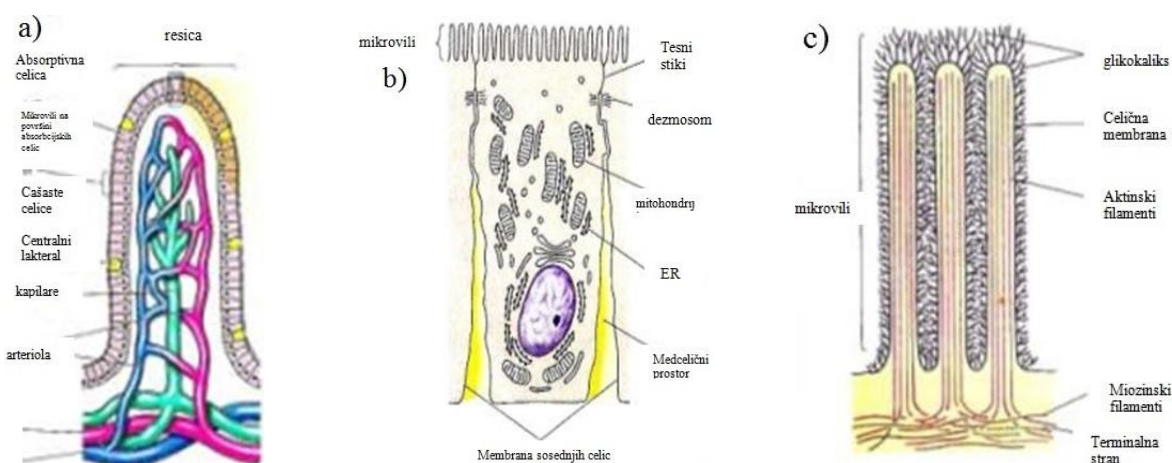


Slika 5: Črevesni epitelij: a-celoten načrt, b-gube, prekrivane z mukoza, c-resice tankega črevesja (Eckert, 2001, Moog, 1981)

Od črevesne vsebine najbolj oddaljena plast je seroza. To tkivo je enako ovojnicam ostalih visceralnih organov. Seroza prekriva plast vzdolžnih gladkih mišic.

Pod njimi notranja plast krožnih gladkih mišic obdaja epitelno plast, ki sestoji iz submukoze in mukoze. Številne krožne gube, obdane s sluznico, štrlijo v svetlino tankega črevesja. Poleg večje površine te gube preprečijo prehitro napredovanje hrane skozi črevo, kar podaljšuje čas prebave (Eckert, 2001).

Naslednja anatomsko struktura so resice. Med resicami so lieberkühnnove kripte. Vsaka resica ima omrežje krvnih žil, sestavljeno iz arteriol, kapilar in venul. V njej je prav tako omrežje limfnih žil. Hranljive snovi so iz črevesja prenesene do ostalih tkiv preko teh krvnih in limfnih žil. Resice prekriva aktivna absorpcijska površina celic tankega črevesja. Epitelij je sestavljen iz stebričastih absorpcijskih celic, ki so vrinjene med čašaste celice. Absorpcijske celice se razmnožujejo v kriпти in se postopoma selijo proti vrhu resice. Pri človeku se dnevno odstrani 2×10^{10} absorpcijskih celic, kar pomeni, da se celotna površina srednjega črevesja zamenja vsakih nekaj dni (Eckert, 2001).



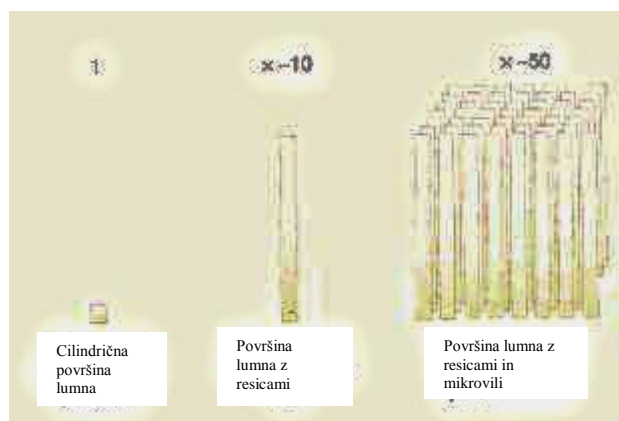
Slika 6: Ultrastrukturne prilagoditve absorpcije in sekrecije: a-resice prekrivane z mukoznim epitelijem, ki sestoji iz absorpcijskih celic in redkejših čašastih celic, b-absorpcijska celica, c-mikrovili (Eckert, 2001, Moog, 1981, Kessel in Kardon, 1979)

Na apikalni strani vsake absorpcijske celice so mikrovili. Na vsaki celici jih je več tisoč. Vsak je visok 0,5-1,5 μm in širok 0,1 μm . Membrana mikrovilov je neprekinjena in obdaja aktinske filamente, ki tvorijo navzkrižne mostne povezave z miozinskimi filamenti. Te predstavljajo dno vsakega mikrovila.

Prekinitve in vzpostavljanje povezav aktina in miozina ustvarjajo enakomerne premike mikrovilov, kar pomaga premešati in izmenjevati črevesno vsebino blizu sprejemne površine. Površina nad mikrovili je prekrita z glikokaliksom, debeline do 0,3 μm . Sestavljen je iz kislih mukopolisaharidov in glikoproteinov ter vode. Mukus se izloča iz čašastih celic, ki so imenovane tako zaradi opažene oblike v histoloških preparatih. Najdemo jih razporejene med absorpcijskimi celicami epitelijskega (Eckert, 2001).

Trdnost povezave sosednjih absorpcijskih celic zagotavljajo dezmosomi. Subapikalno sosednje celice oblikujejo tako imenovano *zonulo occludens*, ki v pasu obdaja vsako celico in tvori tesne stike. Tesni stiki so še posebej slabo prehodni v črevesnem epiteliju, tako je apikalna membrana absorpcijskih celic učinkovito difuzijsko ločena od bazolateralnega dela. Prav tako pa je tudi preprečeno difuzijsko prehajanje med celicami za večino snovi iz črevesne vsebine. Vse hranljive snovi morajo tako prehajati skozi apikalno membrano absorpcijskih celic, njihovo citoplazmo in bazalno membrano, da pridejo v lumen krvnih in limfnih žil znotraj resic. Zelo malo snovi lahko vstopa po paracelularnem prehodu.

Zgradba črevesa omogoča izdatno povečanje absorpcijske površine glede na osnovno površino prebavne cevi in s tem povečanje hitrosti privzemanja vsebine črevesja. Dejanska površina, preko katere poteka absorpcija, se tako poveča za vsaj 500-krat, do površine 200-300 m^2 , kar ustreza površini dveh teniških igrišč (Eckert, 2001).



Slika 7: Ponoritev povečanja absorpcijske površine zaradi posameznih morfološko-anatomskih prilagoditev (Eckert, 2001)

3 MATERIAL IN METODE

3.1 GOJENJE CELIC V POGOJIH IN VITRO

3.1.1 NAMNOŽEVANJE IN VZDRŽEVANJE CELIC

Celično linijo Caco-2 smo pridobili iz zbirke ATCC (American Type Cell Culture Collection - ATCC, Rock-ville, ZDA).

Pred začetkom namnoževanja smo celice odmrznili v vodni kopeli pri 37 °C. Celice smo gojili v plastenkah (Corning Costar, Amsterdam, Nizozemska) s površino 150 cm².

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

Dan po nasaditvi celic smo zamenjali gojišče in ga nato redno menjavali dvakrat na teden.

Za gojitev smo uporabljali **rastno gojišče**, naslednje sestave:

- 88 % osnovnega gojišča (Minimum essential medium eagle - MEME, SIGMA M5650, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Nemčija),
- 10 % toplotno obdelanega seruma zarodkov govedi (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).

Pred preraščanjem površine smo celice znova presajali in ustrezno redčili. Za ločevanje celic od podlage smo uporabili raztopino tripsina v PBS z 0,25 % EDTA (SIGMA T4049). Odlepljanje poteka s proteolizo.

Zaradi zmanjšanja stresa za celice in hitrejšega delovanja encima je bila plastenka med tripsinizacijo v inkubatorju. Če je odlepljanje trajalo več kot 10 minut, so se celice

poškodovale. Stanje smo občasno preverjali z mikroskopom. Znak, da so celice odlepljene, je kroglasta oblika celic.

Če smo celice sprali s podlage, še preden so se v celoti odlepili, so se te od podlage trgale v skupkih in se tudi kasneje med seboj niso ločile. Ob saditvi na podlago so se medsebojno ovirale, zaradi česar jih večina odmre, preživijo pa redke pritrjene celice.

Z odlepljenimi celicami smo rokovali hitro po prej pripravljenem postopku, saj je od tega odvisna stopnja preživetja celic. Pomembno je, da iz plastenke odlepimo čim več celic, da s tripsinizacijo ne delamo selekcije oziroma spreminjamo sestave kulture.

Delovanje tripsina smo ustavili tako, da smo dodali dvakratno količino serumskega gojišča. Del celične suspenzije smo prenesli v novo plastenko in dodali gojišče.

Eksperimentalno delo smo izvajali s kulturami podobne zgodovine presajanj. Tudi s tem smo prispevali k večji ponovljivosti rezultatov.

Gostoto celic smo pred nasaditvijo ugotavljali s hemocitometrom. Za določanje viabilnosti smo jim pred štejetjem primešali barvilo tripan modro (0,4 %, SIGMA T8154), ki vstopa v mrtve celice in jih intenzivno obarva modro.

3.1.2 GOJENJE CELIC V POSKUSU

Za potrebe meritev smo celice nasadili v plastične koške iz poliestra (transwell) s prepustno membrano površine 1,1 cm² in porami velikosti 0,4 µm (Corning Costar).



Slika 8: Ploščica s plastičnimi koški iz poliestra (transwell) s prepustno membrano (katalogni zapis, Corning Costar Transwell Permeable Supports)

Za gojenje na koških smo 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).

To delo terja nekaj spretnosti, zato smo pričeli z vadbo menjave gojišča brez celic. Pridobljene ročne spretnosti za delo s koški se kasneje odražijo v redkejših poškodbah celične plasti.

Pred nasaditvijo smo celice prešteli ter jih redčili z gojiščem, da smo dobili celično suspenzijo z gostoto cca. 200 000 celic/ml. Gostoto celic v suspenziji smo določali s hemocitometrom. Nato smo v spodnje jamice dodali po 1,5 ml gojišča. V koške zgoraj pa smo nasadili po 0,5 ml celične suspenzije tako, da je bilo v vsakem od 12 koškov približno 100 000 celic.

Celicam smo menjavali gojišče trikrat na teden in jih vzdrževali v kulturi 3 tedne.

3.1.3 PREVERJANJE STANJA CELIC

Stanje celic smo preverjali s svetlobnim mikroskopom. Pri tem smo upoštevali sledeče znake:

- Veliko plavajočih celic je bila posledica nepravilnega rokovanja pri presajanju. V tem primeru smo celice presadili v novo gojišče in počakali, dokler celice niso postale vitalne.
- Motnost gojišča kaže na okužbe z glivicami ali bakterijami.
- Delež na novo podvojenih celic kaže na hitrost proliferacije.

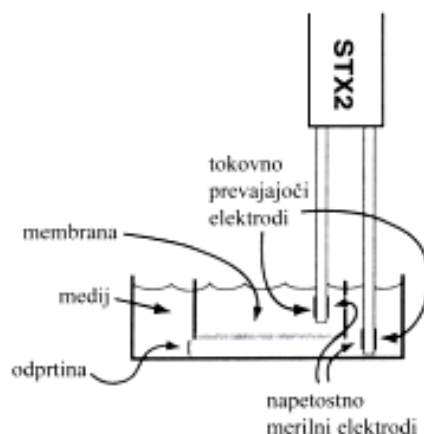
Z delom smo nadaljevali le pri kulturah, ki so po vseh kriterijih izkazovale ustrezno stanje.

3.1.4 MERJENJE PREKOEPITELIJSKE UPORNOSTI

Merjenje prekoepitelijske električne upornosti je standardni postopek, ki omogoča oceno dinamike rasti celic, razvoja celične kulture, vitalnosti in integritete tkiva.

Prekoepitelijsko električno upornost smo merili z Volt-Ohm metrom Millicell ERS-2 s prilagojeno elektrodo. Pred meritvijo smo zamenjali gojišče s svežim testnim gojiščem. V testnem gojišču smo predhodno umerili elektrodo.

Upornost epitelijskega tkiva smo merili vsak drugi dan po menjavi gojišč in dodatno še pred vsako fiksacijo za elektronsko mikroskopijo. Med rastjo, ko celice postopoma preraščajo površino membrane, v košku vrednosti upornosti naraščajo. Ko pa celice povsem prerastejo površino, se upornost čez čas ustali in tudi med posameznimi koški ni večjih razlik.



