

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Anja MAVRIČ

**VPLIV SERUMSKEGA HOLESTEROLA (LDL) NA ZARAŠČANJE
EPITELIJSKE POŠKODBE *IN VITRO***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE EFFECT OF SERUM CHOLESTEROL (LDL) ON
REGENERATION OF MECHANICAL INJURY OF EPITHELIUM IN
*VITRO***

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Inštitutu za biologijo celice na Medicinski fakulteti Univerze v Ljubljani, kjer je bila narejena večina laboratorijskih poskusov. Biokemijski del poskusov je bil opravljen na Inštitutu za biokemijo na Medicinski fakulteti Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo na Biotehniški fakulteti je za mentorja diplomskega dela imenovala izr. prof. dr. Petra Veraniča z Inštituta za biologijo celice.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Kristina SEPČIĆ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Jasna ŠTRUS

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: izr. prof. dr. Peter VERANIČ

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice

Datum zagovora: 23.4.2010

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Anja Mavrič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK 576.33:612.014(043.2)=163.3
KG epitelijske celice/celične kulture/lipoproteini/zaraščanje poškodbe *in vitro*
AV MAVRIČ, Anja
SA VERANIČ, Peter
KZ SI – 1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2010
IN VPLIV SERUMSKEGA HOLESTEROLA (LDL) NA ZARAŠČANJE
EPITELIJSKE POŠKODBE *IN VITRO*
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP XII, 73 str., 16 pregl., 39 sl., 78 vir.
IJ sl
JI sl / an
AI Med obnovo poškodovanega epitelija se poveča sinteza membran in s tem potreba po holesterolu, ki je ključna sestavina celičnih membran živalskih celic. Zaraščanje poškodovanega epitelija je kompleksen proces, ki vključuje delitev celic, celično gibanje in oblikovanje medceličnih stikov. Naš namen je bil ugotoviti vpliv serumskega holesterola na hitrost obnove poškodovanega epitelija na *in vitro* modelu. Zanimala nas je obnova epitelija po mehanski poškodbi epitelijev z različno sposobnostjo sprejemanja holesterola z endocitozo lipoproteinskih delcev majhne gostote (LDL). Kot model za proučevanje smo uporabili trajne celične linije treh različnih epitelijev: MDC2 kulturo, izolirano iz celic epitelija ledvičnih tubulov, za katere je značilna intenzivna endocitotska aktivnost, RT4 kulturo, izolirano iz urotelija, kjer imajo celice majhno sposobnost endocitoze in HaCaT kulturo, celic kožnih keratinocitov, za katere je značilno manjše izražanje receptorjev za LDL in s tem zmanjšana odvisnost od zunanjega holesterola. V poizkusih smo uporabili: a) medij LP, obogaten z lipoproteinskimi delci, b) medij LPPS z odvzetimi lipoproteinskimi delci, c) kontrolni medij, ki je vseboval 10% telečji serum. Ugotovili smo, da je v mediju LP pri MDC2 celicah statistično značilna razlika v preraščanju postrgane površine. V celični kulturi RT4 je bila v enakih pogojih pospešitev preraščanja postrgane površine na meji statistične značilnosti. Na hitrost preraščanja postrgane proge v kulturi človeških kožnih

keratinocitov (HaCaT) povišana koncentracija holesterola v mediju ni vplivala. V mediju LP se je na področju postrgane proge število MDC2 celic na površino statistično značilno zmanjšalo, torej se je povečala površina celic. Podobno, vendar v manjšem obsegu, so reagirale celice RT4, na površino HaCaT celic pa koncentracija holesterola v mediju LP ni vplivala. Znižana koncentracija holesterola v mediju je statistično značilno zmanjšala hitrost preraščanja postrgane površine in upočasnila delitev celic le pri MDC2 celični kulturi. Na vsebnost holesterola v celicah in trdnost medceličnih stikov koncentracija zunajceličnega holesterola ni vplivala. Naši rezultati dokazujejo, da serumski holesterol pospeši hitrost regeneracije epitelijev v odvisnosti od sposobnosti sprejemanja holesterola.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 576.33:612.014(043.2)=163.3
CX epithelial cells/cell cultures/lipoproteins/regeneration after acute injury *in vitro*
AU MAVRIČ, Anja
AA VERANIČ, Peter
PP SI – 1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology
PY 2010
TI THE EFFECT OF SERUM CHOLESTEROL ON REGENERATION OF
MECHANICAL INJURY OF EPITHELIUM *IN VITRO*
DT Graduation Thesis (University of studies)
NO XII, 73 p., 16 tab., 39 fig., 78 ref.
LA sl
AL sl / en
AB During regeneration of the damaged epithelium the synthesis of new membranes increases the need for cholesterol, which is a key component of cell membranes in animal cells. Regeneration of damaged epithelium is a complex process involving cell division, cell movement and formation of new cell junctions. Our aim was to determine the influence of serum cholesterol on the speed of reconstruction of damaged epithelium in *in vitro* model. We aimed to study the regeneration of epithelium after mechanical injury on the epithelium with a different ability of taking up low-density lipoprotein particles (LDL) by receptor mediated endocytosis. As a model for the study, we used cell lines of three different types of epithelia: MDC2 culture, isolated from renal tubular epithelial cells, known for intense activity of endocytosis, RT4 culture, isolated from urothelium, where a low capacity of endocytosis takes place and HaCaT culture of skin cells keratinocytes, which are characterized by lower expression of LDL receptors and independency of external cholesterol. In experiments were used: a) medium LP enriched with lipoprotein particles, b) the media with eliminated lipoprotein particles and c) control medium containing 10% calf serum. MDC2 cells in medium LP statistically significant accelerate the speed of overgrowing damaged area in comparison to normal culture condition. In the RT4 cells the overgrowth of the damaged area under the same conditions was statistically significant. In cultured human skin keratinocytes (HaCaT) elevated cholesterol levels in the medium had no effect on

the speed of the scrubbed area. In the medium LP, the number of MDC2 cells per μm^2 decreased significantly, indicating for the enlargement of the cell surface. A similar but less distinctive change was found for RT4 cells, while for HaCaT cells no such morphological change was detected. The reduced concentration of cholesterol in the medium caused statistically significant decrease in overgrowing of the damaged area only in MDC2 cells, where it slowed down also the cell divisions. Alterations of the concentrations of cholesterol in cell culture media had no significant influence on the cell content of choloesterol. Our results demonstrate that serum cholesterol accelerate regeneration of damaged epithelium depending on its ability of cholesterol uptake.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	V
KAZALO VSEBINE	VII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 STRUKTURA IN TIPI EPITELIJEV	3
2.1.1 Razvrščanje epitelijev glede na funkcijo	3
2.1.2 Celične kulture kot <i>in vitro</i> modeli epitelija	4
2.1.2.1 Preiskovani tipi epitelijev in njihovi <i>in vitro</i> modeli	5
2.2 REGENERACIJA POŠKODOVANEGA EPITELIJA	10
2.2.1 Delitev celic	11
2.2.2 Celično gibanje	12
2.2.3 Oblikovanje dezmosomov	13
2.3 ZGRADBA IN POVEZOVANJE EPITELIJSKIH CELIC	14
2.3.1 Medcelične povezave in stiki	14
2.3.2 Zgradba citoskeleta	16
2.3.2.1 Aktinski filamenti	16
2.3.2.2 Mikrotubuli	17
2.3.2.3 Intermediarni filamenti	17
2.3.3 Sestava membrane	18
2.3.3.1 Razporeditev holesterola v membranah	20
2.4 KAKO CELICA DOBI HOLESTEROL	22
2.4.1 Biosinteza holesterola <i>de novo</i>	22
2.4.2 Lipoproteinski delci	23
2.4.2.1 Transport lipidov po telesu	24
2.4.2.2 Receptorsko posredovana endocitoza LDL partiklov	25
2.4.3 Regulacija vsebnosti holesterola v celicah	27
2.4.4 Hipoholesterolemija in hiperholesterolemija	29
3 MATERIALI IN METODE	31
3.1 GOJENJE CELIČNIH KULTUR <i>IN VITRO</i>	31
3.1.1 Mediji	31
3.2 PRESAJANJE CELIČNIH KULTUR	32

3.2.1 Štetje celic s hemocitometrom in presajanje na petrijevke	32
3.2.2 Preraščanje poškodbe <i>in vitro</i>	33
3.2.3 Delitev celic	34
3.3 IMUNOFLUORESCENČNO OZNAČEVANJE	34
3.3.1 Označevanje aktina	34
3.3.2 Štetje celic na površinsko enoto	35
3.4 ANALIZA VSEBNOSTI HOLESTEROLA	35
3.4.1 Priprava celic	35
3.4.2 Določanje proteinov	35
3.4.3 Izolacija lipidov in določanje holesterola	36
3.5 DISPAZNI LOČITVENI TEST	36
4 REZULTATI	37
4.1 PRERAŠČANJE POŠKODBE <i>IN VITRO</i>	37
4.2 DELITEV CELIC	40
4.3 ŠTEVILLO CELIC NA POVRŠINSKO ENOTO	43
4.4 DISPAZNI TEST	47
4.5 VSEBNOST HOLESTEROLA	49
4.6 MORFOLOGIJA CELIC	53
4.6.1 Razporeditev aktina	53
4.6.2 Razporeditev dezmkolina	58
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	60
5.1 RAZPRAVA	60
5.2 SKLEPI	64
6 POVZETEK	65
7 VIRI	67
7.1 ELEKTRONSKI VIRI	73

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razdelitev lipoproteinskih delcev glede na gostoto (5)	23
Preglednica 2: Stopnje statistične značilnosti razlik preraščanja postrgane površine za MDC2 celično kulturo.....	38
Preglednica 3: Stopnje statistične značilnosti razlik preraščanja postrgane površine za RT4 celično kulturo.....	39
Preglednica 4: Stopnje statistične značilnosti razlik preraščanja postrgane površine za HaCaT celično kulturo.....	40
Preglednica 5: Stopnje statistične značilnosti sprememb števila celic MDC2 celične kulture po 24 in 48 urah tretiranja s kontrolnim medijem in LPPS.....	41
Preglednica 6: Stopnje statistične značilnosti sprememb števila celic RT4 celične kulture po 24 in 48 urah tretiranja s kontrolnim medijem in LPPS.....	42
Preglednica 7: Stopnje statistične značilnosti sprememb števila celic HaCaT celične kulture po 24 in 48 urah tretiranja s kontrolnim medijem in LPPS.....	43
Preglednica 8: Stopnje statistične značilnosti sprememb števila celic na določeno površino MDC2 celične kulture.	44
Preglednica 9: Stopnje statistične značilnosti sprememb števila celic na določeno površino RT4 celične kulture.	45
Preglednica 10: Stopnje statistične značilnosti sprememb števila celic na določeno površino HaCaT celične kulture.	46
Preglednica 11: Stopnje statistične značilnosti sprememb števila posamičnih celic pri MDC2 celični kulturi.	47
Preglednica 12: Stopnje statistične značilnosti sprememb števila posamičnih celic pri RT4 celični kulturi.	48
Preglednica 13: Stopnje statistične značilnosti sprememb števila posamičnih celic pri HaCaT celični kulturi.	49
Preglednica 14: Stopnje statistične značilnosti sprememb vsebnosti holesterola pri MDC2 celični kulturi.	50
Preglednica 15: Stopnje statistične značilnosti sprememb vsebnosti holesterola pri RT4 celični kulturi.	51
Preglednica 16: Stopnje statistične značilnosti sprememb vsebnosti holesterola pri HaCaT celični kulturi.	52

KAZALO SLIK

Slika 1: MDC2 celična linija.	6
Slika 2: RT4 celična linija.	8
Slika 3: HaCaT celična linija.	9
Slika 4: Spremembe v aktinskem citoskeletu, ki jih sprožijo različne signalne molekule (Lodish in sod., 2008).	13
Slika 5: Komponente citoskeleta (Lodish in sod., 2008).	18
Slika 6: Shematični prikaz celične membrane z dvojno fofolipidno membrano (1).	19
Slika 7: Struktorna formula holesterola.	20
Slika 8: Presnova lipidov (Voet & Voet, 1995).	25
Slika 9: Lipoproteinski delec nizke gostote – LDL (2).	26
Slika 10: Receptorsko posredovana endocitoza LDL partiklov (3).	27
Slika 11: Plastične posode za gojenje celičnih kultur (4).	33
Slika 12: Postrgana površina v RT4 celični kulturi, gojeni na petrijevki z mrežo.	34
Slika 13: Odstotek preraščenosti postrgane površine MDC2 celične kulture za LPPS in LP tretma glede na kontrolni tretma. Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.	38
Slika 14: Odstotek preraščenosti postrgane površine RT4 celične kulture za LPPS in LP tretma glede na kontrolni tretma. Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.	39
Slika 15: Odstotek preraščenosti postrgane površine HaCaT celične kulture za LPPS in LP tretma glede na kontrolni tretma. Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.	40
Slika 16: Število celic MDC2 celične kulture po 24 in 48 urah tretiranja s kontrolnim medijem in medijem LPPS. Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.	41
Slika 17: Število celic RT4 celične kulture po 24 in 48 urah tretiranja s kontrolnim medijem in medijem LPPS. Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.	42
Slika 18: Število celic HaCaT celične kulture po 24 in 48 urah tretiranja s kontrolnim medijem in medijem z LPPS. Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.	43
Slika 19: Števila celic na določeno površino MDC2 celične kulture za K, LPPS in LP. Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.	44
Slika 20: Število celic na določeno površino RT4 celične kulture za K, LPPS in LP. Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.	45