Slika 9: Postavitev elektrod pri meritvi TEER (prirejeno po navodilih proizvajalca EVOM & EVOMX in STX2, Sarasota)

3.1.5 GOJITEV CELIC NA STEKLENI PODLAGI

Pri večini preparatov smo s SEM opazili, da prihaja do pokanja celičnega sloja. Da bi ugotovili, ali do razpok na sloju celic prihaja zaradi sušenja ali zaradi krčenja in raztezanja membrane, na katero se celice prilepljajo, smo del mikroskopskih analiz izvedli na celicah, ki so zrastle na obdelanih steklenih podlagah. Za ta namen smo vstavili sterilna krovna stekelca na membrano v košku.

Postopek sajenja in gojenja celic je bil enak kot pri osnovnem gojenju. Pri tej seriji poskusov nismo mogli meriti prekoepitelijske upornosti.

3.2 PRIPRAVA PREPARATOV ZA VRSTIČNO ELEKTRONSKO MIKROSKOPIJO

Pri pripravi preparatov za vrstično elektronsko mikroskopijo smo preizkusili 2 protokola:

1. enostopenjska fiksacija zgolj z aldehidi, ki je cenejša in hitrejša, ter
2. dvostopenjska fiksacija z aldehidi in osmijem zagotavlja fiksacijo proteinov in lipidov. Hkrati je ta postopek dražji, traja več časa in vsebuje več toksičnih snovi.

3.2.1 SPIRANJE VZORCA

Pred fiksacijo smo najprej previdno odpipetirali gojišče in vzorce po dvakrat sprali z izotonično solno raztopino (PBS, pH 7,2). Temu spiranju je sledilo še spiranje s kakodilatnim pufrom (7,2 pH).

Pri predhodnih poskusih smo ugotovili, da spiranje s kakodilatno zagotavlja večjo čistost površine preparata.

3.2.2 FIKSACIJA

Odstranili smo pufer in dodali fiksativ (0,5% formaldehid, 1% glutaraldehid, »NAŠ«). Čas fiksacije z aldehidi je bil 45 minut. Po fiksaciji smo spirali v kakodilatnem pufu, pH 7,2 (Protokol 1).

Po drugem protokolu je fiksaciji z aldehidi sledilo spiranje s kakodilatnim pufrom in postfiksacija z 1 % raztopino OsO₄ v kakodilatnem pufu, pH 7,2.

(Glej priloge.)

3.2.3 DEHIDRACIJA

Dehidracija preparata je potekala s prenosom tega skozi zaporedje rastočih koncentracij etanola; in sicer: 50 %, 70 %, 80 %, 90 % in 100 %.

3.2.4 SUŠENJE VZORCA PRI KRITIČNI TOČKI

Za sušenje vzorcev smo uporabljali postopek sušenja pri kritični točki (Balzers (CPD 030)). Vzorce smo iz 100 % etanola prevedli v tekoči CO₂ in posušili po protokolu.

3.2.5 NAMESTITEV PREPARATA NA NOSILEC IN NAPRAŠEVANJE

Iz koška smo izrezali membrano. Kritični del postopka je bilo vihanje membrane. Poskušali smo izrezati čim bolj previdno s čim manj vihanja in odlepljanja epitelija. Izrezali smo tako, da gre čim manj vzorca v odpad.

Nato smo membrano prilepili na standardni nosilec za preparate. Tako pripravljene preparate smo v napravi Bal-Tec (SCD 050) naprašili s plastjo platine, debeline 8 nm.

3.3 ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA

Preparate smo mikroskopirali z vrstičnim elektronskim mikroskopom FE-SEM JSM-7500F (JEOL, Japonska).

Na površini preparata smo naključno izbrali po tri področja. Ta smo posneli pri povečavah 1000x, 5000x, 10000x in po potrebi tudi z večjimi povečavami.

4 REZULTATI

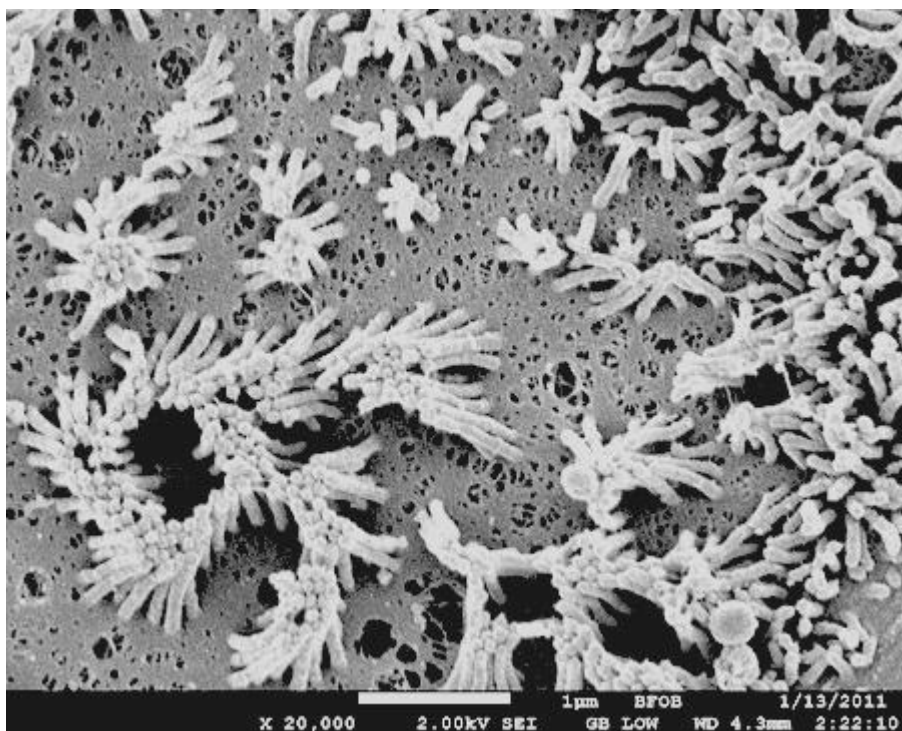
Eksperimentalni del naloge je trajal od 30. 3. 2010 do 17. 2. 2011. V tem času smo opravili 17 gojitvenih ciklov na koških.

Z elektronskim mikroskopom smo posneli 248 mikrografij.

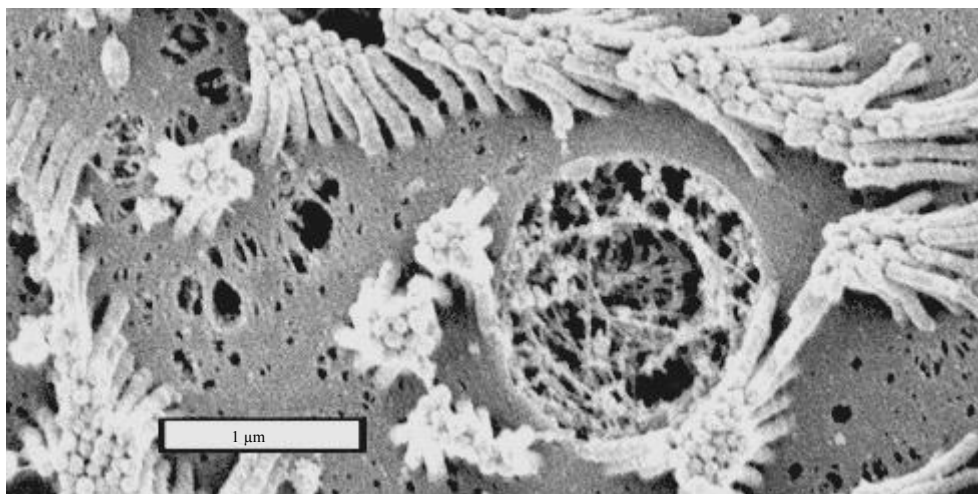
Postopek priprave preparatov, ki smo ga razvili, je bil že uporabljen tudi v diplomski nalogi o različnih načinih gojenja celic Calu-3 (Djurdjevič, 2012).

4.1 FIKSACIJA PREPARATOV

4.1.1 ENOSTOPENJSKA FIKSACIJA



Slika 10: Celice Caco-2: 14 dni po nasaditvi, fiksirane po enostopenjski fiksaciji z aldehidi



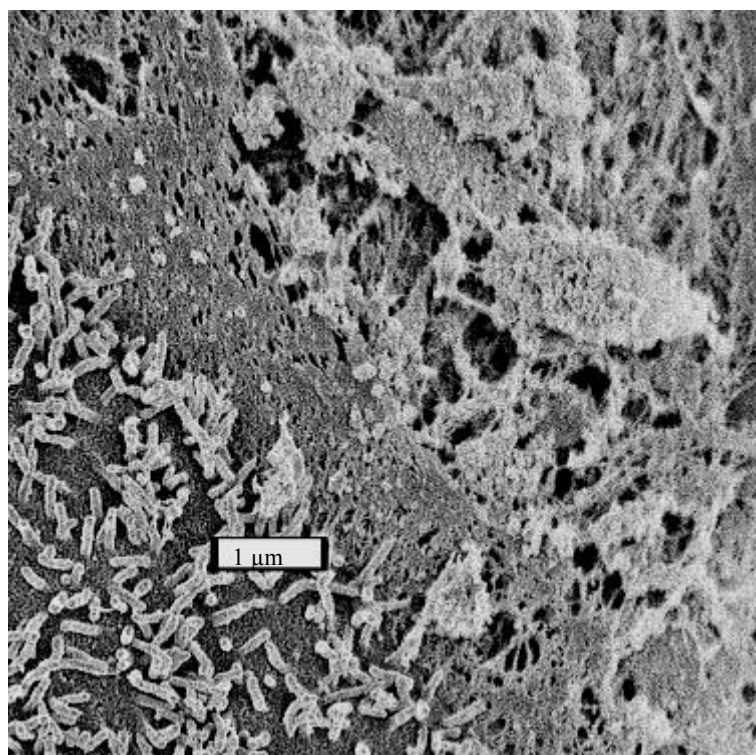
Slika 11: Celice Caco-2: 14 dni po nasaditvi, fiksirane po enostopenjski fiksaciji z aldehidi

Na sliki 10 in 11 vidimo poškodovano membrano. Ta postopek ne daje zaželenih rezultatov.

4.1.2 POSLEDICE PUŠČANJA PREPARATOV V ALKOHOLU

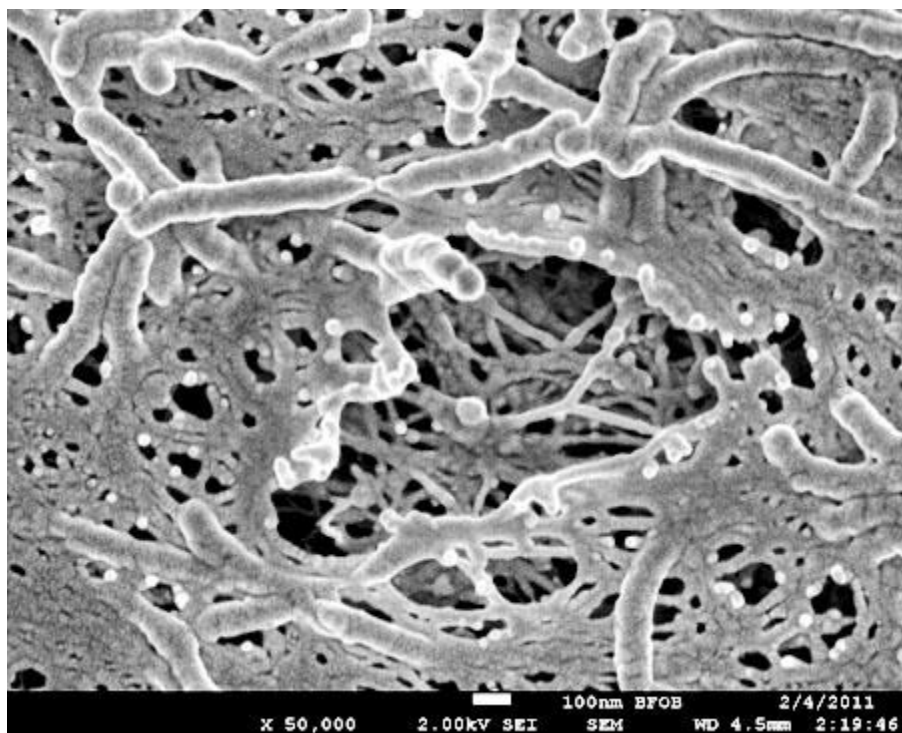
Zaradi prostorske ločenosti celičnega laboratorija in laboratorija za elektronsko mikroskopijo na različnih delih mesta ter dolgotrajnosti priprave preparatov za elektronsko mikroskopijo smo na začetku nekatere preparate puščali v alkoholu in nato nadaljevali s postopkom, ko je dopuščal čas. Preparate smo puščali v 70 % etanolu po priporočilih iz virov (Watson in sod., 1980).

To se je izkazalo za napačno ravnanje. Čim dlje smo puščali preparate v alkoholu, tem bolj so bile očitne poškodbe celične membrane pod elektronskim mikroskopom (Slika 12 in 13).



Slika 12: Celice Caco-2: 3 dni po nasaditvi

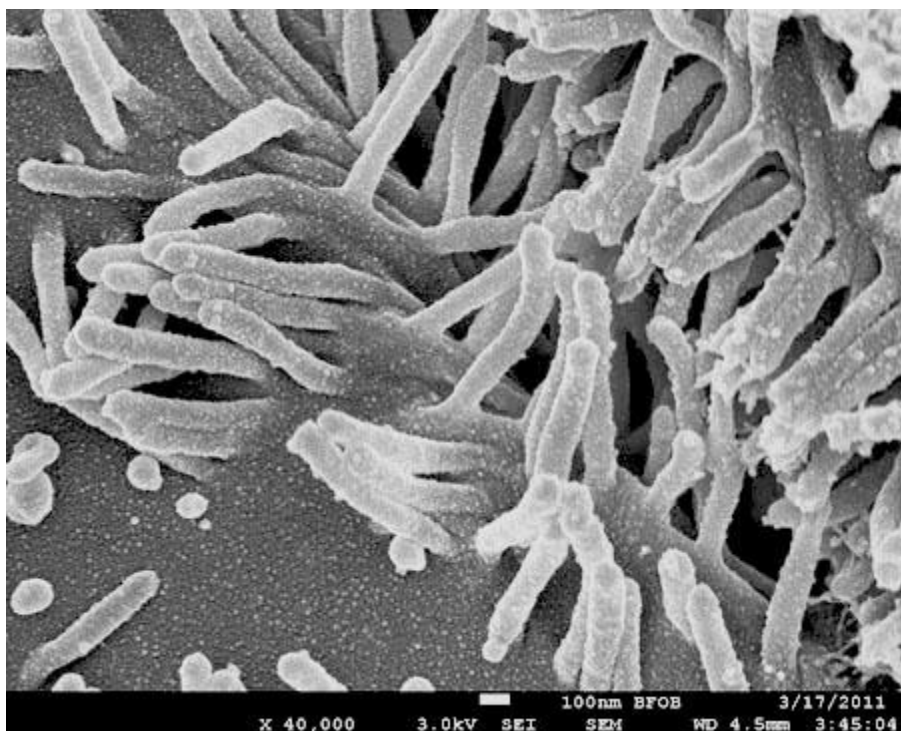
Celice so bile v postopku fiksacije preparatov preveč časa izpostavljene alkoholu.



Slika 13: Celice Caco-2: 8 dni po nasaditvi.

Vidne so poškodbe membrane

4.1.3 DVOSTOPENJSKA FIKSACIJA

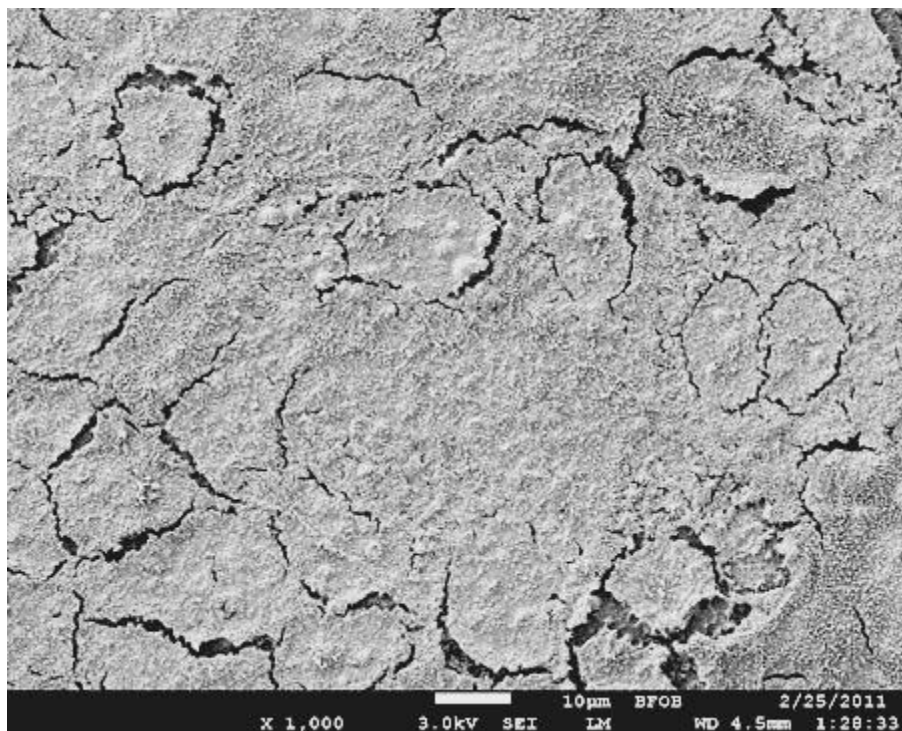


Slika 14: Caco-2 celice: 23 dni po nasaditve, fiksirane z dvostopenjsko fiksacijo

Predvidevali smo, da bomo dobili boljše rezultate s Protokolom 2 (dvostopenjska fiksacija), kjer fiksiramo preparate z aldehydi in osmijem, saj osmij dodatno utrdi lipide v membrani. Želeli smo ugotoviti, ali v našem primeru rezultati opravičujejo zahtevnejši in dražji postopek. Naša predvidevanja so se izkazala za pravilna (Slika 14). Uporaba osmija je pomembno izboljšala kakovost posnetkov. V vseh nadaljnjih raziskavah strukture smo uporabljali to vrsto fiksacije.

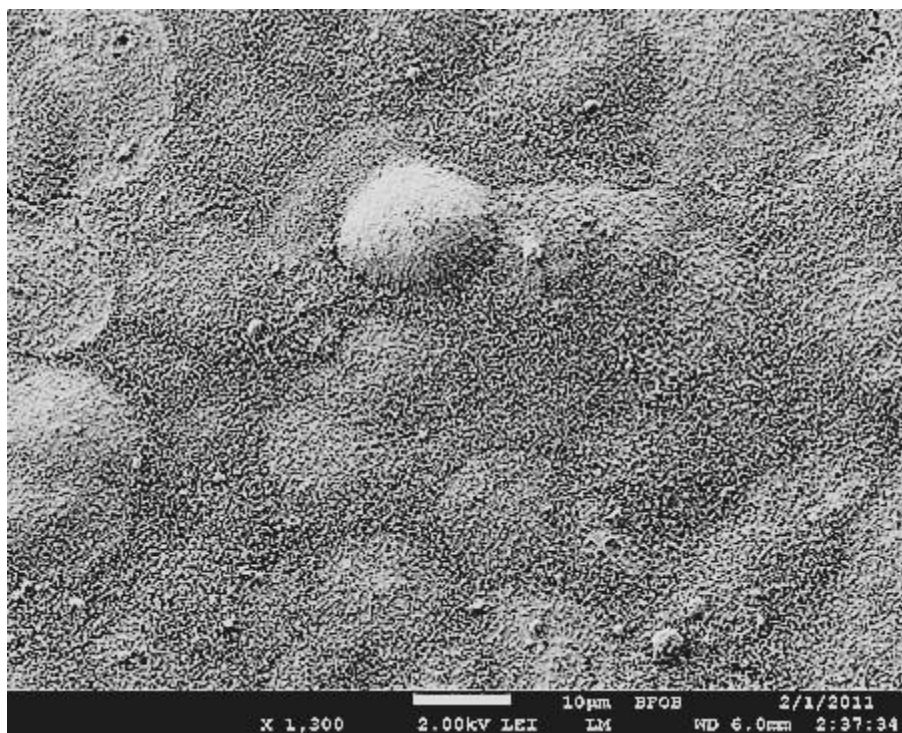
4.1.4 RAZPOKE NA ROBOVIH CELIC

Pri večini preparatov smo opazili, da prihaja do pokanja celičnega sloja. Razpoke so potekale po robovih celic. Razpokanost površine opazovanih preparatov ni bila enakomerna. Opažali smo področja večje razpokanosti, na nekaterih delih pa razpok ni bilo.



Slika 15: Celice Caco-2: 14 dni po nasaditvi

Razpoke na robovih celic



Slika 16: Celice Caco-2 6 dni po nasaditvi - nasajene na stekelce

Da bi ugotovili, ali je za razpokanost (Slika 15) krivo krčenje membrane ali pa so razpoke artefakt pri sušenju, smo celice nasadili na krovna stekelca, ki smo jih položili na membrano v košku.

Na posnetkih je manj razpok (Slika 16), kar potrjuje domnevo, da so razpoke artefakti, ki nastopajo v postopku sušenja ob krčenju membrane koška. Pojavljajo se na robovih med celicami in verjetno kažejo na opazna šibka mesta.

4.2 RAZVOJ CELIČNE KULTURE

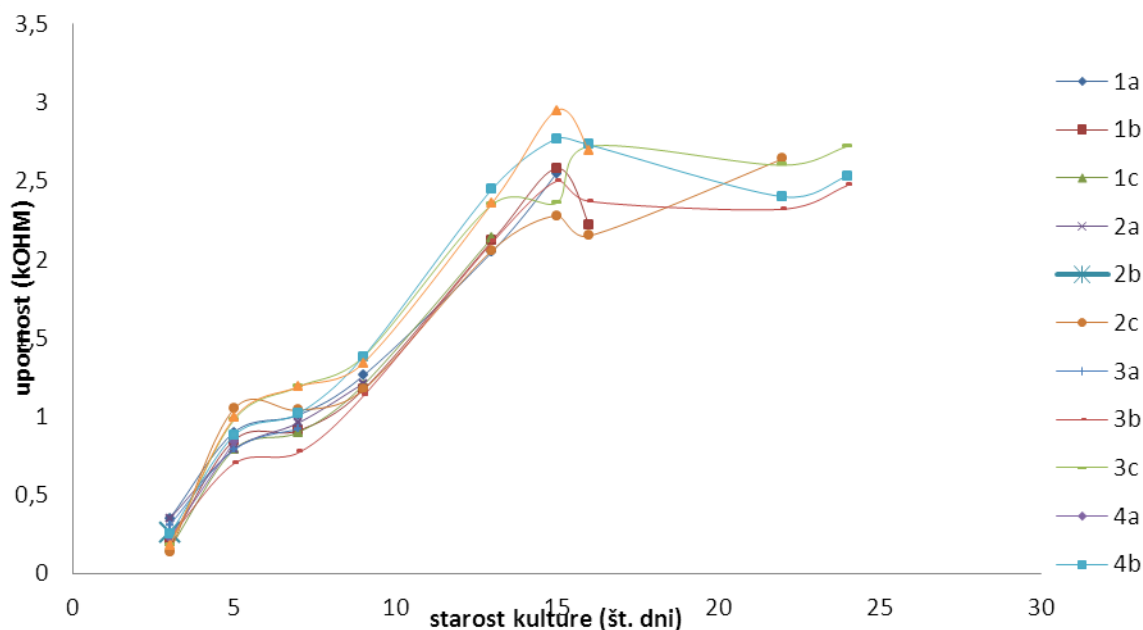
Namen naloge je bil postaviti vzporednice med standardnim spremljanjem razvoja kulture s pomočjo meritev vrednosti TEER in strukturnimi spremembami na površini celic.

Celično kulturo Caco-2 smo gojili na prepustni umetni membrani. Razvoju kulture smo sledili približno 25 dni v času po nasaditvi. Zanimalo nas je, kako se spreminja celični enosloj v odvisnosti od časa po nasaditvi.

Zato smo v starosti 2, 5, 8, 11, 14 in 23 dni po nasaditvi izmerili prekoepitelijsko upornost in fiksirali celice za opazovanje s SEM.

4.2.1 Prekoepitelijska električna upornost celičnega sloja

Upornost epitelijskega sloja je bila izmerjena vsak drugi dan po menjavi gojišča in pred odvzemom koškov za fiksacijo za elektronsko mikroskopijo.