Slika 21: Število celic na določeno površino HaCaT celične kulture za K, LPPS in LP tretmajih. Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.	46
Slika 22: Odstotek posameznih celic MDC2 celične kulture pri LPPS in LP glede na kontrolni tretma. Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.	47
Slika 23: Odstotek posameznih celic RT4 celične kulture pri LPPS in LP glede na kontrolni tretma. Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.	48
Slika 24: Odstotek posameznih celic HaCaT celične kulture pri LPPS in LDL glede na kontrolni tretma. Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.	49
Slika 25: Vsebnost holesterola v posameznih tretmajih za MDC2 celično kulturo. Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.	50
Slika 26: Vsebnost holesterola v posameznih tretmajih za RT4 celično kulturo. Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.	51
Slika 27: Vsebnost holesterola v posameznih tretmajih za HaCaT celično kulturo. Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.	52
Slika 28: Razporeditev aktina pri MDC2 celicah, tretiranih s kontrolnim medijem.	53
Slika 29: Razporeditev aktina pri MDC2 celicah, tretiranih z LPPS.	54
Slika 30: Razporeditev aktina pri MDC2 celicah, tretiranih z LP.	54
Slika 31: Razporeditev aktina pri RT4 celicah, tretiranih s kontrolnim medijem.	55
Slika 32: Razporeditev aktina pri RT4 celicah, tretiranih z LPPS.	55
Slika 33: Razporeditev aktina pri RT4 celicah, tretiranih z LP.	56
Slika 34: Razporeditev aktina pri HaCaT celicah, tretiranih s kontrolnim medijem.	56
Slika 35: Razporeditev aktina pri HaCaT celicah, tretiranih z LPPS.	57
Slika 36: Razporeditev aktina pri HaCaT celicah, tretiranih z LP.	57
Slika 37: Razporeditev dezmkolina pri MDC2 celicah, tretiranih s kontrolnim medijem.	58
Slika 38: Razporeditev dezmkolina pri MDC2 celicah, tretiranih z LPPS.	59
Slika 39: Razporeditev dezmkolina pri MDC2 celicah, tretiranih z LP.	59

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Acetil-CoA	acetilkoenicim A
A-DMEM	Advance-Dulbecco's modification of Eagle's medium, hranični medij
Apo	apolipoprotein
CK	citokeratini
DAPI	4, 6-diamin-2-fenilindol dihidroklorid
Dsc	dezmkolin
ER	endoplazemski retikulum
GA	Golgijev aparat
HDL	lipoprotein visoke gostote
HMG-CoA	3-hidroksi-3metilglutaril-CoA
HMGR	HMG-CoA reduktaza
IDL	intermediate density lipoprotein (lipoprotein srednje gostote)
K	kontrolni medij
KBr	kalijev bromid
LDL	Low density lipoprotein, lipoprotein nizke gostote
LP	medij s trikratno koncentracijo holesterola (dodani HDL/LDL partikli)
LPPS	brezholesterolni medij
PBS	fosfatni pufer s soljo
SRE	sterol regulatory element
SREBP	sterol regulatory element binding protein
SCAP	SREBP cleavage activating protein
SSD	sterol sensing domain
TAG	trigliceridi
VLDL	very low-density lipoprotein, lipoprotein zelo nizke gostote
YFP	yellow fluorescent protein, rumeni fluorescirajoči protein

1 UVOD

Zaraščanje mehanske poškodbe epitelija je kompleksen proces, ki vključuje delitev celic, celično gibanje in oblikovanje novih medceličnih stikov. Novejše študije kažejo, da je pri teh procesih pomemben regulator holesterol, ki je ena od glavnih sestavin plazmaleme. Zato ga celice ob delitvah potrebujejo v večjih količinah za izgradnjo novih membran. Ugotovljeno je bilo tudi, da so proteini medceličnih stikov, kot so tesni in adherentni stiki, v predelih membrane, obogatenih s holesterolom. Odvzem holesterola pomembno vpliva na funkcionalnost teh stikov.

V večini študij, kjer proučujejo vpliv holesterola na celice, ga dodajajo ali odvzemajo s pomočjo kemijskih prenašalcev, kot je npr. ciklodekstrin (Corvera in sod., 2000; Sun in sod., 2007). Malo pa je znanega, kako deluje na regeneracijo poškodovanih epitelijev holesterol, dodan s serumskimi prenašalcji.

Holesterol se prenaša po plazmi v obliki holesterolnih estrov, ki so vezani z lipoproteini in tvorijo lipoproteinske delce (hilomikroni, VLDL, IDL, LDL, HDL) (Goli in sod., 2002). Za LDL delce je bilo ugotovljeno, da stimulirajo raztezanje fibroblastov in tvorbo lamelipodijev, kar pospeši zaraščanje rane. Pospeši se tudi nastajanje interlevkina-8, ki je citokin in pospeši delitev celic (Dobreva in sod., 2005). Podatkov, kako vplivajo LDL delci na regeneracijo epitelijskih celic, v literaturi nismo našli.

Kot model za proučevanje regeneracije mehansko povzročene poškodbe epitelija *in vitro* smo izbrali tri različne celične linije:

- **MDC2** celice so izolirane iz distalnega tubula pasjih ledvic (MDCK) s stabilno vgrajenim genom za dezmkolin II in YFP (rumeni protein). Imajo dobro izražene dezmosome in tvorijo monosloj, ki je polariziran (Li C. in sod., 1990).
- **RT4** celice so izolirane iz papiloma sečnega mehurja človeka. Urotelij ima pomembno funkcijo krvno-urinske bariere. V primerjavi z MDC2 celicami imajo urotelijske celice 5-15x manjšo sposobnost endocitoze (Kreft M.E. in sod., 2008).

- **HaCaT** so kožne celice odraslega človeka (keratinociti), za katere je značilna intenzivna sinteza lipidov (Rook A. in sod., 2004), manjše izražanje LDL receptorjev (Williams in sod., 1987) in so zato dokaj neodvisne od serumskega holesterola.

Naš namen je bil ugotoviti vpliv serumskega holesterola na hitrost obnove poškodovanih epitelijev na modelu *in vitro*. Zanimal nas je odziv epitelijev z različno sposobnostjo sprejemanja serumskega holesterola na mehansko poškodbo ob pomanjkanju ali pri povišani koncentraciji serumskega holesterola.

Opazovali smo vpliv medija z brezholesterolnim serumom (LPPS) in medija s trikratno koncentracijo holesterola (dodani lipoproteinski delci - LP) v primerjavi s kontrolnim medijem z 10% telečim fetalnim serumom (enkratna koncentracija holesterola) pri treh izbranih tipih celičnih kultur na:

- hitrost zaraščanja epitelijske poškodbe *in vitro*,
- delitev celic,
- vsebnost holesterola v celicah,
- trdnost medceličnih stikov,
- razporeditev aktina, ki je ključen za gibanje celic in
- razporeditev dezmosomskega proteina dezmosikolina, ki sodeluje pri vzpostavljanju medceličnih povezav.

Postavili smo naslednje hipoteze:

1. Povečana koncentracija serumskega holesterola pospeši regeneracijo poškodovanega epitelija *in vitro*.
2. Zmanjšana koncentracija serumskega holesterola upočasni regeneracijo poškodovanega epitelija *in vitro*.
3. Hitrost regeneracije je sorazmerna s sposobnostjo celic za sprejem serumskega holesterola z endocitozo LDL delcev.

2 PREGLED OBJAV

2.1 STRUKTURA IN TIPI EPITELIJEV

Posamezne celice se med razvojem diferencirajo in organizirajo v tkiva, kjer opravlja specifično funkcijo. Epitelij sestavlja celice, ki se povezujejo v sloje in prekrivajo zunanje in notranje površine organizma. Ker je epitelijsko tkivo pogosto izpostavljeno mehanskemu stresu, imajo celice v citoplazmi dobro izražene intermediarne filamente in trdne medcelične stike. Apikalna površina celic je drugače diferencirana kot bazolateralna. Celice so polarizirane v apikalno bazalni smeri. Med celicami je malo medceličnine. Del medceličnine je bazalna lamina, ki povezuje epitelij z vezivnim tkivom. Komponente bazalne lamele sodelujejo pri kontroli delitev, gibanju in diferenciaciji epitelijskih celic. Epitelijske celice se povezujejo med seboj z adhezijskimi beljakovinami kadherini in CAM glikoproteini, z medceličnino pa z integrini. Epitelijsko tkivo ni ožiljeno, zato hranilne snovi in kisik vstopajo skozi bazalno lamino. Skozi bazalno lamino prodirajo tudi živčni končiči senzoričnih živcev (Alberts, 1994; Troyanovsky, 1994).

2.1.1 Razvrščanje epitelijev glede na funkcijo

Funkcije epitelijev so: sekrecija, selektivna absorpcija, zaščita, medcelični transport in sprejemanje dražljajev (Alcamo in Krumhardt, 2004; Eroschenko in di Fiore, 2008; Rosdahl in Kowalski, 2007).

Glede na funkcijo uvrščamo epitelije med:

- absorpcijske (epitelijske celice prebavil, pljučne alveole, žilni endotel, ledvični tubuli)
Raztopljene snovi, metabolni produkti in plini se lahko pasivno absorbirajo ali aktivno prehajajo skozi epitelij.
- krovne (epidermis, epitelij sečnega mehurja in sečevoda)
Epitelji so specializirani za zaščito notranjega okolja in preprečujejo izmenjavo snovi z okoljem.

- čutilne (paličnice in čepnice v mrežnici, olfaktorni receptorji v nosu, okušalni receptorji)
Zaznavajo dražljaje iz okolja.
- žlezne (endokrine in eksokrine žleze)
Izločajo snovi v kri ali v lumen žleze.

2.1.2 Celične kulture kot *in vitro* modeli epitelija

Tehnika gojenja celičnih kultur ima veliko prednosti pred poskusni na živalih. Celične kulture nam omogočajo vzdrževanje določenega tipa celic izven telesa, nadzorovanje fizikalno-kemijskega okolja in fizioloških pogojev. Žive celice lahko tako vzdržujemo dolgoročno in jih opazujemo z mikroskopom. Ker so celice gojene v razmerah, ki spodbujajo proliferacijo in ne diferenciacije, se lahko s številom pasaž spremeni fenotip gojenih celic *in vitro*. Posledično imajo celice, gojene *in vitro*, spremenjene morfološke, biokemijske in funkcijeske lastnosti (Shaw, 1996).

Celične kulture se uporabljajo v celični biologiji, biokemiji, genetskem inženiringu, diagnostičnih laboratorijih, za produkcijo proteinov in produktov, ki so pomembni pri zdravljenju raka, dednih nepravilnostih, virusnih infekcijah in mnogih kroničnih boleznih (Fields in sod., 2007; Ozturk in sod., 2006).

Celične kulture delimo na primarne, sekundarne in trajne glede na izvor, sposobnost ohranjanja prvotnih lastnosti in omejenosti števila delitev.

Primarne kulture so pripravljene neposredno iz tkiva organizma in so zato navadno heterogene (iz več tipov celic) z ohranjenimi prvotnimi lastnostmi. Dobimo jih s pravilnim odvzemom želenega tkiva, uporabo primernih disociacijskih tehnik ter z ustreznimi pogoji gojenja (Kreft in sod., 2005). Primarne celične kulture se uporabljajo v raziskavah, kjer je pomembno, da celice obdržijo prvotne lastnosti.

Sekundarno kulturo dobimo ob prvi uspešni presaditvi primarne kulture. Običajno je populacija celic v sekundarnih kulturah homogena. V prvih pasažah celice ohranjajo

tkivno-specifične lastnosti, v višjih pasažah pa jih spreminjajo ali izgubljajo (Southgate in sod. 1994; Guhe in Föllmann, 1994).

Večina celic odmre po v genomu določenem številu delitev, npr. človeške kožne celice se delijo v kulturi 50-100x preden odmrejo. Nekatere celice v kulturi so podvržene genetskim spremembam. Takšne celice lahko dobijo visoko proliferacijsko aktivnost, neomejeno število delitev in jih lahko v *in vitro* pogojih vzdržujemo kot celične linije. Rast trajnih celičnih linij je manj odvisna od seruma in rastnih faktorjev, zato jih je v *in vitro* pogojih razmeroma lahko gojiti (Alberts, 1994; Masters in sod., 1986).