Slika 17: Prekoepitelijska upornost celične kulture Caco-2, nasajene na poliesterske koške

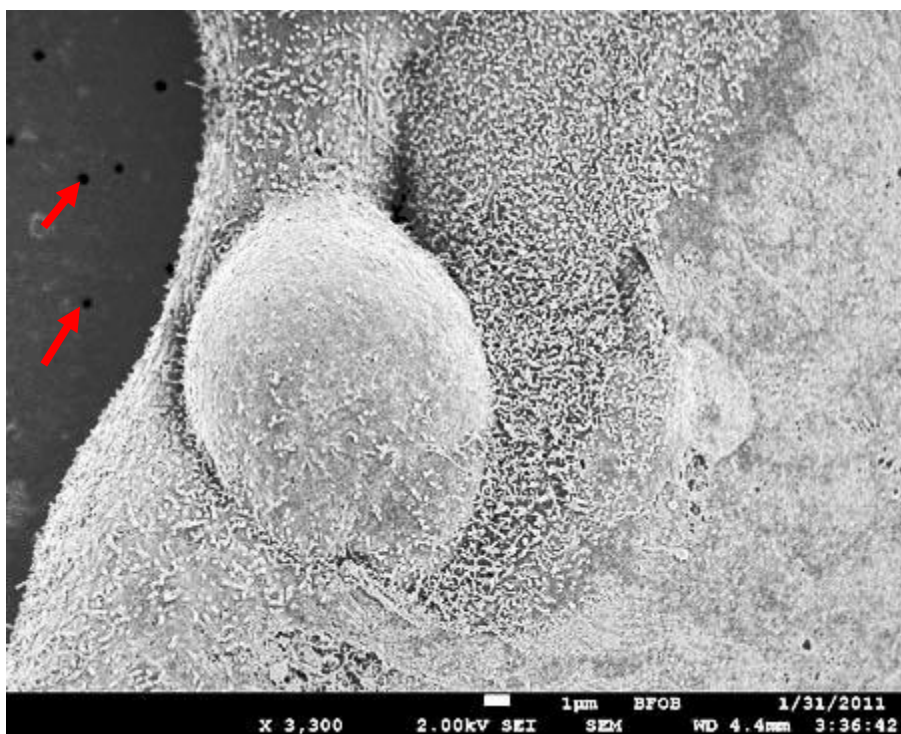
Rast upornosti TEER od začetka do konca gojenja. Vsaka linija predstavlja kulturo na drugem košku. Spremljali smo razvoj 11 sočasnih kultur. Te smo pri različnih časih fiksirali/ustavili rast. Zaradi tega so na koncu prikazane samo še tri linije. V legendi je s številko in črko označen položaj koška na mikrotitrski ploščici.

Z zgornjega grafa razberemo trend rasti upornosti celične kulture do dosežene končne vrednosti.

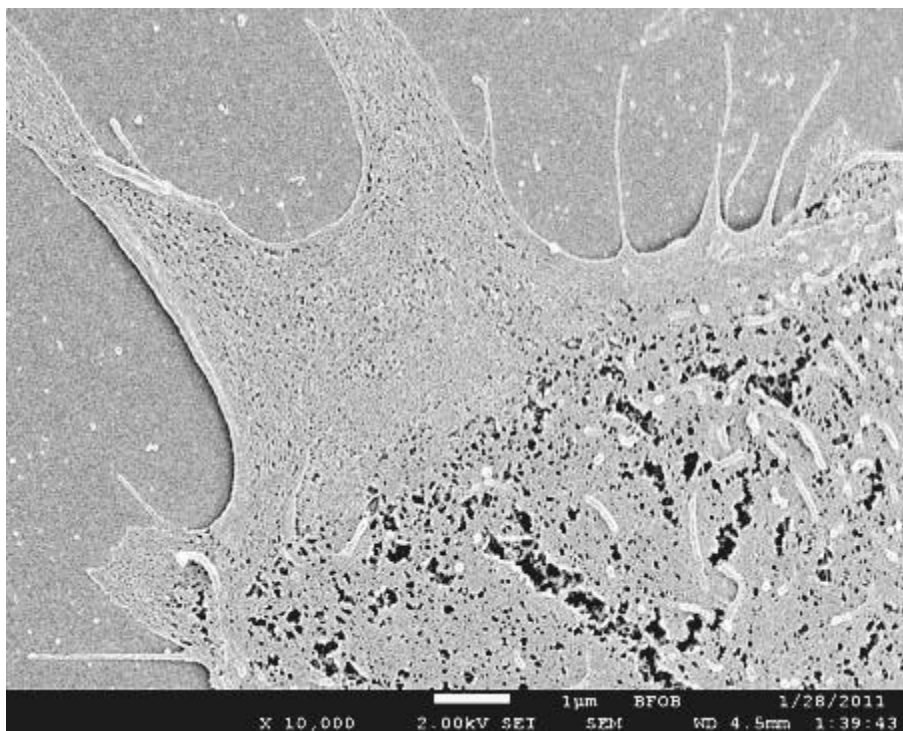
4.2.2 Strukturne spremembe s časom po nasaditvi

V starosti dva dni po nasaditvi se celice že v veliki večini pritrdijo na podlago. V tem času lahko opazujemo začetno stopnjo razvoja enosloja. Na sliki 17 vidimo snope krivulj, ki kažejo spremembe upornosti posameznih koškov s kulturo po času gojenja. Večje spremembe prekoepitelijske upornosti nastopijo po 5, 8, 11 in 14 dneh po nasaditvi, ki jih vidimo kot prelome na črtnem grafu (Slika 17). Zanimalo nas je, kakšen je videz celic pri izbranih starostih epitelijske kulture. Celice starosti 21 in več dni predstavljajo končno diferenciran epitelijski model.

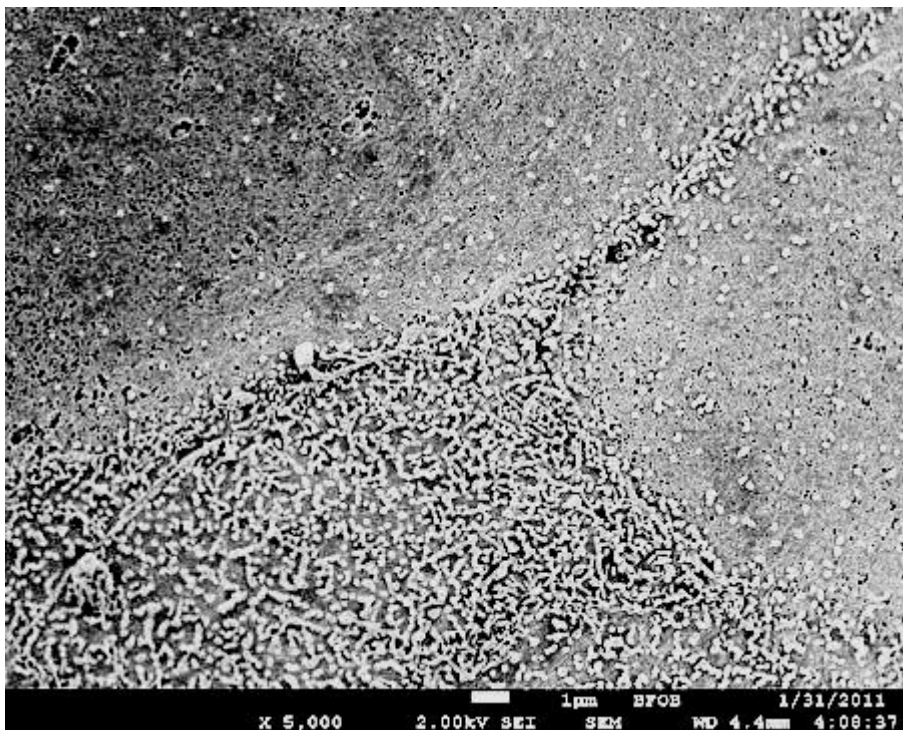
4.2.2.1 CELIČNA KULTURA 2 DNI PO NASADITVI



Slika 18: Celice Caco-2: 2 dni po nasaditvi
Puščici kažeta pore na rastni membrani



Slika 19: Caco-2 celice: 2 dni po nasaditvi - celice nasajene na stekelce

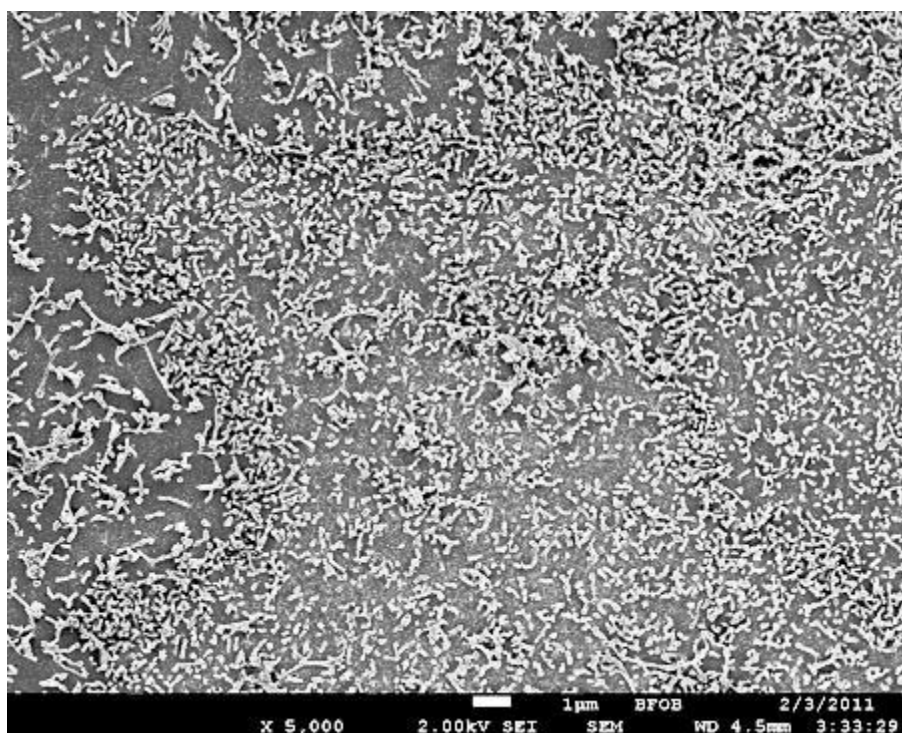


Slika 20: Celice Caco-2: 2 dni po nasaditvi

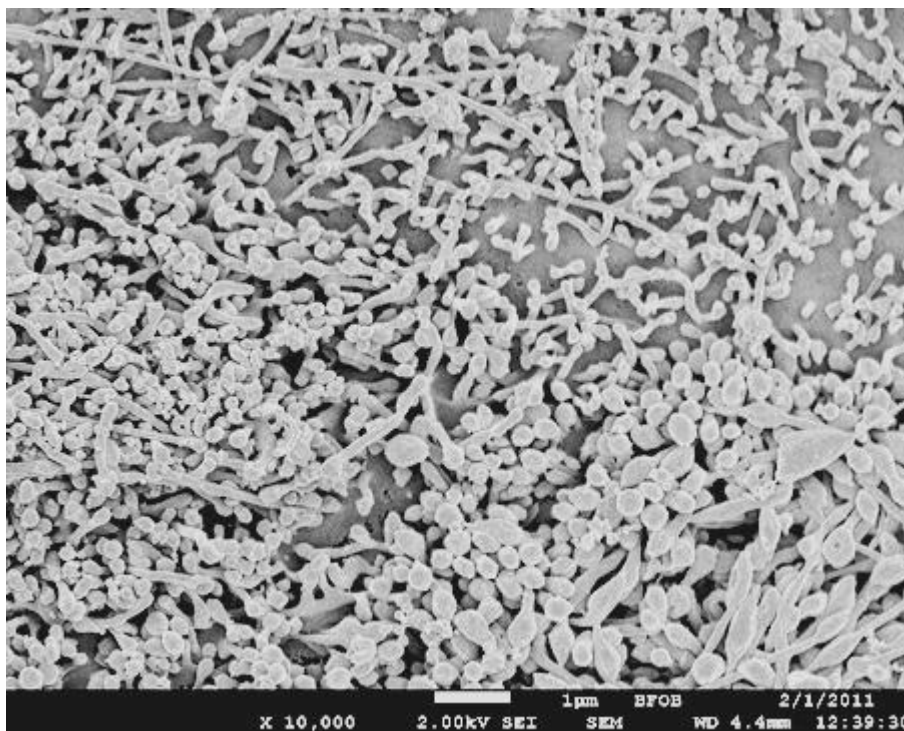
Dva dni po nasaditvi so celice že pritrjene na membrano. Celotna rastna površina membrane v košku še ni preraščena (Slika 18 in 19). Na celični površini so že vidni mikrovili. Na zgornjih slikah vidimo, da se razlikujejo celice Caco-2 med seboj že pri starosti 2 dni (Slika 20). Imajo različno gostoto mikrovilov na celični površini, razlikujejo se tudi po dolžini teh mikrovilov. Nekatere celice potrebujejo več časa, da se razpotegnejo po umetni podlagi (Slika 18).

4.2.2.2 CELIČNA KULTURA 5 DNI PO NASADITVI

Pet dni po nasaditvi na apikalni površini celic opazimo daljše mikrovile, ki so bolj na gosto razporejeni kot pri starosti 2 dni (Slika 21). Opazno je vedno bolj izrazito preraščanje rastne podlage. Površina nepokrite rastne podlage se zmanjšuje.



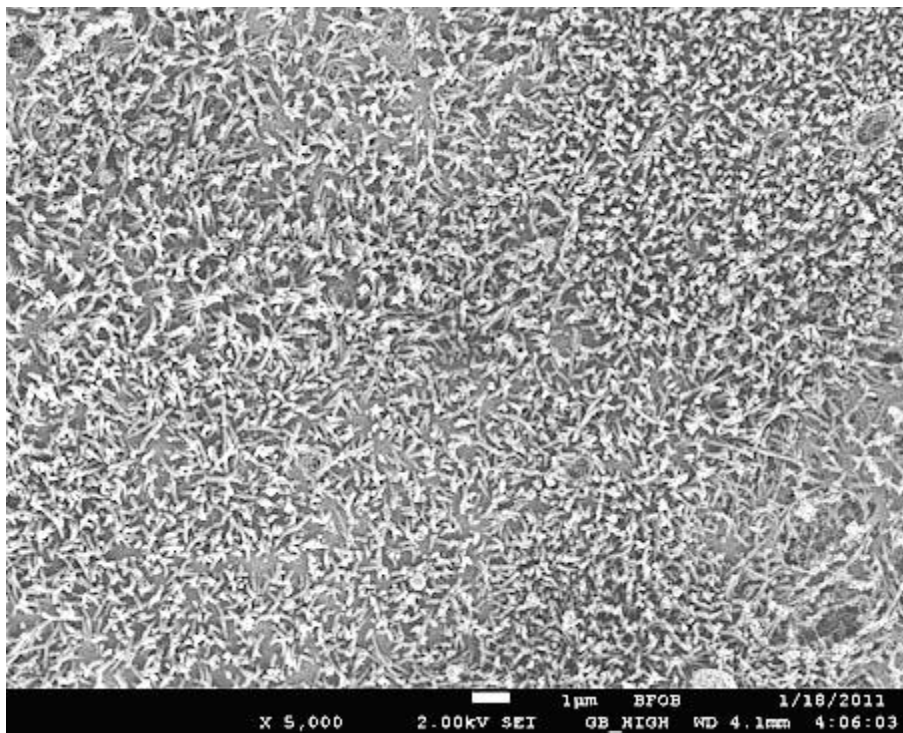
Slika 21: Celice Caco-2: 5 dni po nasaditvi



Slika 22: celice Caco-2 5 dni po nasaditvi - celice nasajene na stekelce
Oblika mikrovilov odstopa od tipičnih

Na slikah 21 in 22 sta primerjani morfologiji mikrovilov ob gojenju na stekleni oziroma na prepustni poliestrski podlagi. Na sliki 22 opazimo drugačno obliko mikrovilov celic, ki so nasajene na stekelce v primerjavi s celicami, ki so nasajene na membrano.

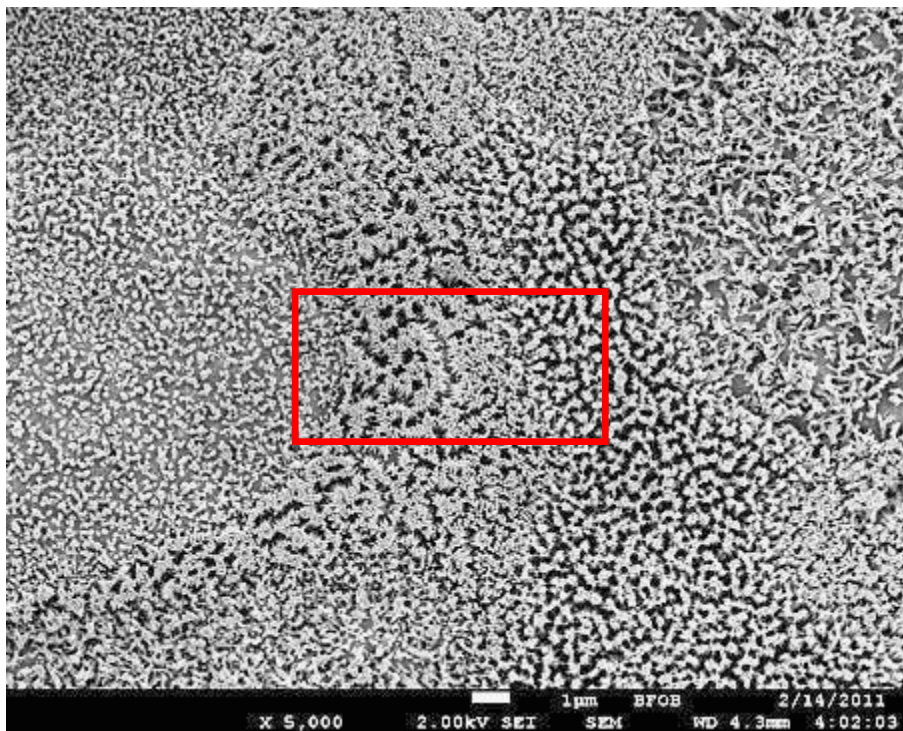
4.2.2.3 CELIČNA KULTURA 8 DNI PO NASADITVI



Slika 23: Celice Caco-2: 8 dni po nasaditvi

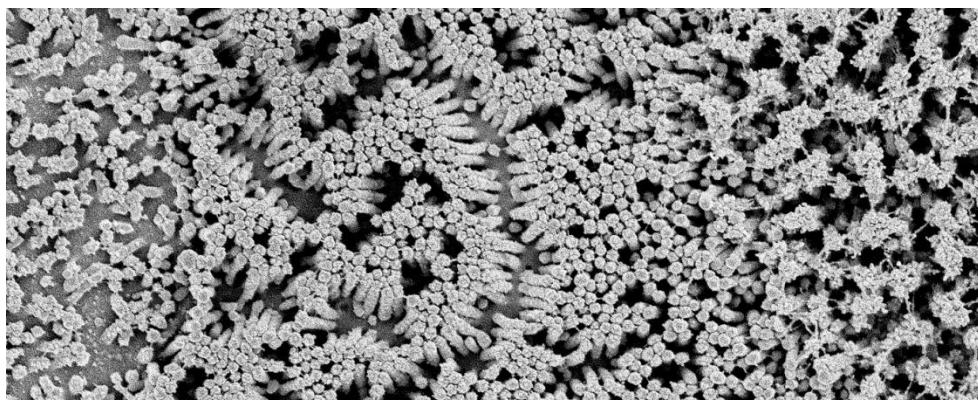
Pri starosti 8 dni nismo več opazili nepreraščenih površin (Slika 23). Rast in viabilnost sta veliki. Do tu naraščanje prekoepitelijske upornosti pripisujemo postopnemu zasedanju prostih površin na podlagi s celicami. V nadaljevanju se gostota celic še vedno povečuje na račun zmanjševanja površine, ki jo zaseda posamezna celica. Povečuje pa se tudi količina mrtvih celic, ki se nabira nad epitelijskim modelom in jo odstranjujemo ob rednih menjavah gojišč. Pri tej starosti se povečuje gostota mikrovilov, sočasno se povečuje tudi dolžina mikrovilov.

4.2.2.4 CELIČNA KULTURA 11 DNI PO NASADITVI



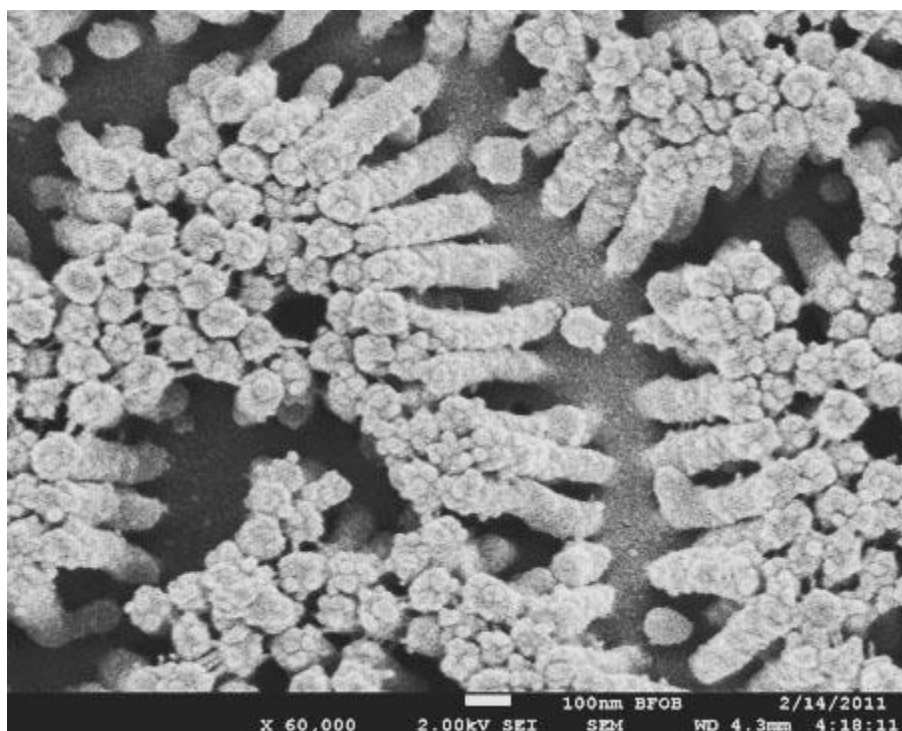
Slika 24: Celice Caco-2: 11 dni po nasaditvi

Označeno mesto je prikazano pod večjo povečavo na spodnji sliki (Slika 25)

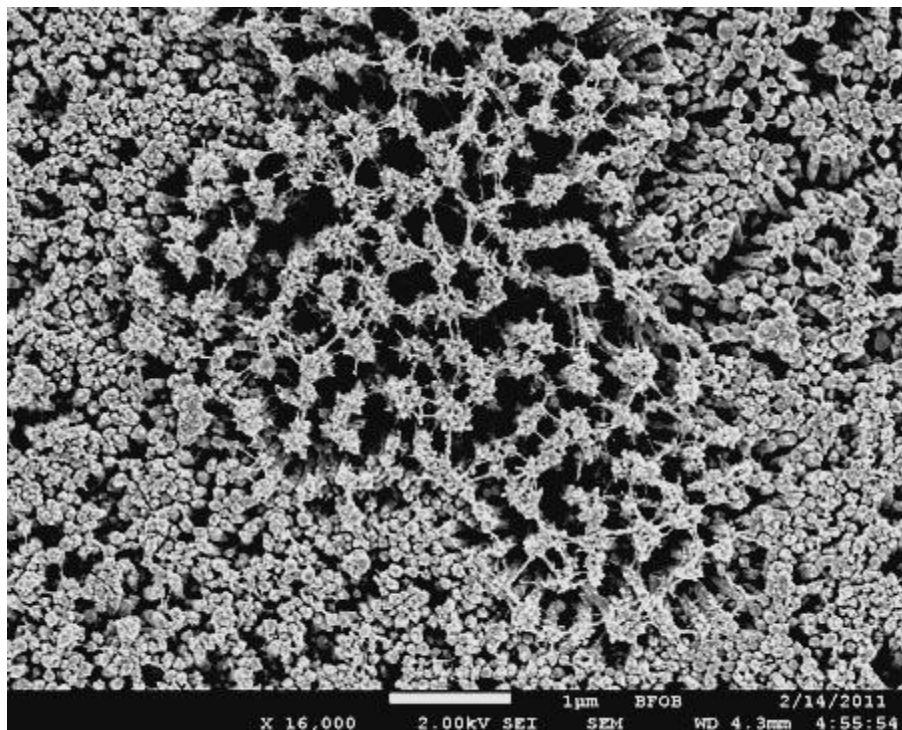


Slika 25: Celice Caco-2 11 dni po nasaditvi

Slika prikazuje tri celice. Očitna je velika raznolikost v razporeditvi, velikosti in organizaciji mikrovilov po površini med celicami na zelo majhnem območju



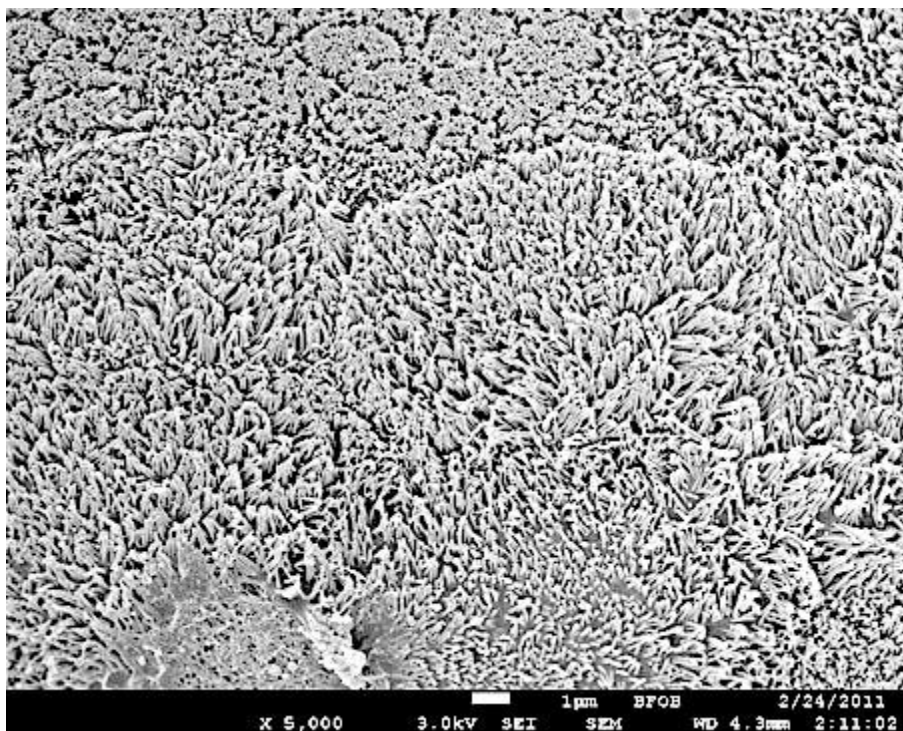
Slika 26: Celice Caco-2: 11 dni po nasaditvi