Celične linije so lahko pripravljene iz rakastih celic. Podobne lastnosti dosežemo pri normalnih celicah s transformacijo s tumor inducirajočim virusom ali določenimi kemikalijami (Alberts, 1994).

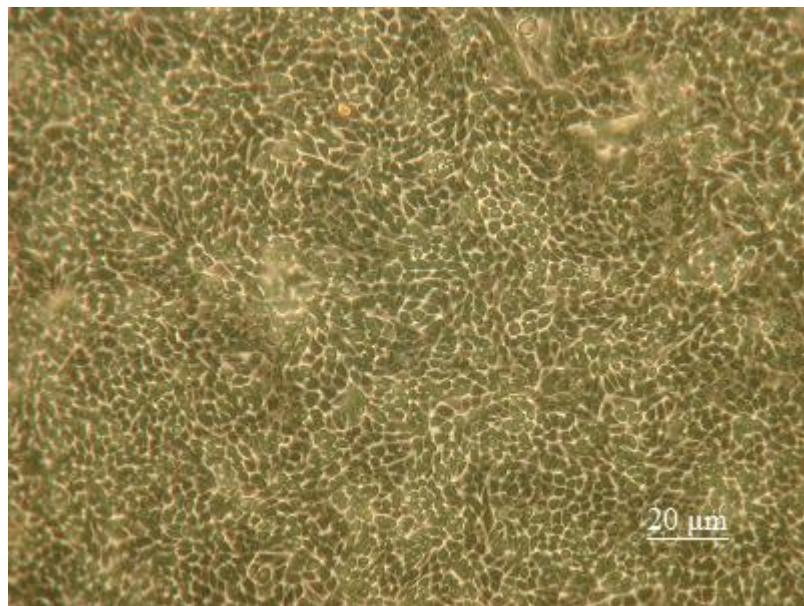
2.1.2.1 Preiskovani tipi epitelijev in njihovi *in vitro* modeli

➤ **Enoslojni kubični epitelij distalnih ledvičnih tubulov in MDCK celična linija**

Funkcije epitelija distalnih ledvičnih tubulov so izločanje in absorpcija. Na^+ ioni se reabsorbirajo iz urina in K^+ ioni se izločijo v urin. Reabsorpcaja bikarbonata poteka vzporedno z izločanjem vodikovih ionov v lumen (Henrikson in sod., 1996; Marieb in sod., 2007). Distalni tubul reabsorbira 7% filtriranega NaCl iz primarnega seča (Kierszenbaum, 2002).

MDCK (Madin-Darby canine kidney cell line) so v kulturi gojene celice, izolirane iz enoslojnega kubičnega epitelija distalnega dela tubulov pasjih ledvic (Shaw, 1996). Izražajo strukturno in funkcionalno polariziranost naravnega epitelija. Funkcionalna polariziranost se kaže s prenosom ionov, neelektrolitov ter s transzitozo, s katero se iz apikalne proti bazolateralni površini prenesejo proteini. Ta proces je v tubulih pomemben za prenos makromolekul iz lumna proti krvi. MDCK tvorijo močne medcelične stike. Monosloj ima diferencirano apikalno in bazolateralno površino. MDCK celice so odličen

in vitro model za študijo celične adhezije, ker tvorijo polariziran enoslojni epitelij z dobro izraženimi povezavami celica-celica in celica-podlaga (Behrens, 1985; Li in sod., 1990). MDC2 je MDCK celična kultura s transficiranim dezmosokolinom II z vezanim fluorescenčnim proteinom YFP.



Slika 1: MDC2 celična linija.

➤ Urotelij in RT4 celična linija

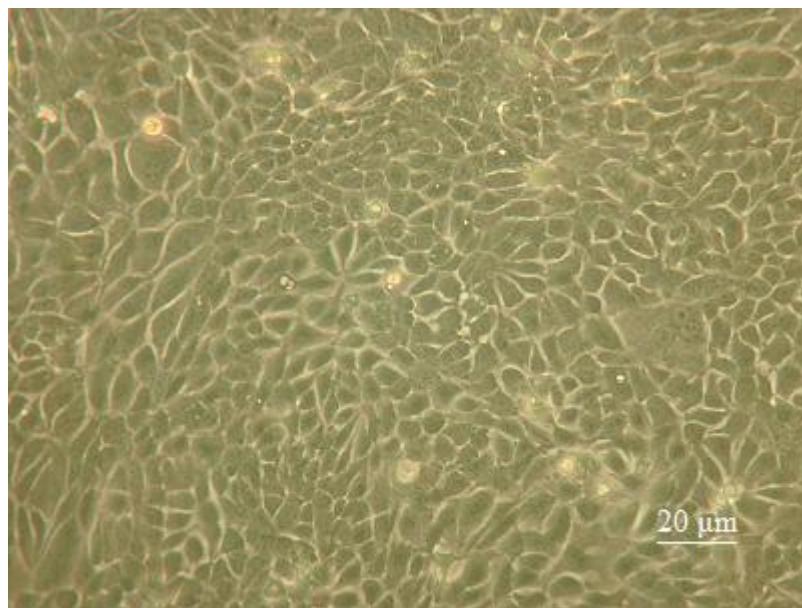
Urotelij je prehodni epitelij, ki pokriva ledvične čaše, sečevod, lumen sečnega mehurja in del sečnice. Ima pomembno funkcijo krvno-urinske bariere. Medcelične povezave omogočajo struktorno integriteto urotelija (adherentni stiki, dezmosomi in hemidezmosomi), regulirajo medcelično prepustnost (presledkovni stiki, tesni stiki), zagotavljajo polariziranost celic in plazmaleme ter so osnova za vzpostavitev in ohranjanje krvno-urinske pregrade urotelija (Hicks, 1975).

Epitelij sečnega mehurja je sestavljen iz treh plasti celic. Spodnjo plast tvorijo majhne, ploščate in nediferencirane celice, ki se s hemidezmosomi pritrjajo na bazalno lamino. Plast nad njimi tvorijo večje in bolj diferencirane celice, ki se med seboj povezujejo z dezmosomi in točkovnimi adherentnimi stiki. Zgornjo plast tvorijo dežnikaste celice, ki so v neposrednem stiku z urinom. Zgornje dežnikaste celice imajo visoko specializirano in

odebeljeno apikalno plazmalemo, ki predstavlja zaščito pred izgubo vode in ionov. Celice se povezujejo z dezmosomi in adherentnimi stiki, na meji med apikalno in lateralno plazmalemo pa so povezane z dobro razvitimi tesnimi stiki (Koss, 1969; Hicks, 1975; Candia in sod., 1997). V površinskih urotelijskih celicah mora biti izmenjava med toksičnim urinom in citoplazmo minimalna, saj bi povečana endocitotska aktivnost iz apikalne strani vodila v sprejemanje urina. Odebeljeno membrano gradijo večkotni plaki iz proteinov uroplakinov, ki so specifični za urotelij. Ločimo tri tipe uroplakinov. Uroplakin I in uroplakin II sta rahlo kisla in omejena na apikalno stran plazmaleme. Uroplakin III je rahlo bazičen in transmembranski ter verjetno pritrja plake na citoskelet (de Boer in sod., 1994; Wu in sod., 1990).

Manjsa endocitotska aktivnost visoko diferenciranih površinskih urotelijskih celic je lahko posledica prisotnosti uroplakinskih plakov, kajti domnevamo, da so ti preveliki ali pretogi in tako ovirajo apikalno endocitozo (Kreft in sod., 2008). Druga možnost je preurejanje citoskeleta v apikalni citoplazmi; znano je, da v visoko diferenciranih površinskih urotelijskih celicah v subapikalni citoplazmi aktinski filamenti niso prisotni (Romih in sod., 1999; Acharya in sod., 2004; Kreft in sod., 2005). Mikrotubuli in aktinski filamenti so namreč potrebni za učinkovito endocitozo v polariziranih epitelijskih celicah (Apodaca, 2001, Apodaca 1994), zato lahko njihova odsotnost prispeva k zmanjšani endocitozi v visoko diferenciranih površinskih urotelijskih celicah.

RT4 je trajna celična linija, izolirana iz papiloma sečnega mehurja človeka. Je dobro diferencirana in slabo invazivna celična linija. V kulturi izražajo epitelno morfologijo in tvorijo večlojni epitelij. Celice izražajo psevdostratifikacijo, ki je značilna za normalni prehodni epitelij. Zgornji medsloj in površinske celice so iz manjših neenakomerno oblikovanih celic. Imajo dobro izražene medcelične stike (dezmosome, adherentne in tesne stike). Na neinvazivnost celic kaže izražanje E-kadherina za razliko od kultur invazivnih urotelijskih celic, kjer se izraža N-kadherin. Celice RT4 rastejo relativno počasi v tesnih skupkih celic oz. otočkih (Mialhe in sod., 2000).



Slika 2: RT4 celična linija.

➤ Večslojni ploščati keratiniziran epitel in HaCaT celična linija

Koža ima številne funkcije: zaščita, senzorika, termoregulacija in produkcija prekurzorja vitamina D. Razdeljena je v dermis in epidermis. Epidermis kože je ploščati keratiniziran epitel, ki ga sestavlja pet slojev:

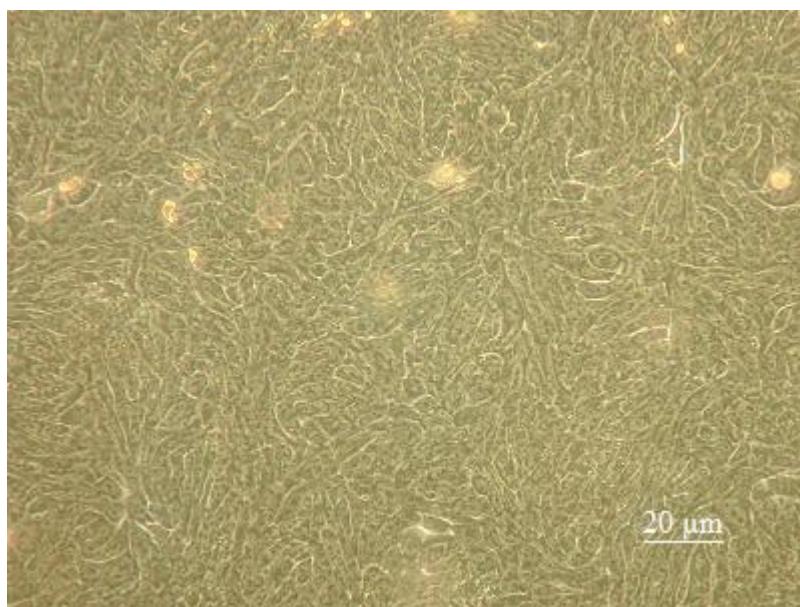
- stratum germinativum – sloj celic, ki se delijo in iz katerih nastanejo celice vseh slojev epidermisa,
- stratum spinosum – sloj iz približno petih plasti celic, katerih površina je videti izbočena v obliki trnov. Te izbokline so dezmosomi.
- stratum granulosum – sloj, kjer se akumulirajo granule, ki vsebujejo proteine, ki pospešijo agregacijo tonofilamentov in s tem povečajo količino keratina,
- stratum lucidum – mrtve celice, obogatene s keratinom,
- stratum corneum – mrtve ploščate brezjederne celice, obogatene s keratinom (Kerr J.B., 1999).

Koža je tkivo, ki aktivno sintetizira lipide (100 mg/dan). Med epidermalno diferenciacijo se dogajajo spremembe v sestavi membranskih lipidov. V slojih živih celic prevladujejo fosfolipidi, holesterol in trigliceridi. V zgornjih slojih, stratum spinosum in stratum granulosum, se lipidi sintetizirajo in pakirajo v membranske organele - lamelarne granule.

Te granule se zlijejo s plazmalemo in vsebina se razporedi po intercelularnem prostoru, kar služi kot zaščita pred izmenjavo vode z zunanjostjo telesa. Stratum corneum je obogaten s ceramidi, prostimi steroli in prostimi maščobnimi kislinami.

Za razliko od drugih tipov celic, ki dobivajo večino holesterola iz krvnega obtoka, privzemajo keratinociti zunanji holesterol v glavnem le v bazalni plasti keratinocitov. Med epidermalno diferenciacijo se zmanjša pojavljanje LDL receptorjev. Sinteza sterolov se v višjih plasteh poveča zato so relativno neodvisne od holesterola v krvnem obtoku (Rook A. in sod., 2004).

HaCaT celična linija so spontano *in vitro* transformirani keratinociti iz histološko normalne kože odraslega človeka in so sposobni ohraniti epidermalno diferenciacijo. Celice imajo transformiran fenotip in so netumorigene (Boukamp, 2008). Keratinociti predstavljajo celični tip z veliko lipidnimi rafti, ki so vključeni v kontrolo njihove proliferacije in metabolne aktivnosti (Bang in sod., 2005).



Slika 3: HaCaT celična linija.