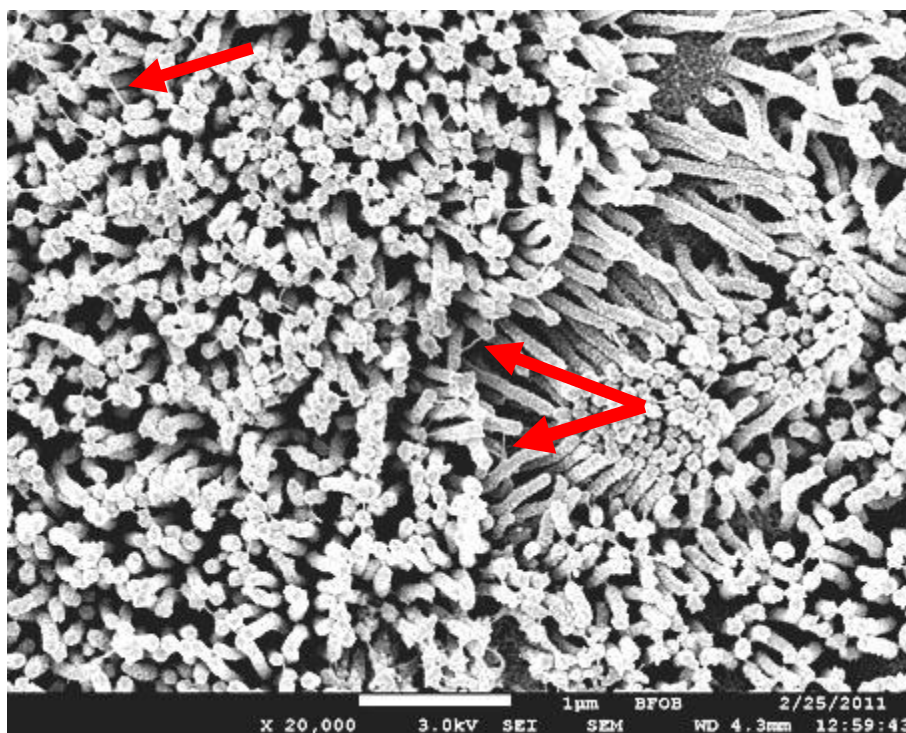
Slika 27: Celice Caco-2: 11 dni po nasaditvi

Rast dolžine mikrovilov se pri starosti 11 dni po nasaditvi zaključuje. Opazimo veliko raznolikost mikrovilov med posameznimi celicami (Slike 24, 25, 26 in 27). Pri tej starosti imajo celice najbolj jasno definirane vzorce razporeditev mikrovilov po površinah celic (Slika 24). Gostota mikrovilov se še naprej povečuje.

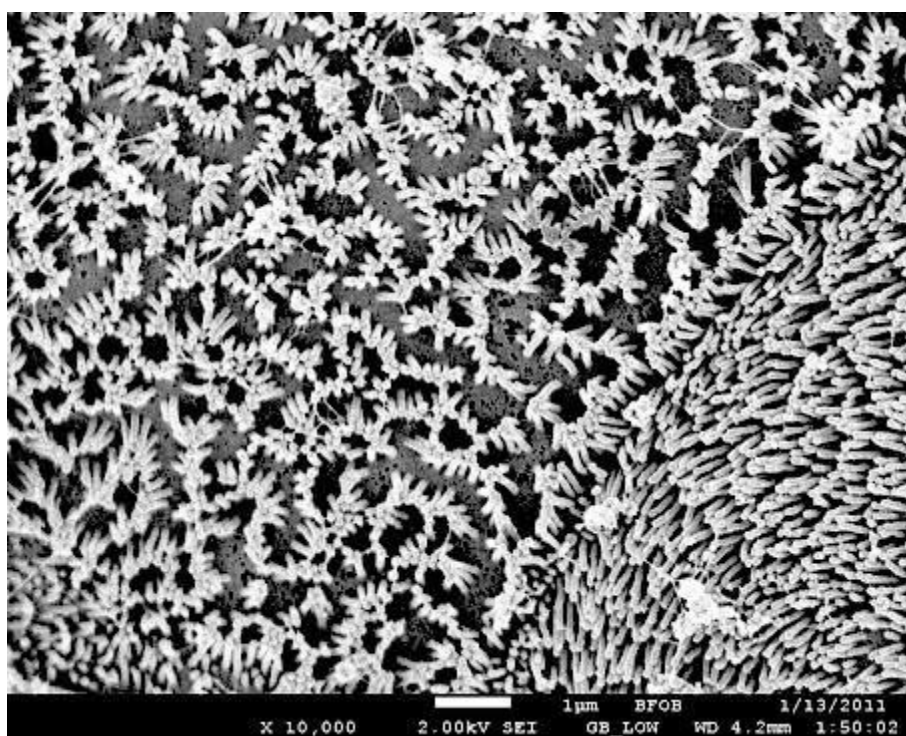
4.2.2.5 CELIČNA KULTURA 14 DNI PO NASADITVI



Slika 28: Celice Caco-2: 14 dni po nasaditvi



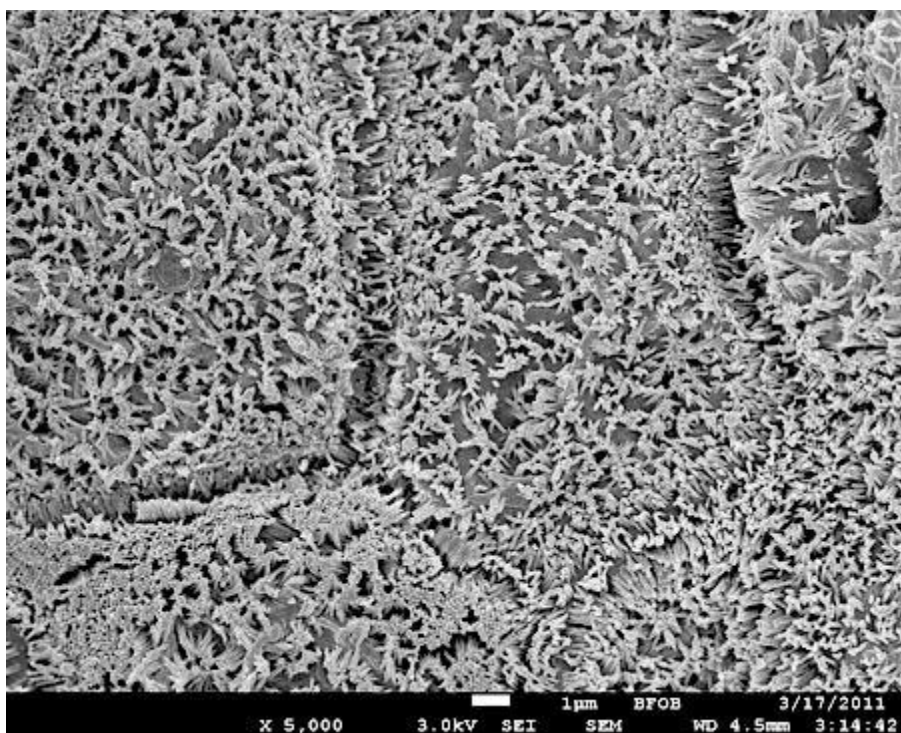
Slika 29: Celice Caco-2 14 dni po nasaditvi. Puščice označujejo povezave med mikrovili. Na zgornji sliki (Slika 29) so vidne možne povezave med posameznimi mikrovili.



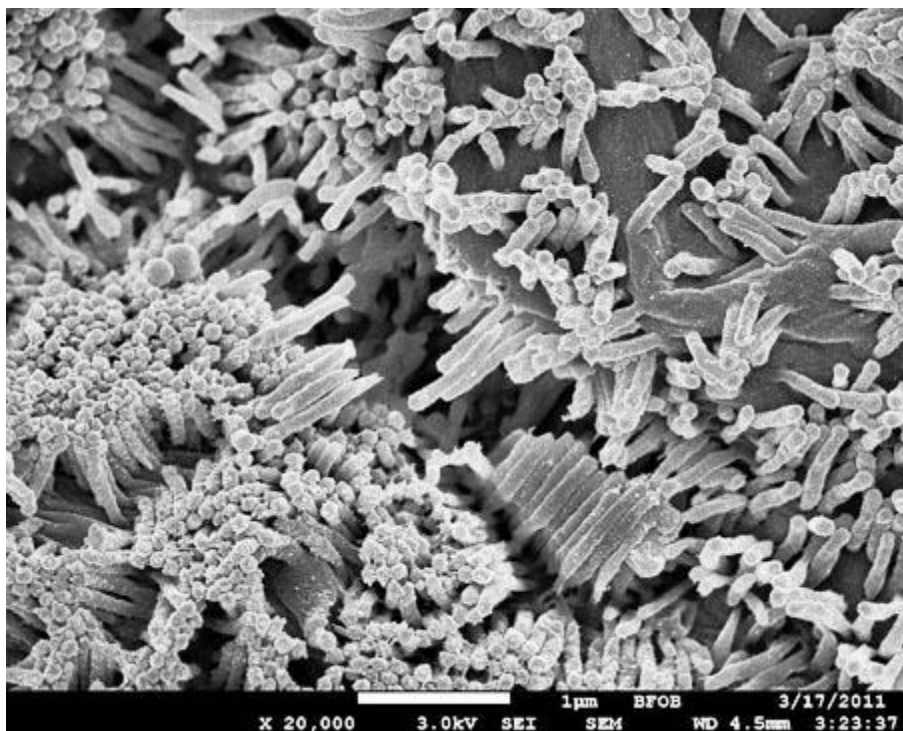
Slika 30: Celice Caco-2 14 dni po nasaditvi

Skozi staranje celične kulture opazimo daljšanje mikrovilov in čedalje bolj gosto posejanost mikrovilov po celični površini do približno 14. dne po saditvi (Slika 28). Iz videza celic ni mogoče točneje določiti starosti kulture zaradi velikih razlik med posameznimi celicami (Slika 30). Na elektronskih mikrografijah vidimo, da se gostota in dolžina mikrovilov na splošno povečuje. Če pa opazujemo več celic znotraj enega preparata, opazimo veliko raznolikost med celičnimi površinami. Celice so na različnih stopnjah razvoja znotraj istega preparata. Splošno pa se enosloj razvija v isto smer.

4.2.2.6 CELIČNA KULTURA 23 DNI PO NASADITVI



Slika 31: Celice Caco-2: 23 dni po nasaditvi

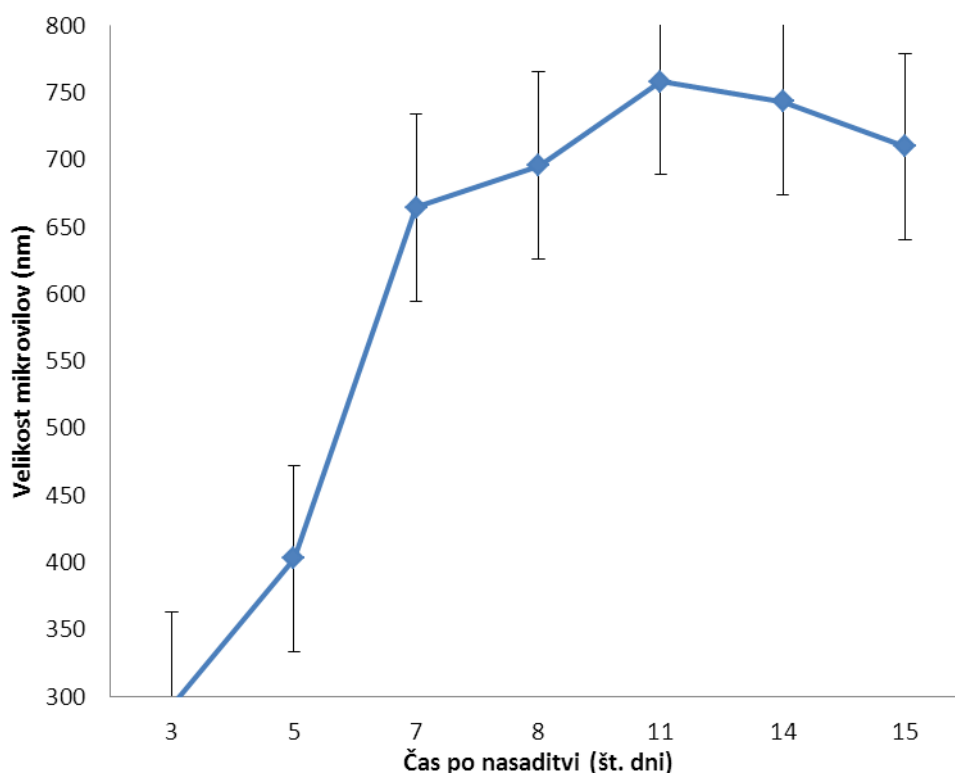


Slika 32: Celice Caco-2: 23 dni od nasaditve

Celična kultura Caco-2 pri starosti 23 dni je zrela kultura tik pred koncem gojenja (Slika 31 in 32).

4.2.3 RAST DOLŽINE MIKROVILOV S STAROSTJO KULTURE

Pri opazovanju posnetkov kulture Caco-2 ob različnih časih po saditvi smo kljub raznolikosti celic lahko ugotovili večanje gostote in dolžine mikrovilov na apikalni površini celic. Naključno smo na vsakem preparatu izbrali tri področja in izmerili dimenzije 100 mikrovilov. Tako dobljene vrednosti smo statistično obdelali.



Slika 33: Rast dolžine mikrovilov

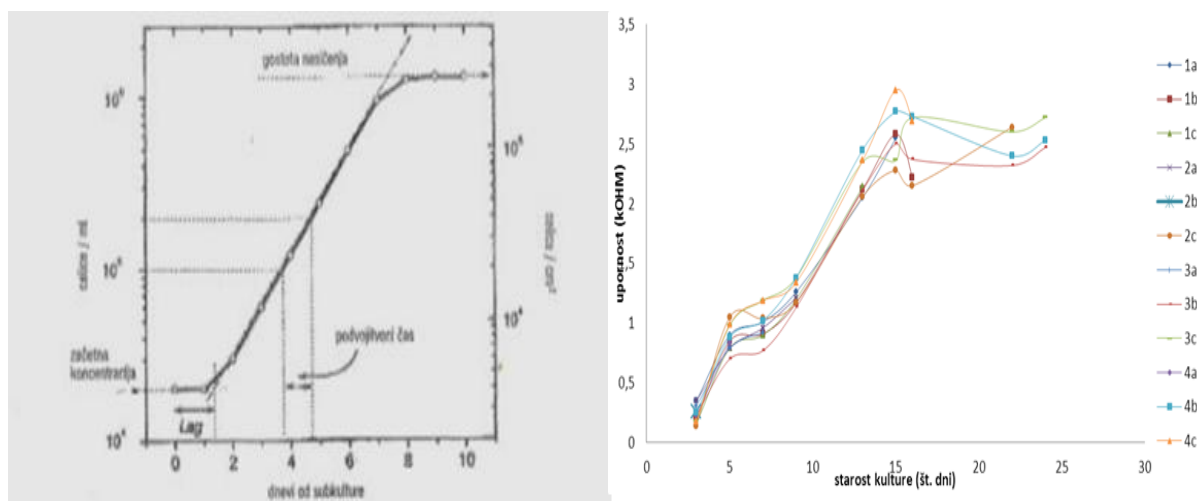
Slika 33 prikazuje graf rasti dolžine mikrovilov. Dolžina mikrovilov v prvih dneh po saditvi epitelijskega modela narašča, nato se ustavi. Pri naših kulturah smo izmerili najvišje vrednosti okoli enajstega dne. Po »starosti 15 dni« ni bilo mogoče meriti mikrovilov zaradi njihove prevelike gostote in vijugaste oblike. Širina mikrovilov pri različnih starostih ostaja enaka in znaša okoli 1 nm.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZVOJ CELIČNE KULTURE

Epitelijska kultura Caco-2 se oblikuje na prepustni umetni (poliesterski ali polikarbonatni) podlagi. Pri poskusih s celičnimi kulturami se za meritve prehajanja učinkovin uporablja epitelij, starosti med 21 in 28 dni, potem pa nastopijo spremembe, ki vodijo v zmanjšanje integritete epitelijskega (Frontela-Saseta in sod., 2011, Artursson in sod., 1997). Fiziološko stanje se ocenjuje glede na prekoepitelijsko upornost, kar nam omogoča ponovljivost in primerljivost rezultatov.

S hkratnim merjenjem prekoepitelijske električne upornosti in s spremljanjem morfoloških sprememb na apikalni površini celičnega sloja smo želeli postaviti vzporednice med tema načinoma spremljanja razvoja kulture (Slika 34). Zanimalo nas je, kakšen je videz celic pri različnih časih gojenja oziroma ali lahko opazimo površinske strukturne spremembe celic, medtem ko se spreminjajo električne lastnosti epitelijskega modela.



Slika 34: Primerjava rastne krivulje (levo) z meritvami prekoepitelijske upornosti (desno)

Razlike upornosti kažejo na spreminjanje prevodnosti za ionske tokove med apikalno in bazalno stranjo celičnega sloja. Ovira toku ionov so lahko povezave med celicami, zlasti tesni stiki, debelina celičnega sloja verjetno pri tem ne igra ključne vloge, saj gre za

enosloj, pri čemer večji del celične električne upornosti predstavljata apikalna in bazalna celična membrana (Cohen, 1979).

Kljub podvrženosti meritev sipanju zaradi motečih dejavnikov so na grafu meritev prekoepitelijske upornosti opazne točke preloma. Na teh točkah je prišlo do sprememb v trendu spreminjanja prekoepitelijskih upornostih (Slika 17).

Rastna krivulja (Slika 34, levo) kaže trend rasti upornosti epitelijskega modela. Meritve kažejo, da električna upornost narašča s časom razvoja kulture. Primerjava s splošno krivuljo rasti daje navidezne podobnosti, če ne upoštevamo, da celice prerastejo rastno površino že v prvih nekaj dneh po nasajanju. Vendar v tem primeru upornost narašča še dolgo po tem, ko celice že dosežejo strnjeno prerast rastne podlage. Strnjeno prerast celice dosežejo že po nekaj dneh, medtem ko upornost narašča še dolgo za tem. To in dejstvo, da se pri drugih kulturah upornost še zdaleč ne povzpne tako visoko, govori o tem, da gre tu za drugačno povezovanje med celicami - strukture tesnih stikov.

Koliko celic je na membrani posameznega koška, je težko oceniti. Večina upornosti preko epitelijskega modela naraste šele po strjnjeni prerasti. Zato lahko sklepamo, da je sprememba upornosti verjetneje posledica sprememb v lateralni povezanosti med celicami in vzpostavitvi struktur na tkivni ravni.

S časom razvoja celične kulture opazimo daljšanje mikrovilov in njihovo čedalje gostejšo posejanost po površini. Ta narašča do približno 14. dne. Zaradi velike variabilnosti med celicami ni možno določiti, kakšen je tipičen izgled celice pri določeni starosti. Na elektronskih mikrografijah vidimo, da se gostota in dolžina mikrovilov pri večini celic povečuje, če pa primerjamo apikalne površine več celic znotraj istega preparata, pa opazimo njihovo veliko medsebojno raznolikost. Navkljub različnim gostotam preraščenosti znotraj istega preparata, pa se v splošnem epitelijski model s časom razvija.

Velika raznolikost med celičnimi površinami je lahko povezana z različnimi stopnjami razvoja celic v procesu diferenciacije, razlike pa so lahko tudi posledica razlik v genetskem

ozadju, saj je zaradi rakastega izvora kultura celic genetsko heterogena. V splošnem pa se celični enosloj razvija v opisani smeri.

Po okoli 14 dneh je v kulturi dosežena najvišja vrednost prekoepitelijske upornosti. Domnevno s tem sovпада tudi dokončna vzpostavitev struktur medceličnih povezav, ki omejuje prehodnost za nosilce naboja. Navkljub celotni zasedenosti rastne podlage se v tem obdobju (8-14 dan) TEER najhitreje povečuje.

Zastavlja se vprašanje, kaj je najprimernejša starost celičnega modela črevesnega epitelija za poskuse. Predlagano starost kulture je 21–28 dni, ko je kultura zanesljivo diferencirana, kljub temu da pri tej starosti že prihaja tudi do odmiranja in izmenjave posameznih celic (Frontela-Saseta in sod., 2011). Že pri starosti 14 dni smo izmerili podobno upornost epitelija kot pri 21. dnevu. Pod elektronskim mikroskopom opazimo pri obeh starostih kulture podobno morfološko diferenciran celični enosloj. Glede na to bi morda lahko skrajšali čas gojenja celic ali pa podaljšali čas uporabnosti epitelijskega modela za izvedbo poskusov.

Med tripsinizacijo se mikrovili ne razgradijo v celoti in jih lahko opazimo že pri sveže pritrjenih celicah. Časovna dinamika obnovitve mikrovilov ne kaže neposredne povezanosti z vzpostavitvijo prekoepitelijske upornosti, ampak je prej kot ne spremljajoči proces, ki kaže na oblikovanje normalnega enterocitnega fenotipa pri celicah v kulturi. Dolžina mikrovilov v prvih dneh po saditvi epitelijskega modela narašča, nato se ustavi pri starosti 8-11 dni.

Mikrovili celic, nasajenih na stekelca, so videti spremenjenih oblik. To je verjetno posledica drugačnega načina gojenja. Celice obdaja gojišče samo z apikalne strani. Razlike glede na celice, gojene na običajni podlagi, se s časom gojenja povečujejo vse do regresije kulture, ki ob tovrstnem gojenju približno sovпада s preraščanjem celotne površine. Glede na to je verjetno, da je pri tem vključena tudi motnja preskrbe celic preko bazolateralne površine celic. Tudi pri gojenju celic Caco-2 v osnovni plastiki opazamo točke propadlega epitelija, ko se prerast približuje konfluenci.

5.2 ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA

Fiksacija je postopek, ki ustavi življenjske funkcije in stabilizira strukturo vzorca. Stabilizacija je nujna, saj morajo vzorci prenesti razne sile, ki delujejo na celice med dehidracijo, sušenjem in ob izpostavitvi snopu elektronov v elektronskem mikroskopu (Lutar, 2009).

Vsaka priprava vzorca za elektronsko mikroskopijo je poseganje v njegovo strukturo in povzroči neizogibne spremembe. Kako torej vemo, da je elektronska mikrografija podobna stanju vzorca? Potrebno je dobro poznavanje artefaktov in preizkušanje različnih postopkov, da dobimo najbolj optimalno sliko (Rode, 1991).

Biološke vzorce je potrebno zaradi narave pripraviti na specifičen način. Vsako metodo, ki jo izberemo za pripravo vzorcev, je potrebno prilagoditi vrsti vzorca. V našem primeru se je za najboljšo izkazala dvostopenjska fiksacija z aldehydi in osmijem (Echlin, 1978). Pri pripravi preparatov je bila najbolj izpostavljena membrana, zato je bilo potrebno postopek (zlasti dehidracijo) izpeljati čim hitreje (Cohen, 1979).

Aldehydi denaturirajo beljakovine s tem, da navzkrižno povežejo proste amino skupine in s tem učvrstijo strukturo preiskovanega vzorca (Waterman, 1980). Ojačitev strukture je pomembna predvsem zato, ker pri dehidraciji prihaja do številnih sprememb. Za fiksacijo bioloških vzorcev smo uporabili kombinacijo obeh: hitro prodiranje in delna stabilizacija struktur s formaldehidom in počasnejše prodiranje ter trajnejša stabilizacija z glutaraldehydom (Waterman, 1980).

Kot sekundarni fiksativ se uporablja osmijev tetroksid. Za razliko od aldehydov, ki stabilizirajo proteine, OsO_4 stabilizira predvsem lipide, ki se sicer v večji ali manjši meri med dehidracijo ekstrahirajo. Izboljša tudi električno prevodnost bioloških vzorcev. Slabost OsO_4 je počasno prodiranje, toksičnost in cena (Waterman, 1980).

Membrana enterocitov poleg fosfolipidov vključuje tudi različne beljakovinske molekule, ki služijo za transport snovi in druge funkcije. Na preparatih, ki imajo poškodovano membrano, so v notranjosti celic opazne opazne proteinske strukture, pri katerih gre verjetno za citoskelet (Waterman, 1980).

Razpoke so artefakt, ki praviloma nastaja v postopku sušenja. Razpoke preparatov so vidne na vseh preparatih ne glede na način gojenja. Pojavljajo se na robovih celic in kažejo na očitno šibka mesta v medceličnih povezavah.