2.2 REGENERACIJA POŠKODOVANEGA EPITELIJA

Obnova epitelija obsega delitve in gibanja celic, ki zapolnijo poškodovani prostor. Tema dvema procesoma sledi ponovna vzpostavitev celičnih stikov. Pri teh procesih je holesterol pomembna determinanta, ki omogoča izgradnjo membran novih celic epitelija in s tem zaraščanje poškodbe (Corvera in sod., 2000).

Spreminjanje količine holesterola deluje na celico celostno in ne samo preko membrane. Povezanost membrane in citoskeleta nadzoruje pomembne vitalne celične funkcije, kot so endocitoza, eksocitoza, iztezanje lamelipodijev ter gibanje celic (Sun in sod., 2007). V epiteliju potekajo za zaraščanje poškodb podobni mehanizmi, kot se pojavljajo med embrionalnim razvojem (Jacinto in sod., 2001).

Pri zaraščanju epitelijske poškodbe sta pomembna dva procesa: epitelno-mezenhimska transformacija in mezenhimsko-epitelna transformacija. Epitelno-mezenhimska transformacija (EMT) je proces spremembe fenotipa celice iz epitelijskega v mezenhimski. Med EMT potekajo v celici strukturne in funkcionalne spremembe. Epitelijske celice preidejo iz mirujočega stanja v gibanje in poveča se mitotska aktivnost. Med EMT pride do izgube epitelijske organizacije zaradi prerazporeditve in izgube stabilnosti stičnih proteinov epitelija. Celice tvorijo v tej fazi le prehodne stike s sosednjimi celicami in se lahko gibljejo skozi ekstracelularni matriks. Izguba epitelijske organizacije je lahko prehodna ali trajna.

Po vzpostavitvi medceličnih stikov sledi mezenhimsko-epitelna transformacija, med katero prehajajo celice iz mezenhimskega v epitelijski fenotip. Ta proces vključuje spremembo oblike celic in vzpostavitev medceličnih stikov, ki so značilni za epitelij (dezmosomov, adherentnih stikov, tesnih in presledkovnih stikov). Celice se ponovno uredijo v epitelij, značilen za določeno tkivo (Hay, 1995).

2.2.1 Delitev celic

Delitev celic je pomemben proces tako med embriogenezo in obdobjem rasti organizma in je pogoj za izoblikovanje tkiv, organov ter končne oblike in velikosti organizma, kot tudi pri nadomeščanju odmrlih in poškodovanih celic.

Celični cikel poteka v več fazah in v vsakem ciklu celica podvoji svojo DNA. Najdaljša faza je interfaza. Prvi del interfaze se imenuje G₁ faza. Za njo sledi S faza, kjer se podvoji DNA. Sledi G₂ faza. G₁ in G₂ faza sta pomembni za rast celic. Po končani G₂ fazi sledi mitotska faza (M faza), med katero se podvojeni kromosomi porazdelijo v ločena jedra. Materinska celica se deli v dve hčerinski celici v procesu, imenovanim citokineza (Alberts in sod., 1994).

Za normalno oblikovanje tkiva ozziroma za zaščito pred nastankom rakastih tvorb je potrebna učinkovita kontrola celične delitve. Zaporedje dogodkov celičnega cikla nadzoruje kontrolni sistem, ki ciklično sproži podvojitev DNA in ločevanje sestrskih kromatid proti nasprotnima poloma celice. Regulacija celičnega cikla poteka na prehodu G₁/S in G₂/M. V kontrolnem sistemu sodelujejo ciklini in ciklinske kinaze. Rastni faktorji regulirajo delitev celic skozi celovito omrežje medceličnih signalnih kaskad. Le-te regulirajo transkripcijo genov in aktivacijo kontrolnega sistema celičnega cikla. Mnogi proteini signalnih poti so bili odkriti pri študijah rakastih celic. Za rakaste celice je značilna visoka in nekontrolirana stopnja delitev, ki vodi v nastanek tumorjev in metastaz (Alberts in sod., 1994; Bos, 1989; Huang in Ingber, 1999).

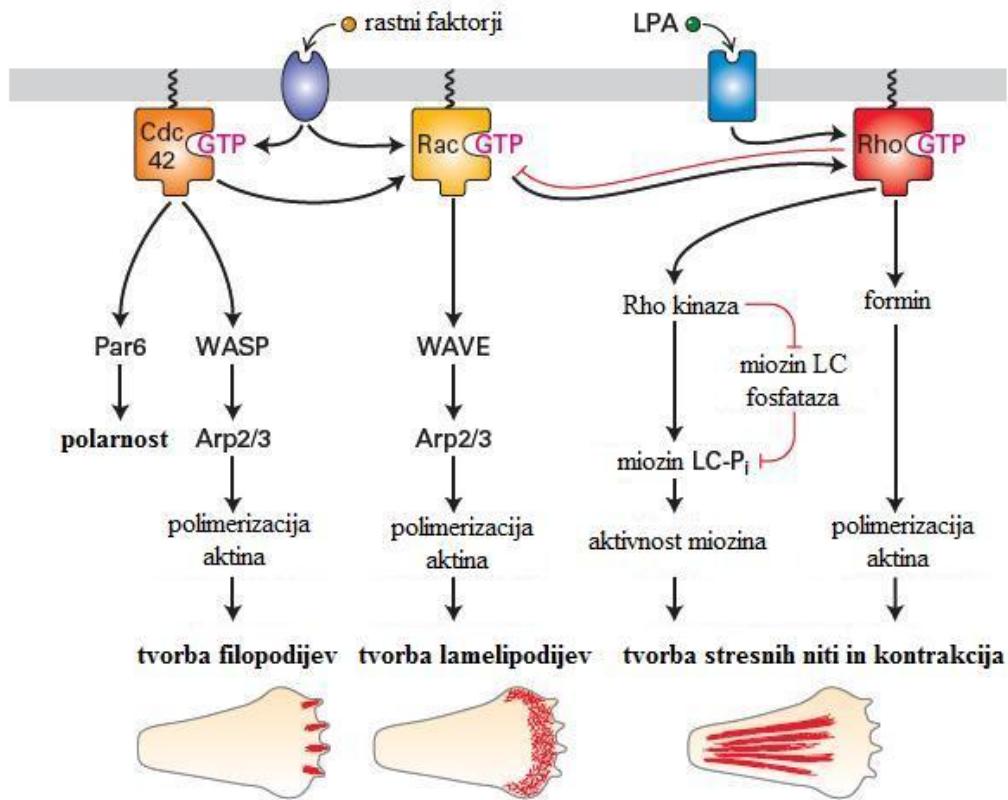
2.2.2 Celično gibanje

Pri gibanju celic in spremembi oblike celic igra pomembno vlogo polimerizacija aktina. Sestavljanje aktinskih filamentov na vodilnem koncu premikajoče se celice omogoča rast lamelipodijev in filopodijev ter določa smer gibanja celice (Carlier in Pantaloni, 1997).

Aktin v obliki korteksa obroblja negibljive celice, medtem ko je pri gibajočih se celicah aktinski kortex zelo stanjšan. Stresne niti so pri negibljivih celicah razporejene radialno v vse smeri, pri gibajočih se celicah pa se uredijo v smeri gibanja. Stresne niti se pritrjajo na fokalne stike na bazalni strani celice (Bray, 1992).

Pri zapiranju ranitve sodelujejo v povezavi z aktinskimi filamenti naslednji faktorji, ki sodijo v družino G proteinov: Ras, Rho in Cdc42. Ras sproži tvorbo lamelipodijev, Cdc 42 je odgovoren za polarnost in tvorbo filopodijev ter Rho, ki je odgovoren za oblikovanje stresnih niti in kontrakcijo (Jacinto in sod., 2001; Lodish in sod., 2008).

LDL delci neodvisno od funkcije vnosa holesterola vplivajo na gibanje celic in indukcijo celičnih delitev. LDL inducira aktivacijo poti p38 MAPK, ki povzroči raztezanje fibroblastov in oblikovanje lamelipodijev in s tem zapiranje/celjenje ranitev. Indukcija poti p38 MAPK z LDL je odvisna od celičnega tipa. Pri nekaterih tipih celic poveča delitev celic, pri drugih vpliva na gibanje zaradi izražanja E-selektina. Obstaja malo informacij, kako oz. s katerimi signalnimi molekulami LDL aktivira pot p38 MAPK. LDL preko SR-BI receptorja, neodvisno od klasičnega LDL receptorja, stimulira kinazi MKK3 in MKK6, ki sta odgovorni za direktno aktivacijo poti p38 MAPK. MAPK (p38) je posrednik delitev celic v celicah gladkih mišic žil, tvorbe lamelipodijev in raztezanja celic fibroblastov. Aktivacija MAPK v fibroblastih je pomembna pri vaskularnem remodeliranju. Kot glavni citokin, ki vzpodbuje proliferacijo celic tretiranih z LDL, je bil identificiran interlevkin-8 (Bulat in sod., 2009; Bulat in sod., 2008; Dobreva in sod., 2005).



Slika 4: Spremembe v aktinskem citoskeletu, ki jih sprožijo različne signalne molekule (Lodish in sod., 2008).

2.2.3 Oblikovanje dezmosomov

V epitelnih celicah sodezmosomi najstabilnejše povezovalne strukture. Skrbijo za vzdrževanje tkivne arhitekture (Farquhar in Palade, 1963). Poleg strukturne funkcije pa imajo pomembno vlogo tudi pri morfogenezi in diferenciaciji tkiv (Yin in Green, 2004).

Med interfazo MDCK celic ostajajo dezmosomi povezani in statični. Do manjših destabilizacij prihaja le med mitozo, ko difundirajo po plazmalemi. Prekinitev dezmosomov lahko sproži sprememba oblike celic ali pomanjkanje kalcija (Windoffer in sod. 2002).

V literaturi ni podatkov o vplivu holesterola na vzpostavljanje dezmosomov, znano pa je da znižan nivo holesterola v membranah prepreči oblikovanje novih tesnih stikov (Nusrat

in sod., 2000) in adherentnih stikov (Corvera in sod., 2000), ki so strukturno podobni dezmosomom.

2.3 ZGRADBA IN POVEZOVANJE EPITELIJSKIH CELIC

2.3.1 Medcelične povezave in stiki

Glavne naloge medceličnih povezav so: povezovanje celic, medcelična komunikacija in prepoznavanje celic med seboj.

Medcelične stike, ki omogočajo povezave med celicami in povezave celic z bazalno lamino, razvrščamo v tri skupine, glede na njihovo funkcijo:

a) TESNI STIKI

Sestavlajo jih transmembranski proteini in citosolni periferni proteini. Tesni stiki predstavljajo bariero, ki ima dve pomembni vlogi:

- preprečujejo paracelularni prehod molekul skozi lateralne prostore,
- delujejo kot pregrada za difuzijo membranskih proteinov in lipidov med apikalno in bazolateralno površino plazmaleme.

b) SIDRIŠČNI STIKI

Omogočajo pritrjanje celic med seboj in z bazalno lamino. Povezujejo citoskelet ene celice s citoskeletom druge celice ali z molekulami medceličnine. Največ jih je v tkivih, ki so izpostavljena večjim mehanskim stresom, kot npr.: srčna mišica, kožni epitelij.

- adherentni in fokalni stiki

Povezujejo mreže aktinskih filamentov med celicami ali z molekulami medceličnine.

Adherentni stiki so sestavljeni iz integralnih membranskih proteinov (E – kadherini), ki se preko kateninov (α in β) povezujejo z aktinskimi filamenti citoskeleta (Alberts, 1994).

Proteini adherentnih stikov so vključeni v pomembne funkcije epitelijskih celic, vključno z vzpostavljanjem kontakta med celicami, razvrščanjem drugih stičnih proteinov v specifična

področja plazmaleme in kontaktno inhibicijo, pri kateri se preneha rast in gibanje celic, ko se vzpostavijo tesni in adherentni stiki med sosednjimi celicami (Corvera in sod., 2000). Pri epitelijskih celicah se adherentni stiki nahajajo tik pod tesnimi stiki in jih mehansko utrdijo.

V fokalnih stikih se transmembranski proteini - integrini povezujejo z medceličnino. Citoplazemski del integrina se veže na aktinske filamente s pomočjo vmesnih proteinov (vinkulina, α -aktinina, talina). Adherentni stiki in fokalni kontakti se povezujejo z aktinskimi filamenti citoskeleta in predstavljajo dinamične povezave, ki sodelujejo pri gibanju celic.

- dezmosomi in hemidezmosomi

Dezmosomi so najtrdnejša oblika medceličnih stikov, ki povezujejo mreže intermediarnih filamentov. Sodelujejo pri vzdrževanju tkivne strukture in omogočajo porazdeliti mehanski stres po celotnem epiteliju.

Dezmosomi so sestavljeni iz transmembranske regije, preko katere se povežejo s sosednjim celico, in citoplazemske regije, ki povezujejo transmembransko regijo s citoskeletom.

Transmembransko regijo sestavljajo kadherini, in sicer dezmonokin in dezmostein.

Citoplazemska regija oblikuje plak, v katerem so združeni plakoglobin, dezmplakin I in dezmplakin II ter dezmonkalmin. Preko njih se transmembranski proteini povezujejo z intermediarnimi filamenti. V funkcionalnem dezmosому sta povezani transmembranski regiji dveh sosednjih celic (Alberts in sod., 1994; Lodish in sod., 1999).

Hemidezmosomi povezujejo celice z bazalno lamino. Sestavljajo jih transmembranski proteini integrini in submembranski proteini (talin, α -aktinin, vinkulin, plektin).

c) PRESLEDKOVNI STIKI

Presledkovni stiki so sestavljeni iz transmembranskih proteinov koneksinov, ki tvorijo obročaste proteinske komplekse, imenovane koneksone. Dva koneksona tvorita kanal, ki neposredno povezuje sosednji celici. Takšna medcelična povezava omogoča prehajanje

ionov in ostalih vodotopnih molekul neposredno iz citoplazme ene v citoplazmo druge celice (Alberts in sod., 1994).

2.3.2 Zgradba citoskeleta

Citoskelet predstavlja osnovno ogrodje celice. Vzdržuje obliko celice, omogoča gibanje celic in organelov ter sodeluje pri celični delitvi. Sestavlajo ga trije tipi strurnih beljakovin: aktini, ki sestavljajo mikrofilamente, peстра družina proteinov, ki sestavljajo intermediarne filamente in tubulini, ki sestavljajo mikrotubule (Alberts in sod., 1994).

2.3.2.1 Aktinski filamenti

Aktinski filamenti so dinamične polarne strukture. Gradita jih dve ovijajoči se verigi, sestavljeni iz aktinskih monomerov, ki se dodajajo ali odstranjujejo na obeh koncih filimenta, glede na potrebe celice. Konec, kjer je hitrejše dodajanje podenot, se imenuje pozitivni (+) konec, nasprotni del aktinskega filimenta pa je negativni (-) konec. Faze nastajanja aktinskega filimenta so: nukleacija (vezava monomerov v oligomer), elongacija (dodajanje na + oz. – konec) in faza ravnotežja (število aktinov, ki se doda na + koncu je enako številu aktinov, ki se odcepijo na – koncu).

Aktinski filamenti se razprostirajo po celotni celici, vendar so večinoma najbolj skoncentrirani tik pod plazmalemo, kjer ji zagotavljajo podporo. V epitelijskih celicah mikrofilamenti sestavljajo kontraktilni obroč okrog celice, ki je povezan z adherentnimi stiki in poveča trdnost povezav in omogoča preoblikovanje celic epitelija. Pri gibajočih se celicah se omrežje mikrofilamentov nahaja na sprednji strani celice, vodilnem koncu ali lamelipodiju, iz katerega se lahko iztezajo filopodiji. Mnogo celic vsebuje kontraktilne elemente stresnih niti, ki se pritrdijo na podlago preko fokalnega stika. V delečih se celicah se naredi kontraktilni obroč, ki v procesu citokineze razdeli materinsko celico v dve hčerinski celici. Aktinski filimenti sodelujejo pri endocitozi (Alberts in sod., 1994; Lodish in sod., 2008).

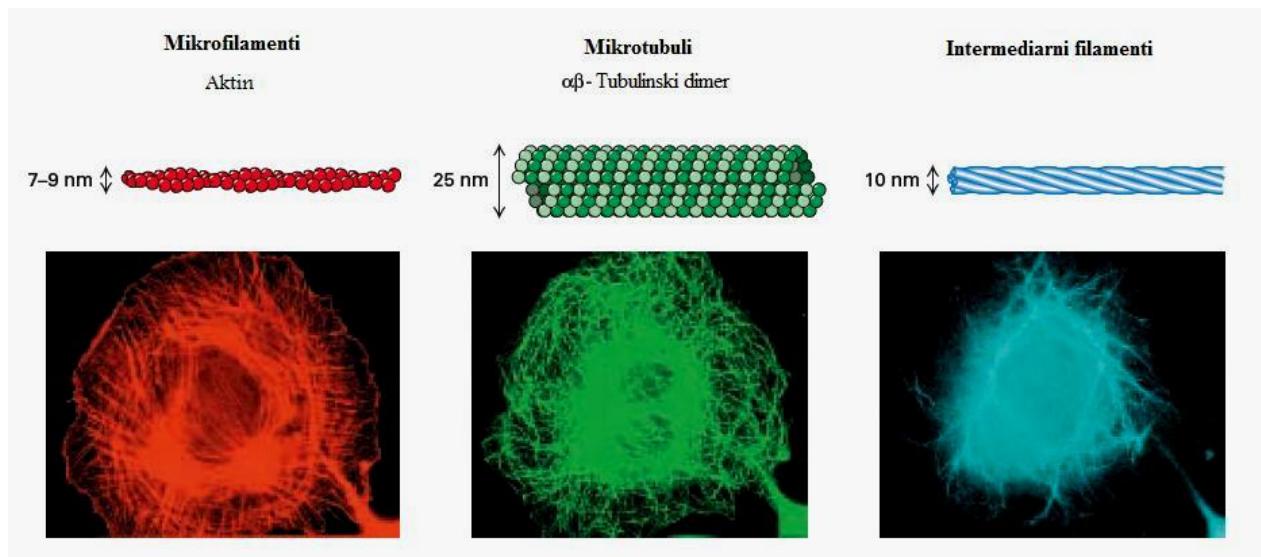
2.3.2.2 Mikrotubuli

Osnovni gradbeni element mikrotubulov je tubulinski heterodimer, sestavljen iz α in β podenote. Heterodimeri se zaporedno vežejo v protofilament, ki je polarizirana struktura, sestavljena iz hitro rastočega (+) in počasi rastočega (-) konca.

Mikrotubuli so dinamične strukture, pomembne pri notranji organizaciji ter transportu organelov, veziklov in membranskih kompleksov. Delujejo kot vodila, ob katerih motorni proteini premikajo molekularne komplekse in organele v celici. Glavna motorna proteina sta dinein in kinezin. Ob tem se porablja energija, ki nastane ob hidrolizi ATP. Mikrotubuli tvorijo delitveno vreteno, ki zagotavlja enakomerno porazdelitev celične dednine ob celični delitvi. So tudi sestavni deli bičkov in mitotalk (Alberts in sod., 1994; Lodish in sod., 2008).

2.3.2.3 Intermediarni filamenti

Intermediarni filamenti v živalskih celicah tvorijo stabilno mrežje, ki se prepleta po vsej citoplazmi in obdaja jedro. Celicam zagotavlja mehansko oporo predvsem na mestih, kjer pride celica v stik z ostalimi celicami ali z ekstracelularnim matriksom. Za epitelije so značilni citokeratinski filamenti, ki jih je v človeških epitelijskih celicah znanih 20 vrst. V epidermalnih celicah se intermediarni filamenti pojavljajo v bistveno večjih količinah kot v drugih epitelnih celicah (Alberts in sod., 1994; Lodish in sod., 2008).

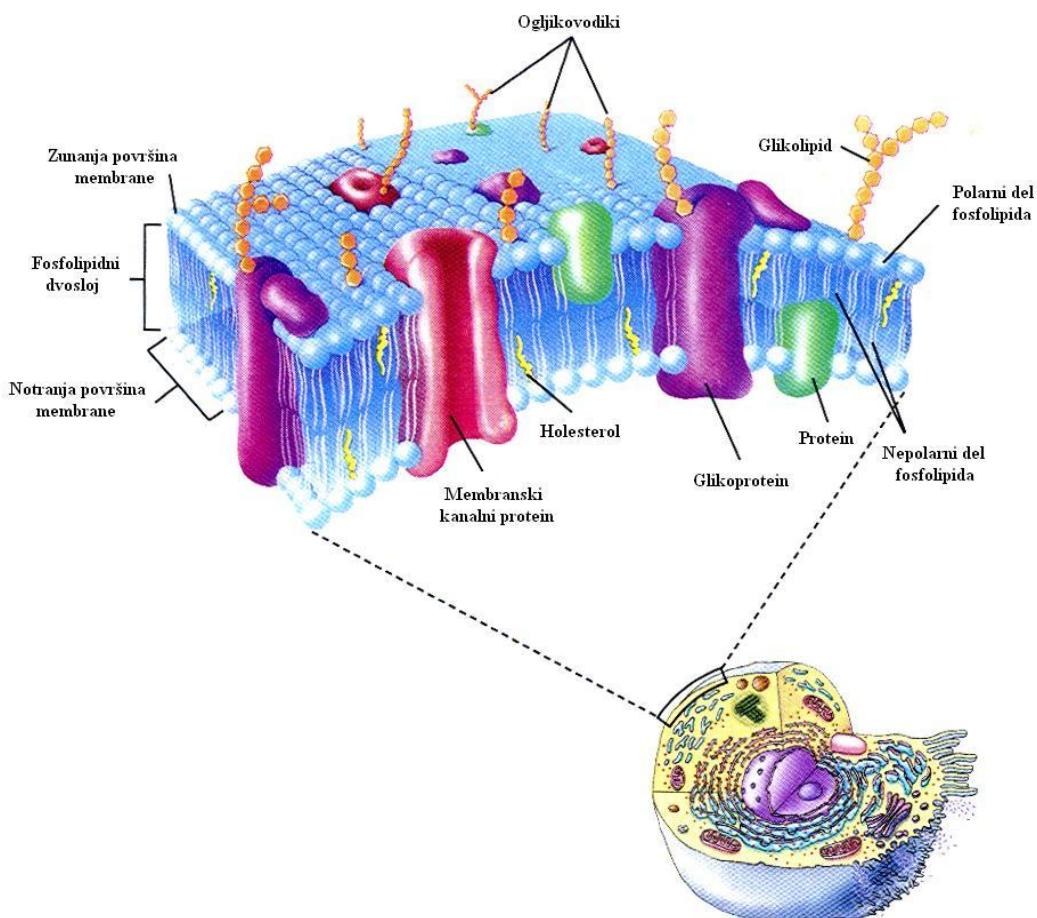


Slika 5: Komponente citoskeleta (Lodish in sod., 2008).

2.3.3 Sestava membrane

Biološke membrane sestavlja dva sloja lipidnih molekul, med katere se vrivajo proteini. Sestava notranje in zunanje plasti lipidnega sloja se razlikuje zaradi različnih funkcij obeh slojev membrane. Fosfolipidi se v polarnem topilu spontano uredijo v lipidni dvosloj, tako da se njihove polarne glave obrnejo proti topilu, nepolarni repi pa drug proti drugemu. Ta struktura omogoča življenje, saj predstavlja mejo tako med celico in njenom zunanjostjo, kot tudi med predeli znotraj celice.

Membrana je fluidna, kar pomeni, da se molekule lahko prosto gibljejo v lateralni smeri. Preskok iz ene plasti v drugo je termodinamsko in kinetično manj ugoden, katalizirajo ga encimi flipaze, ki s tem omogočajo asimetričnost lipidnega dvosloja. Na fluidnost vpliva tudi sestava lipidnega dvosloja. Večje število nenasičenih maščobnih kislin poveča fluidnost, prisotnost holesterola pa poveča njegovo stabilnost (Alberts in sod., 1994).



Slika 6: Shematični prikaz celične membrane z dvojno fofolipidno membrano (1).

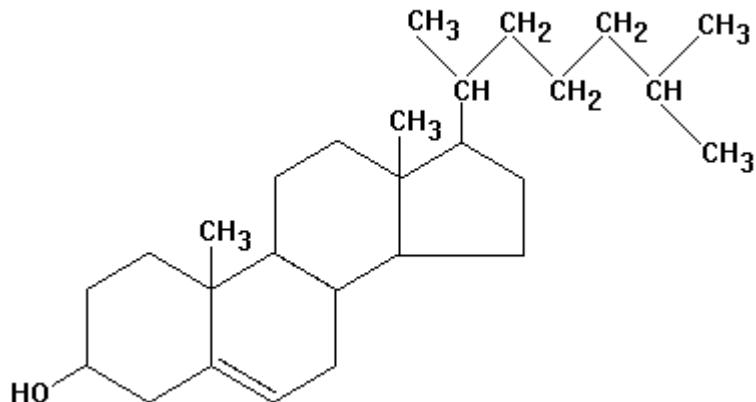
Poznane so tri skupine membranskih lipidnih molekul: fosfolipidi, holesterol in glikolipidi (Alberts in sod., 1994).

V vsakem tipu celic je lahko prisotnih več kot različnih vrst fosfolipidov, med katerimi sta najbolj pogosta sfingomielin in fosfatidilholin. Le-ta predstavlja 50% vseh membranskih fosfolipidov in je skoncentriran v zunanji polovici membrane (Ohvo-Rekilä in sod. 2002).

Glikolipidi so glikozilirani derivati lipidov. Nahajajo se v zunanjem sloju plazmaleme in služijo kot celični označevalci (Alberts in sod., 1994).