6 POVZETEK

Namen naloge je bil postaviti vzporednice med standardnim spremljanjem razvoja kulture s pomočjo meritev vrednosti TEER in strukturnimi spremembami na celičnem sloju po starosti od nasaditve. Celično kulturo Caco-2 smo fiksirali pri različnih časih po nasaditvi in jih posneli z elektronskim mikroskopom.

Preparate smo fiksirali po dveh protokolih: enostopenjska fiksacija z aldehidi in dvostopenjska z aldehidi in osmijem. Slednja se je izkazala za boljšo metodo, kljub temu da je dražja in vsebuje fiksativ več toksičnih snovi. Uporabljali smo jo pri vseh nadaljnjih raziskavah razvijajočih se celic v kulturi.

Na elektronskih mikrografijah vidimo, da se gostota in dolžina mikrovilov s časom gojenja praviloma povečuje. Če pa opazujemo več celic znotraj enega preparata, opazimo veliko raznolikost med celičnimi površinami. Celice znotraj istega preparata so na različnih stopnjah morfološke diferenciacije v funkcionalne enterocite.

Meritve TEER kažejo dinamično nastajanje tesnih stikov oziroma so pokazatelj vzpostavitve integritete epitelija. Meritve jasno kažejo rast upornosti s starostjo epiteljskega modela. Vzpostavitev tesnih stikov sledi fazi preračanja rastle površine, to pa se tudi odraža v hitrem skoku TEER. Razvoj dolžine mikrovilov prehiteva vzpostavitev integritete epiteljskega modela in z njo ni neposredno povezan.

7 VIRI

- Artursson P. 1990. Epithelial transport of drugs in cell culture. I.A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79: 476-82
- Artursson P., Borchartd R.T. 1997. Intestinal Drug Absorption and Metabolism in Cell Cultures: Caco-2 and Beyond. *Pharmaceutical Research*, 14: 1655-1658
- Artursson P., Palm K., Luthman K. 2001. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced Drug Delivery*, 46: 27-43
- Atkins P.W. 2010. *Physical chemistry*. 9. izdaja. Oxford, W.H. Freeman and Company, University Press, 975 str.
- Batista U. 2005. Gojenje sesalskih celic v *in vitro* pogojih. Ljubljana, Študentska založba: 63 str.
- Cencič A. 2012. Ali lahko celični modeli nadomestijo laboratorijske živali? Maribor, Univerza v Mariboru: 32 str.
- Cohen A.L. 1979. Critical point drying – Principles and procedures. V: Preparation of biological specimens for scanning electron microscopy. Murphy J.A., Romans G.M. O'Hare (ur.), Research Institute, Chicago, Scanning Electron Microscopy, 303-323
- Cooper G. M. 2000. *The cell: a molecular approach*. 2. izdaja. Washington DC, ASM Press: 571-607

- Djurđjevič I. 2012. Spremljanje diferenciacije celic linije Calu-3 z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 90 str.
- Echlin P. 1978. Coating techniques for scanning electron microscopy and x-ray microanalysis. V: Preparation of biological specimens for scanning electron microscopy. Murphy J.A., Romans G.M. (ur.), O`Hare, Scanning Electron Microscopy: 109-132
- Frontela-Saseta C., Peso-Echarri P., Gonzalez-Bermudez C., Lopez-Nicolas R., Martinez-Gracia C., Ros-Berruezo G. 2011. CACO-2 cells and their uses. V: A critical perspective on cell lines studies in nutrition: the case of intestinal absorption. 3. izdaja, Rome, Italy, Schulz A. M. (ed.), National research institute for food and nutrition: 31-48
- Hidalgo I. J., Raub T. J., Borchardt R. T. 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 96: 736-749
- Hidalgo I. J., Li J. 1996. Carrier-mediated transport and efflux mechanisms in Caco-2 cells. *Advance Drug Delivery Review*, 22: 53-66
- Hilgers A. R., Conradi R. A., Burton P. S. 1990. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharmaceutical Research*, 7: 902-910
- Hubatsch I., Ragnarsson E. 2007. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption. Department of Pharmacy, Uppsala University, *Nature protocols*, 29: 2111-2119

Kataložni zapis. Corning Costar Transwell Permeable Supports, 12-Cluster Plate/0.4um48/Cs/SPESd.o.o.

http://www.coleparmer.com/Product/Corning_Costar_Transwell_Permeable_Supports_12_Cluster_Plate_0_4um_48_Cs/EW-19480-03, (20. jun. 2014)

Kessel, R., Kardon R. 1979. Tissues and Organs: A Text - Atlas of Scanning Electron Microscopy. New York,: W.H. Freeman and Company: 317 str.

Kim Y. S., Milner J. A. 2010. Bioactive Food Components and Cancer Specific Metabonomic Profiler. Journal Biomedicine and Biotechnology: 9 str.

Liang-Shang L., Gan, Dhiren R., Thakker. 1997. Applications of the Caco-2 model in the design and development of orally active drugs: elucidation of biochemical and physical barriers posed by the intestinal epithelium. Division of Pharmaceutics, School of Pharmacy, University of North Carolina Chapel Hill, USA, Advanced Drug Delivery, 23: 77-98

Lutar M. 2009. Priprava vzorcev halofilnih nitastih gliv za vrstično elektronsko mikroskopijo. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za mikrobiologijo: 38 str.

Ming Hu, Jie Ling, Huimin Lin, Jun Chen., Yan Z., Caldwell G. W. 2004. Use of Caco-2 Cell Monolayers to Study Drug Absorption and Metabolism. Methods in Pharmacology and Toxicology. 2. izdaja, Yan, Zhengyin, Caldwell, Gary W. (eds.), Department of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Washington State University, Pullman, Optimization in Drug Discovery: In Vitro Methods: 19-35

Moog F. 1981. The Lining of the Small Intestine. Scientific American, 245: 154-176

- Mortensen A., Sorensen I. K., Wilde C., Drogani S., Mullerova D., Toussaint O., Zloch Z., Sgaragli G., Ovesna J. 2008. Biological models for phytochemical research: from cell to human organism. *The British Journal of Nutrition*, 99: 118-126
- Mueller-Klieser W. 1997. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*: 1109-1123
- Miura Y., Shiomi H., Sakai F., Yagasaki K. 1997. Assay systems for screening food components that have anti-proliferative and anti-invasive activity to rat ascites hepatoma cells: In vitro and ex vivo effects of green tea extract. *Cytotechnology*, 23: 127-132
- Pinto M., Robine-Leon S., Appay M. D. 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biology of the Cell*, 47: 323-330
- Randall D. J., 1983. Eckert: Animal physiology: mechanisms and adaptations. V: Integration of Physiological Systems, Acquiring Energy: Feeding, Digestion and Metabolism. 5. izdaja, David Randall, Warren Burggren, Kathleen French (ur.), New York, W. H. Freeman and Company, 631-666
- Rode J. 1991. Zgradba prebavil mokrice. Magistrska naloga. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 40 str.
- Romih R., Korošec P., Mello W., Jezernik K. 2005. Differentiation of epithelial cells in the urinary tract. *Cell Tissue Research*, 320: 259-268

- Sambuy Y., De Angelis I., Ranaldi G., Scarino M. L., Stamatii A., Zucco F. 2005. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology*, 21: 1-26
- Vachon P. H., Perreault N., Magny P., Beaulieu J. F. 1996. Uncoordinated, transient mosaic patterns of intestinal hydrolase expression in differentiating human enterocytes. *Journal Cell Physiology*, 166: 198-207
- Wanjg, J. H., Redmond H. P., Watson R. W. G., Duggan S., McCarthy J., Barry M., Bouchier-Hayes D. 1996. Mechanisms involved in the induction of human endothelial cell necrosis. *Cellular Immunology*, 168: 91-99
- Waterman R. 1980. Preparation of embryonic tissues for SEM. Preparation of biological specimens for scanning electron microscopy. *Scanning Electron Microscopy*, 2: 21-44
- Watson L.P., McKee A.E., Merrell B.R. 1980 Preparation of microbiological specimens for scanning electron microscopy, V: Preparation of biological specimens for scanning electron microscopy, Murphy J.A., Romans G. M., O` Hare (eds.), *Scanning electron microscopy II*, Chicago, USA, 45-56
- Wilson G., Hassan I. F., Dix C. J. 1990. Transport and permeability properties of human Caco-2 cells: An in vitro model of the intestinal epithelial cell barrier. *Journal Controlled Release*, 11: 25-40
- Wu X., R., Manabe M., Yu J., Sun T.-T. 1990. Large scale purification and immunolocalization of bovine uroplakins I, II and III. Molecular markers of urothelial differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 265: 19170-19179

ZAHVALA

Rada bi se zahvalila svojemu mentorju, prof. dr. Kazimirju Drašlarju in somentorju, dr. Simonu Casermanu, za vso pomoč pri izdelavi naloge in čas, ki sta mi ga je posvetila, za strokovno svetovanje, potrpežljivost in spodbudo pri nastajanju diplomskega dela.

Hvala prof. dr. Roku Kostanjšku, doc. dr. Nadi Žnidaršič in Idi Djurdjevič za vse popravke in nasvete ter Suzani Logar in Maji Marušič za vso pomoč pri praktičnemu delu diplomske naloge.

Zahvalila bi se rada tudi svoji družini (očetu, mami in bratu Andreju), ki mi je z ljubeznijo in potrpljenjem stala ob strani v vseh lepih in slabih trenutkih.

Hvala tudi tebi, Matej, ki me sprejemaš tako, kot sem. V vseh mojih vzponih in padcih si verjel vame, me optimistično spodbujal ter mi nesebično pomagal.

Hvala tudi vsem ostalim, ki ste mi vsa ta leta kakorkoli stali ob strani.

PRILOGE

Preparate smo pripravljali po dveh protokolih:

Enostopenjska fiksacija z aldehidi

Dvostopenjska fiksacija z aldehidi in osmijem

REAGENTI

PBS:

- pH 7,2
- 0,9 NaCl

KAKODILATNI PUFER:

- 0,4 M, pH 7,2 (osnovna raztopina)
- 4,28 g Na kakodilata raztopi v 25 ml Aq. dest.
- pH naravnaj na 7,2 z 0,2 M HCl
- dopolni do 50 ml

FIKSATIV »NAŠ«:

- pH 7,2
- 1 % glutaralhid, 0,5 % formaldehid, 0,1 M kakodilatni pufer

Priprava:

- 0,4 ml GA (25 %) + (EM grade)
- 0,2 ml Fo (25 %)
- 2,5 ml 0,4 Kako pufra pH 7,2
- Dopolni z Aq. dest. Do 10 ml
- Za vsako fiksacijo se uporabi svež fiksans

PROTOKOL 1-ENOSTOPENJSKA FIKSACIJA Z ALDEHIDI

- Izbor, odvzem in priprava vzorca
- Spiranje vzorca z izotonično solno raztopino (PBS, pH 7,2)
 - Odstranitev gojišča: 2 x 1 min
- Spiranje vzorca s kakodilatnim pufrom (0,1 M, pH 7,2)
 - Odstranitev gojišča in fostatov 1 min
- Fiksacija z glutaraldehidi in formaldehidi 45 min
- Spiranje s Kako pufrom (0,1 M, pH 7,2) 3 x 3 min
- Dehidracija z etanolom:

50 %	3 min
70 %	3 min
80 %	3 min
90 %	3 min
100 %	3 min
- Prevajanje z EtOH/CO₂ (CPA): 3 x 10 min
- Sušenje: CO₂/CPD (CPA)

PROTOKOL 2- DVOSTOPENJSKA FIKSACIJA Z ALDEHIDI IN OZMIJEM

- Izbor, odvzem in priprava vzorca.
- Spiranje vzorca z izotonično solno raztopino (PBS, pH 7,2)
- Spiranje vzorca s kakodilatnim pufrom (0,1 M, pH 7,2)
- Fiksacija 1: glutaraldehidi in formaldehidi 45 min
- Spiranje Kako pufra (0,1 M, pH 7,2) 5 x 3 min
- Fiksacija 2: OsO₄ 1 % v 0,1 M kako pufer v temi, 5 °C, 30 min
- Spiranje Kako pufer 0,1 M, 5 x 3 min
- Spiranje z destilirano vodo, 1 x 3 min
- Dehidracija z etanolom
 - 50 % 3 min
 - 70 % 3 min
 - 80 % 3 min
 - 90 % 3 min
 - 100 % 3 x 3 min
- Prevajanje EtOH/CO₂ (CPA) 3 x 10 min
- Sušenje CO₂/CPD (CPA)

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
Oddelek za biologijo

Erika RUS

**RAZVOJ METODE ZA VREDNOTENJE
DIFERENCIACIJE CELIC Caco – 2 NA MODELU
ČREVESNEGA EPITELIJA Z VRSTIČNIM
ELEKTRONSKIM MIKROSKOPOM**

Diplomsko delo

Ljubljana, 2014