Holesterol je sterolni alkohol s kemijsko formulo $C_{27}H_{46}O$, gostoto $1,067 \text{ g/cm}^3$ in molsko maso $386,65 \text{ g/mol}$. Najdemo ga v celičnih membranah vseh vrst živalskih tkiv. V membrani se hidrosilna skupina nahaja v bližini fosfatnih glav fosfolipidnih molekul,

hidrofobni del pa je zasidran v hidrofobni sredici membran (Myant, 1981). Molekulo holesterola sestavlja steroidni skelet, ki ga sestavljajo 4 sklenjeni obroči (trije šestčlenski in en petčlenski), izoktilna stranska veriga in hidroksilna (-OH) skupina. Holesterol se v membranah tesno povezuje s fosfolipidi in sfingolipidi, ki imajo nasičene acilne verige (Xu in London, 2000). Preferenčno tvori interakcije s sfingolipidi, zlasti s sfingomielinom, kar je osnova za nastanek membranskih raftov v plazmalemi (Ohvo-Rekilä in sod. 2002).



Slika 7: Strukturna formula holesterola.

2.3.3.1 Razporeditev holesterola v membranah

Površina celične membrane ima morfološko natančno definirana področja (mikrovili, medcelični stiki in klatrinske jamice) in vsako področje ima značilno funkcijo, kot je npr. endocitoza, absorpcija hraničnih snovi, medcelični stiki in medcelična komunikacija (Anderson, 2002).

Holesterol in lipidi niso razporejeni homogeno znotraj lipidnega dvosloja. S holesterolom in sfingolipidi obogatena področja (mikrodome) membrane imenujemo splavi oz. membranski rafti. Sfingolipidi in holesterol v eksoplazemski plasti lipidnega dvosloja so povezani s fosfolipidi in holesterolom v notranji citosolni plasti lipidnega dvosloja. Membranski rafti so pri nizkih temperaturah (4°C) odporni na raztopljanje z neionskimi detergenti (Triton X-100) (Maxfield in Wüstner, 2002; Simons in sod., 2002).

Membranski rafti imajo pomembno vlogo v mnogih celičnih procesih:

- membranski transport,
- polarizacija celic,
- celična signalizacija,
- apoptoza,
- endocitoza in
- so vstopna mesta nekaterih intracelularnih parazitov in ostalih patogenov (Simons in sod., 2002).

Porazdelitev membranskih raftov po celični površini je odvisna od tipa celic. V polariziranih epitelijskih celicah so membranski rafti zgoščeni v apikalni membrani, medtem ko jih je v bazolateralni membrani manj (Simons in Toomre, 2000).

Holesterol v membranskih raftih privlači različne integralne in periferne proteine, s katerimi se dinamično povezuje. Proteini, ki so povezani z membranskimi rafti, so GPI – sidriščni protein, tirozin kinaze (Src družina), α -podenota heteromernega G proteina, Hedgehog in številni transmembranski proteini.

Funkcionalna aktivnost mnogih membranskih proteinov, vključno z rastnimi faktorji in faktorji za apoptozo, je odvisna od njihovega vključevanja v lipidne rafte. Membranski rafti so vključeni v kontrolo proliferacije in metabolne aktivnosti. Razgradnjo ali preoblikovanje membranskih raftov lahko dosežemo z agensi kot sta metil- β -ciklodekstrin in filipin III. Podoben učinek na membranske rafte imata oksidacija holesterola s specifično oksidazo ali blokiranje sinteze holesterola s statini. Razgradnja membranskih raftov lahko vodi celice v smrt – apoptozo ali nekrozo (Bang in sod., 2005).

2.4 KAKO CELICA DOBI HOLESTEROL

Vsebnost holesterola v organizmu je odvisna od sinteze *de novo*, vnosa s hrano, porabe za sintezo drugih molekul in reabsorpcije soli žolčnih kislin (Goli in sod., 2002). Največ ga je v tkivih z večjo gostoto membran: jetra, hrbtenjača in možgani (Myant, 1981).

Glavni del sinteze holesterola poteka v jetrih. Holesterol, ki ga vnesemo s hrano zmanjša aktivnost HMG-CoA reduktaze, ki je glavni encim biosinteze holesterola *de novo*. V nekaterih tkivih, kot so nadledvična žleza, vranica, pljuča in ledvica, biosinteza prispeva le majhen del celotnega holesterola v tkivu. Večino holesterola celice privzamejo iz krvi z LDL delci. Celice, razen jeternih, črevesnih in kožnih, večinoma pridobivajo holesterol iz plazme in ga ne sintetizirajo *de novo* (Akoh in sod., 2008).

2.4.1 Biosinteza holesterola *de novo*

Predhodniki v sintezi holesterola so sestavnici deli nekaterih celičnih molekul in sodelujejo v različnih celičnih procesih. Ključni so v dihalni verigi, pri prenifikaciji in prenosu sladkornih verig na proteine. Sinteza holesterola *de novo* poteka v Endoplazemskem retikulumu (Jakobisiak in Golab, 2003; Maxfield in Wüstner, 2002).

Biosinteza holesterola poteka v petih stopnjah:

1. pretvorba acetil – CoA v 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), ki jo katalizira HMG-CoA sintetaza,
2. encim HMG-CoA reduktaza (HMGR) pretvori HMG-CoA v mevalonat in je ključni encim za regulacijo sterolne sinteze s statini,
3. mevalonat se pretvori v izopentil pirofosfat (IPP),
4. šest molekul IPP se združi v skvalen,
5. holesterol nastane s ciklizacijo skvalena in 19 dodatnimi reakcijami.

Celica regulira aktivnost HMGR preko povratne inhibicije, razgradnje encima, uravnavanja ekspresije genov in fosforilacije. Na prva dva mehanizma vpliva holesterol direktno z vezavo na SSD domeno (sterol sensing domain) HMGR. Tako inhibira

delovanje HMGR ter povzroči ubikvitinacijo encima, ki ji sledi razgradnja. Na uravnavanje ekspresije genov za HMGR holesterol vpliva preko SREBP-SCAP (sterol regulatory element binding protein-SREBP cleavage activating protein) kompleksa. Holesterol ne vpliva na fosforilacijo HMGR, saj jo nadzorujejo hormoni preko cAMP. Zadnja dva procesa sta nujna za pravilno razporeditev in delovanje številnih membranskih proteinov (Jakobisiak in Golab, 2003; King, 2004).

2.4.2 Lipoproteinski delci

Holesterol se po plazmi prenaša v obliki holesterolnih estrov, ki so vezani z lipoproteini. Glede na gostoto delimo lipoproteinske delce v pet skupin: hilomikroni, VLDL, IDL, LDL in HDL (Goli in sod., 2002).

Zaradi hidrofobnosti osnovnih lipidov so le-ti v organizmih sesalcev večinoma vezani s proteini (apoproteini) in fosfolipidi v kroglaste komplekse – lipoproteine, ki lahko potujejo v vodnem okolju. Njihova struktura in sestava sta genetsko določeni.

Jedro lipoproteinov tvorijo hidrofobni triglyceridi in holesterolni estri, zunanji del pa amfipatični fosfolipidi, nekaj prostega (neesterificiranega) holesterola ter apolipoproteini. Apolipoproteini so proteinske komponente na površini lipoproteinov. Stabilizirajo strukturo, določajo presnovno vlogo lipoproteinov, vplivajo na aktivnost encimov in vežejo lipoproteine na specifični površinski celični receptor.

Preglednica 1: Razdelitev lipoproteinskih delcev glede na gostoto (5).

	Gostota g/dl	Premer nm	TAG %	holesterol %	fosfolipidi %
Hilomikroni	0,95	75 – 1200	80 – 95	2 – 7	3 – 9
VLDL	0,95 - 1,006	30 – 80	55 – 80	5 – 15	10 – 20
IDL	1,006 - 1,019	25 – 35	20 – 50	20 – 40	15 – 25
LDL	1,019 - 1,063	18 – 25	5 – 15	40 – 50	20 – 25
HDL	1,063 - 1,210	5 – 12	5 – 10	15 – 25	20 – 30

2.4.2.1 Transport lipidov po telesu

Lipoproteini se po telesu prenašajo po dveh poteh:

Eksogena pot je osnovna pot, po kateri se transporirajo lipidi iz hrani. Največji lipoproteini so **hilomikroni**, ki imajo na svoji površini fosfolipide, prosti holesterol, apoproteine, v notranjosti pa imajo triglyceride (80 – 95%) in esterificiran holesterol. Oblikujejo se v celicah stene tankega črevesja in se izločijo v limfo in preko le-te v kri ter prenašajo lipide od črevesja do jeter. V enterocitih poteka sinteza fosfolipidov ter reesterifikacija holesterola. Ko hilomikron zapusti črevesje, se nanj veže apoprotein CII, ki aktivira encim lipoprotein lipazo v kapilarni steni. Triglyceridi se sproščajo iz hilomikrona in se nato razcepijo na glicerol in proste maščobne kisline, ki se transportirajo do maščobnega tkiva in mišičnih celic. Ostanki hilomikrona, ki vsebujejo še apoproteine Apo A, B, in E (izgubili so Apo CII in CIII), se vrnejo v venski krvni obtok in nato v jetra (jetra vsebujejo posebne receptorje za ostanke hilomikronov).

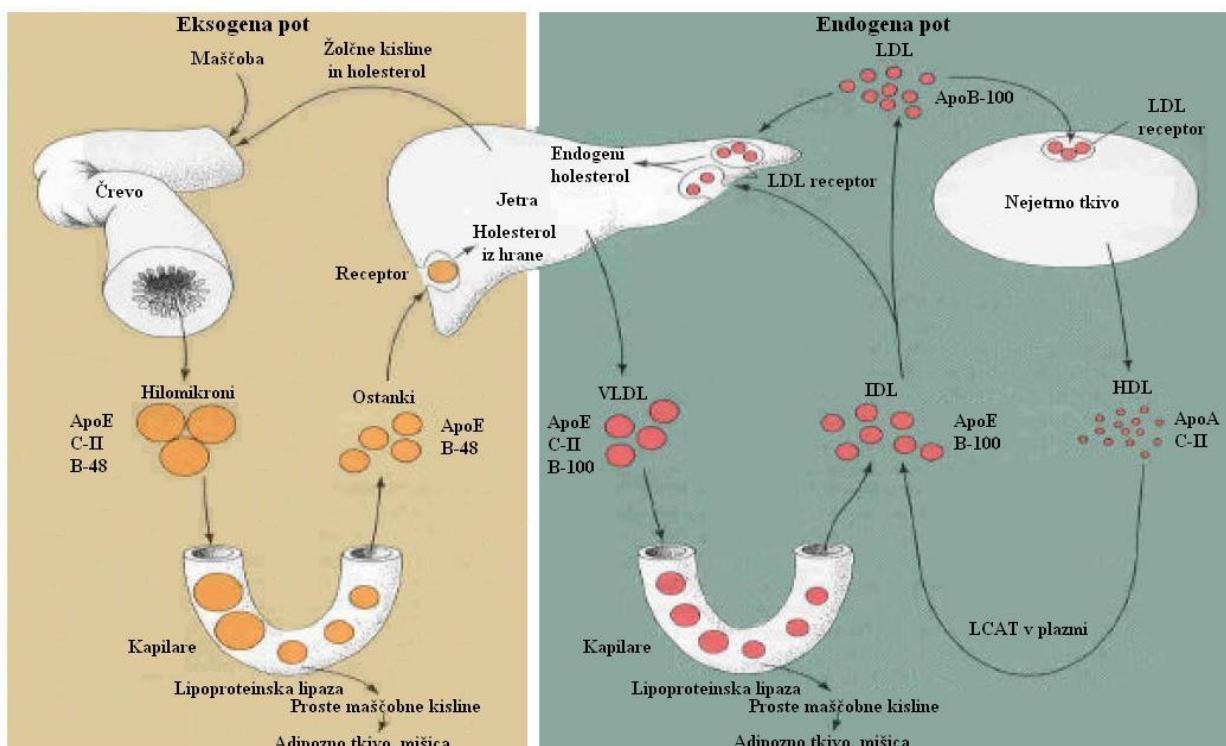
Endogena pot, po kateri se prenesejo lipidi iz jeter do perifernih tkiv in obratno, se začne s sintezo **VLDL**. Holesterol in v jetrih sintetizirani triacil gliceroli (TAG) se skupaj z Apo B 100, CII, CIII, E in fosfolipidi povežejo v VLDL, ki se izločijo v plazmo. Na plašč VLDL so vezani naslednji apoproteini: Apo B 100, CII, CIII in E. VLDL je sestavljen iz 50 do 60 % triglyceridov in 20 do 30 % holesterola. Apoprotein Apo CII na VLDL ponovno povzroči aktivacijo encima lipoprotein lipaze, Apo E pa služi prepoznavanju VLDL delcev s strani istih jetrnih receptorjev, ki prepoznavajo tudi hilomikrone. Endotelijsko vezana lipoproteinska lipaza hidrolizira TAG VLDL delcev.

Iz VLDL z oddajanjem triglyceridov nastanejo **IDL** delci. Večje IDL (vsebujejo več TAG) privzamejo jetra, manjši pa se pretvorijo v LDL.

LDL delci vsebujejo približno 50 do 60 % holesterola in manj kot 10 % triglyceridov. Nase imajo vezan le še Apo B 100. Ta apoprotein zaznavajo receptorji na membrani različnih celic (jetrne celice in celice ostalega perifernega tkiva). Večino LDL privzamejo jetra, ostanek pa prenaša holesterol po ostalih tkivih, predvsem v nadledvični žlezi in gonade.

LDL receptorje imajo skoraj vse celice telesa. Če v celico preko LDL prihaja veliko holesterola, se le ta začne v celici shranjevati.

Lipoproteinski delec največje gostote je **HDL**, ki vsebuje Apo A in CII (poleg tega so v majhnih količinah prisotni tudi Apo CI, CIII in E). Nastaja iz ostankov hilomikronov in VLDL delcev in služi kot glavni transport holesterola iz perifernih tkiv v jetra za tvorbo žolčnih soli (Vance & Vance, 2008; Voet & Voet, 1995).

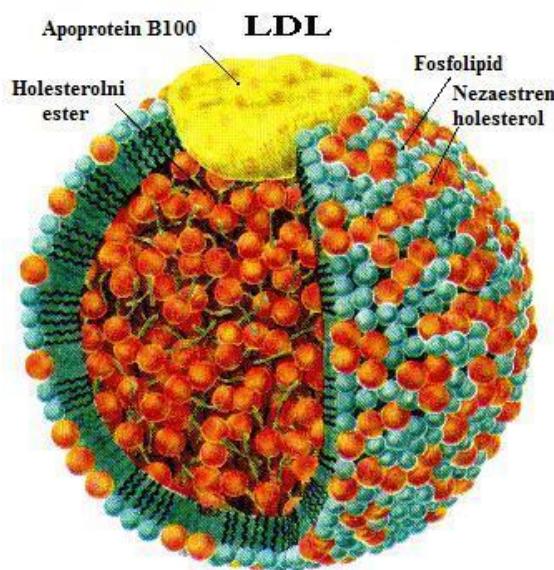


Slika 8: Presnova lipidov (Voet & Voet, 1995).

2.4.2.2 Receptorsko posredovana endocitoza LDL partiklov

Večina živalskih celic privzema holesterol za sintezo nove membrane z receptorsko posredovano endocitozo LDL partiklov. Če je privzem v celice blokirani, se holesterol akumulira v krvi in sodeluje pri tvorbi aterosklerotičnih plakov, kar lahko vodi v zdravstvene težave (možganska kap ali srčni infarkt).

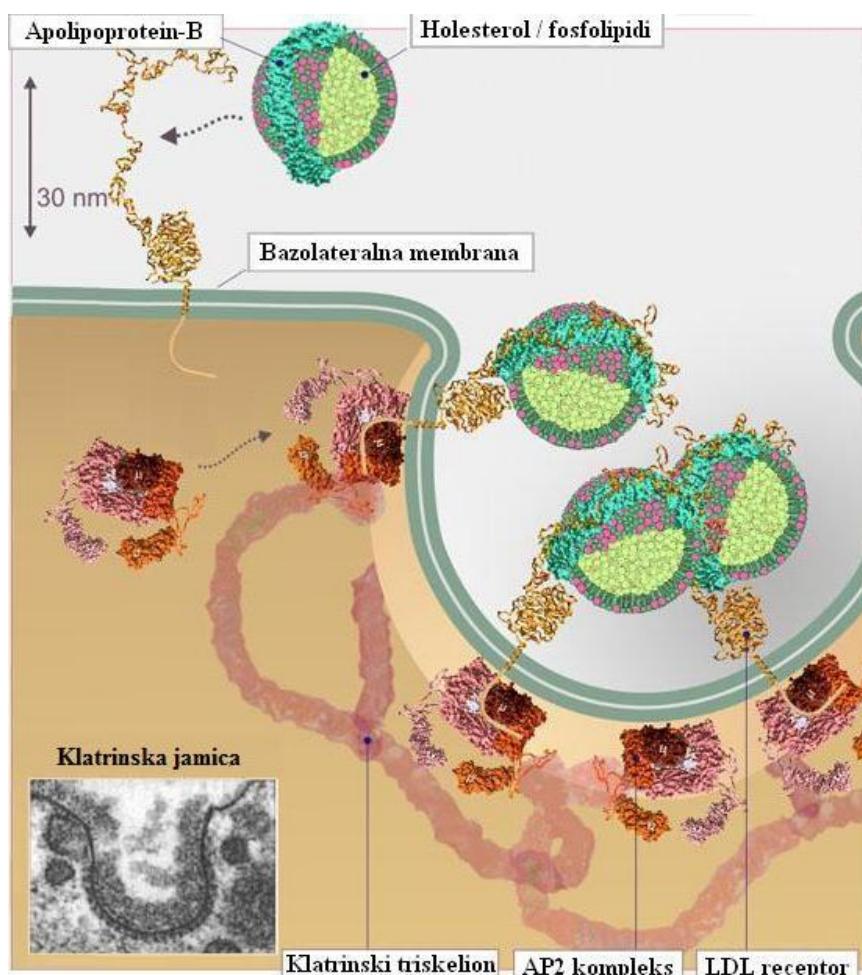
Po krvi do celic se transportira holesterol, ki je povezan s proteini, v obliki LDL partiklov. To so partikli, velikosti 22 nm. Vsebujejo jedro iz približno 1500 molekul holesterola, zaestrenega z dolgoverižnimi maščobnimi kislinami. Jedro je obkroženo z lipidnim monoslojem, sestavljenim iz približno 800 fosfolipidnih in približno 500 nezaestrenih holesterolnih molekul. Del membrane je apoprotein B-100.



Slika 9: Lipoproteinski delec nizke gostote – LDL (2).

Ko celica potrebuje holesterol, sintetizira transmembranske receptorske proteine in jih vgradi v plazmalemo. LDL receptor je glikoprotein, sestavljen iz petih domen. LDL receptorji imajo visoko stopnjo afinitete za LDL delce in sposobnost recikliranja. To omogoča vstop velikim količinam holesterola v tkiva (celice) in ohranja se nizka koncentracija holesterola v krvi. Receptorji vežejo LDL delce in jih prenesejo v celico z receptorsko posredovano endocitozo. LDL receptorji se povežejo z jamico v membrani, ki je prekrit s klatrinom in oblikuje se klatrinska jamica. Ko se LDL delec veže z receptorji, se klatrinska jamica v membrani odščipne in oblikuje vezikel z LDL delci. Potem ko se klatrinski plašč loči od vezikla, se vezikel zlije z zgodnjim endosomom. V zgodnjem endosomu se zniža pH zaradi protonskih črpalk in LDL delci se ločijo od receptorjev. Ti se reciklirajo nazaj v membrano. LDL delci se zlijejo s pozним endosomom ti pa z lisosomom, kjer se holesterolni estri hidrolizirajo do prostega holesterola. Tega celice

porabijo za sintezo nove membrane, žolčnih kislin in steroidnih hormonov. Če celica ne potrebuje holesterola, se receptorji razgradijo. Če se v celici akumulira preveč prostega holesterola, se blokira sinteza holesterola in sinteza receptorjev za LDL delce (Alberts in sod., 1994; Brown in Goldstein, 1985).



Slika 10: Receptorsko posredovana endocitoza LDL partiklov (3).

2.4.3 Regulacija vsebnosti holesterola v celicah

Pravilna znotrajcelična razporeditev holesterola je pomembna za mnoge biološke funkcije celic, vključno s signalno transdukcijo in transportom snovi skozi membrano. Ker holesterol vpliva na strukturo raftov in lastnosti membran (fazne prehode in fluidnost/rigidnost), mora biti vsebnost holesterola natančno regulirana (Maxfield in Wüstner, 2002).

V endoplazemskem retikulumu (ER) je koncentracija holesterola zelo nizka, okrog 0,5 – 1% celotnega celičnega holesterola. Količina holesterola naraste v Golgijevemu aparatu. Največ holesterola je v plazmalemi, to je 60-80% skupnega celičnega holesterola. V polariziranih epitelnih celicah je apikalna membrana bolj obogatena s holesterolom in sfingolipidi v primerjavi z bazolateralno membrano (Maxfield in Wüstner, 2002).

Lipidno homeostazo v celicah vretenčarjev regulira družina membransko vezanih transkripcijskih faktorjev, imenovanih SREBPs (sterol regulatory element binding proteins). SREBPs aktivira ekspresijo več kot 30 genov, ki so odgovorni za sintezo in privzem holesterola, maščobnih kislin, trigliceridov in fosfolipidov.

Količino holesterola zaznava in vzdržuje povratna zanka, ki je občutljiva na koncentracijo holesterola v endoplazemskem retikulumu. Povečanje vsebnosti holesterola v ER vodi v razgradnjo 3-HMG Co-A reduktaze, ki je ključni regulacijski encim biosinteze holesterola (Maxfield in Wüstner, 2002).

Povratna zanka prilagaja prepisovanje genov, ki kodirajo encime, vključene v metabolizem holesterola. Regulator je SREBP, ki se takoj po sintezi poveže s SCAP (SREBP cleavage activating protein) v kompleks SREBP – SCAP, ki je usidran v membrani endoplazemskega retikuluma (ER). SREBP vsebuje domeno (SSD – sterol sensing domain) za zaznavanje prisotnosti holesterola. Ko holesterola primanjkuje, je SSD prazna in SCAP posreduje prenos kompleksa SREBP – SCAP iz membrane ER v membrano Golgijevega aparata, kjer SREBP razcepita dve membransko vezani serinski proteazi (S1D in S2D). Ob drugi cepitvi se v citoplazmo sprosti NH₂ konec SREBP in se prenese v jedro. Tu se veže na SRE (sterol regulatory element) ter sproži od SRE oziroma od sterolov odvisno prepisovanje genov. Ko je vsebnost holesterola zadostna, kompleks SREBP – SCAP ostaja v membrani ER, zato ne pride do cepitve in SRE se ne aktivira (Gimpl in sod., 2002; Horton in sod., 2002; Nohturfft in sod., 1999).

2.4.4 Hipoholesterolemija in hiperholesterolemija

V plazmi človeka se najpogosteje pojavlja LDL oblika lipoproteinskih delcev, ki po plazmi prenaša do 75% celotnega plazemskega holesterola. Povprečna koncentracija holesterola, ki ga nosi LDL, se giblje med 1,3 – 4 mmol/l. Preobilje le-tega v plazmi povzroča različne zdravstvene težave, zato mora biti nivo holesterola v plazmi dobro reguliran (Brown, 1985; Goli in sod., 2002). Manj znano in tudi slabše raziskano je, da so prenizke količine holesterola prav tako škodljive.

Hipoholesterolemija je prisotnost nizke koncentracije holesterola v krvi. Vzroki so lahko neslednji (Marini in sod., 1989):

- hipertiroidizem,
- bolezni jeter,
- slaba absorpcija
- slaba prehranjenost,
- celiakija,
- abetalipoproteinemija,
- hipobetalipoproteinemija,
- pomanjkanje mangana,
- Smith-Lemli-Opitz sindrom,
- levkemija in druge hematološke bolezni.

Nizke koncentracije holesterola povezujejo z depresijami, rakavimi obolenji, malformacijami fetusa, možganskimi krvavitvami in respiratornimi boleznimi (Jacobs in sod., Wolf, 1999).

Pri **hiperholesterolemiji** je povišan nivo holesterola v plazmi (povečana plazemska koncentracija LDL) v prisotnosti normalnih nivojev trigliceridov. Vzrok je lahko: okvara enega gena, poligenska okvara ali sekundarni učinek drugih bolezenskih stanj (hipotiroza, okvara ledvic, nosečnost/povišana raven estrogena). Povišana koncentracija holesterola je pomemben dejavnik tveganja za aterosklerozo in posledično srčno-žilne bolezni.

Zmanjšana količina LDL receptorjev na celični membrani je osnova za družinsko dedovano hiperholesterolemijo. Homozigoti (en človek na miljon) nimajo LDL receptorjev, kar povzroči 6-kratno koncentracijo holesterola v krvi v primerjavi z normalnim. Takšno stanje povzroči huda srčno-žilna obolenja že v rani mladosti. Večina homozigotov umre do starosti 12 let. Heterozigoti (en človek od petsto) imajo le delno okvarjene receptorje, kar povzroči približno dvakrat večjo vrednost skupnega holesterola v krvi v primerjavi z normalnim. Skoraj vsi heterozigoti doživijo srčni infarkt pri starosti do 20 let (Hobbs in sod., 1989; Voet & Voet, 1995).

Jasna je povezava med razvojem koronarne bolezni srca in povišanjem koncentracije holesterola ter LDL holesterola v serumu ob zmanjšani koncentraciji HDL holesterola. HDL holesterol predstavlja zaščito krvnih žil pred aterosklerotičnimi procesi (Kovač in sod., 2003).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 GOJENJE CELIČNIH KULTUR *IN VITRO*

Kot model za proučevanje smo uporabili tri celične linije: MDC2, RT4 in HaCaT.

Celice smo hranili v skrinji na - 80°C ali v tekočem dušiku. Za gojenje jih je bilo potrebno najprej odmrzniti. V malo plastično posodo za gojenje celic ($p=25\text{ cm}^2$) (slika 11) smo odpipetirali 5 ml medija za gojenje celičnih kultur (kontrolnega medija). Vodo smo segreli na 37°C, vzeli stekleničko z zamrznjenimi celicami in jo stresali v segreti vodi 1,5 min.

Nato smo celice prelili v posodo z medijem.

Ko so celice konfluentno prerasle dno posode, smo jih presadili v večjo plastično posodo za gojenje celic ($p=75\text{ cm}^2$) (slika 11) in jih ponovno gojili do konfluentnosti.

3.1.1 Mediji

Za poskus smo uporabili tri različice medijev/tretmajev:

- kontrolni medij (F12 / ADMEM) – 10% fetalni telečji serum

Celice smo gojili v mediju (A-DMEM (Advanced- Dulbecco's minimum essential medium, GIBCO) / HAM F12 (SIGMA) v razmerju 1:1, ki smo mu dodali ITS (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ inzulina, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ transferina, 5 ng/ml selenita, GIBCO), fetalni telečji serum (SIGMA) in antibiotike crystacilin (Pliva) in strepto-fatol (Fatol) v inkubatorju (Heraeus, Heracell) pri 37°C in 5% CO₂ atmosferi.

Celicam smo medij zamenjali 3-krat tedensko.

- brezholesterolni medij (LPPS) – serum brez holesterola

Serum brez holesterola smo pripravili tako, da smo v FCS (serum govejih zarodkov) postopoma dodali KBr in centrifugirali 24 ur. Motno zgornjo fazo, ki je vsebovala LDL/HDL lipoproteinske delce in s tem večino holesterola, smo odstranili. Iz preostalega supernatanta smo odstranili KBr z nekajdnevno dializo. Brezholesterolni serum smo dializirali proti fiziološki raztopini (0,9% NaCl) v hladnem.

- medij s 3-kratno koncentracijo holesterola – serum z dodanimi HDL/LDL lipoproteinskimi delci

Izmerili smo koncentracijo holesterola v FCS in serumu s HDL/LDL delci. Nato smo izračunali količino seruma s HDL/LDL delci, ki smo ga morali dodati kontrolnemu mediju, da smo dobili medij s 3-kratno koncentracijo holesterola.

3.2 PRESAJANJE CELIČNIH KULTUR

Ob presajanju celic smo najprej odpipetirali star medij in dodali toliko proteolitičnega encima Tripple select (Gibco), da je prekril celice ter dali v inkubator za toliko časa, dokler se celice niso zaokrožile in ločile. Nato smo celice resuspendirali v svežem mediju in suspenzijo prenesli v centrifugirko. Centrifugirali smo 5 minut na 23°C pri 200 g. Za tem smo odpipetirali supernatant in celice resuspendirali v svežem kontrolnem mediju.

3.2.1 Štetje celic s hemocitometrom in presajanje na petrijevke

S predhodnimi poskusi smo določili ustrezno koncentracijo celic za nadaljne poskuse, pri katerih smo najprej v epruvetko (Eppendorf) odpipetirali 50 µl suspenzije celic, dodali 10 µl tripanskega modrila (Gibco) ter 10 µl prenesli na hemocitometer in prešteli celice.

Izračunali smo želeno koncentracijo celic in jih nasadili v: plastične petrijevke, petrijevke z mrežo (MatTek Corporation) ali na krovna stekelca, ki smo jih položili v plastične petrijevke, odvisno od namena proučevanja.

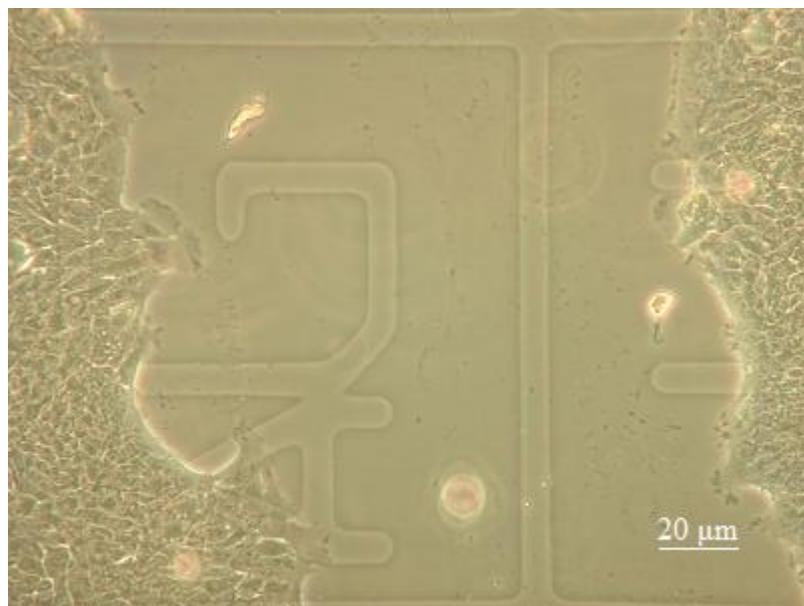
Za proučevanje zaraščanja poškodbe *in vitro* smo celice nasadili v petrijevke z vrisano mrežo. Pri proučevanju proliferacije in trdnosti medceličnih stikov smo celice nasadili v plastične petrijevke, pri razporeditvi aktina ter dezmosomov na krovna stekelca, ki smo jih vzeli iz alkohola, osušili in položili v plastične petrijevke.



Slika 11: Plastične posode za gojenje celičnih kultur (4).

3.2.2 Preraščanje poškodbe *in vitro*

Celice smo nasadili v petrijevke z mrežo (MatTek Corporation), pri vsaki celični kulturi za vsak medij po 3 paralelke, in jih gojili do konfluentnosti. Nato smo postrgali površino glede na vrsto celične kulture. Pri RT4 celični kulturi smo z 200 µl nastavkom pipete postrgali proge po sredini stekelca (slika 12). Pri MDC2 in HaCaT celični kulturi smo s strgalom postrgali polovico konfluentno prerasle kulture. Nato smo odpipetirali star kontrolni medij in dodali ustrezni medij glede na tretma. Celice smo gojili v treh ustreznih medijih 48 ur in z digitalnim fotoaparatom (Nikon Coolpix950) pod invertnim mikroskopom (Leica) slikali postrgano površino na istih mestih po 24 in 48 urah. Postopek smo ponovili 2-4-krat za vsako celično kulturo. S programom ImageJ smo na vsaki sliki obrisali postrgano površino in izmerili njen površino. Izračunali smo razliko površin za točno določeno mesto, ki je bilo poslikano po 24 in 48 urah inkubiranja. Iz razlik površin v istem poskusu za posamezni tretma pri določeni celični kulturi smo izračunali povprečje razlik površin. Tako smo dobili 2-4 povprečja razlik površin in izračunali skupno povprečje za vsak posamezen tretma za vsako od proučevanih kultur. Povprečje razlik površin pri kontrolnem tretmaju smo vzeli kot 100% in za ostala dva tretmaja preračunali odstotek preraščenosti postrgane površine glede na povprečje preraščenosti v kontrolnem tretmaju.



Slika 12: Postrgana površina v RT4 celični kulturi, gojeni na petrijevki z mrežo.

3.2.3 Delitev celic

Pri proučevanju namnoževanja celic smo nasadili 6 petrijevk (po 2 paralelki za vsak medij) in dodali kontrolni medij za 24 ur, da so se celice namnožile. Čez 24 ur smo zamenjali medij in dodali v vsako paralelko ustrezni medij. Po 48 urah smo vzeli po eno petrijevko vsakega tretmaja, dodali triple select, centrifugirali, odpipetirali supernatant, dodali svež medij ter prešteli celice s hemocitometrom. Po 72 urah smo ta postopek ponovili. Poskus smo ponovili trikrat. Pri tretiranju RT4 in MDC2 celic z LP se je po centrifugiranju pojavila sluz, ki je ovirala štetje celic in zaradi tega rezultatov za LP tretma nismo upoštevali.

3.3 IMUNOFLUORESCENČNO OZNAČEVANJE

3.3.1 Označevanje aktina

Iz petrijevk, v katerih smo predhodno na krovnih stekelcih namnožili celice, smo odstranili medij. Za fiksacijo celic smo uporabili 4% paraformaldehid. Celice smo nato pustili v fiksativu 30 minut na sobni temperaturi. Za tem smo spirali 30 minut s PBS in nato dodali faloidin, označen s Tritc (Sigma), razredčen 1:5 s PBS, za označevanje aktina za 30 minut.

Po 30 minutah spiranja s PBS smo kanili na objektno stekelce kapljico sredstva proti bledenju - Vectashield z DAPI (Vector Laboratories) in objektno stekelce prekrili s krovnim stekelcem s celicami. Preparat smo pregledali pod fluorescenčnim mikroskopom (Nikon, Eclips 300).

3.3.2 Štetje celic na površinsko enoto

Na slikah z označenim aktinom ali z jedri smo si izbrali določeno površino v obliki pravokotnika. En rob se je skladal z robom postrgane površine, drugi pa je segal v področje konfluentno prerastle kulture. Na tej površini smo nato prešteli celice ali jedra in preračunali število celic na površinsko enoto.

3.4 ANALIZA VSEBNOSTI HOLESTEROLA

3.4.1 Priprava celic

Za analizo vsebnosti celičnega holesterola smo celice nasadili v večje plastične posode (75 cm^2). Za vsak medij smo uporabili dve paralelki.

Ob doseženi konfluentnosti smo odpipetirali standardni medij in dodali ustrezен medij/tretma. Po 24 urah inkubiranja v treh različnih tretmajih smo odstranili medij, celice prelili s PBS in jih postrgali s strgalko. Suspenzijo smo prenesli v centrifugirko in centrifugirali. Po centrifugiranju smo odstranili PBS in pelete resuspendirali v 1,5 ml svežega PBS in prenesli v epruvetke ter dali na led. Nato smo ponovno centrifugirali. Za tem smo odstranili supernatant in pelete zamrznili na -80°C . Pred določanjem proteinov in holesterola smo pelet odmrznili in resuspendirali v 1 ml PBS ter odvzeli petino vzorca za določanje proteinov po Bradfordu in preostanek za določanje holesterola.

3.4.2 Določanje proteinov

Uporabili smo metodo po Bradfordu. Suspenzije celic smo ustrezeno redčili. Za umeritveno krivuljo smo pripravili koncentracije BSA (Merck) od 0 do $10\text{ }\mu\text{g/ml}$. Po dodatku Bradfordovega reagenta smo redčenim vzorcem izmerili absorbanco pri valovni dolžini

600 nm. Koncentracijo proteinov za posamezen vzorec smo izračunali iz umeritvene krivulje.

3.4.3 Izolacija lipidov in določanje holesterola

Lipide smo izolirali po Bligh-Dyer-jevi metodi (Bligh in Dyer, 1959). Odpipetirali smo 200 µl suspenzije celic in dodali 200 µl kloroforma, 400 µl metanola, premešali in pustili 10 minut. Nato smo dodali 200 µl kloroforma in 200 µl destilirane vode, ponovno premešali, počakali 10 minut in nato centrifugirali 1 minuto na 5000 obratih. Raztopina je prešla v dve fazи. Ker so v spodnji fazi ostali lipidi, raztopljeni v kloroformu, smo spodnjo fazo previdno odpipetirali v čisto epruvetko. Kloroform smo odparili s prepihovanjem z dušikom in tako zaustavili oksidacijo lipidov in s tem tudi holesterola. Sušine lipidov smo raztopili v 20 µl izopropanola. Holesterolnim vzorcem smo dodali reagent za določanje vsebnosti holesterola (Konelab Cholesterol reagent, Thermo). Nato smo izmerili absorbanco vzorcev pri valovni dolžini 560 nm in iz umeritvene krivulje izračunali koncentracije holesterola. Vsebnost holesterola smo podali kot maso holesterola na maso proteinov.

3.5 DISPAZNI LOČITVENI TEST

Celice smo gojili v kontrolnem mediju, mediju brez holesterola in mediju z dodanimi LP v treh paralelkah in z enako nasaditveno gostoto za vsak tretma. Sloj celic smo od podlage ločili z dispazo (1,5 U/ml) in nato celice resuspendirali z 200 µl tipsom. Suspenzijo celic smo nanesli na objektnik in prešteli posamične celice v naključnih vidnih poljih pod invertnim mikroskopom. Za vsak posamezen tretma pri vsaki od proučevanih kultur smo izračunali povprečje števila posamičnih celic. Pri kontrolnem tretmaju smo to povprečje vzeli kot 100% in izračunali odstotek posamičnih celic pri ostalih dveh tretmajih glede na povprečje posamičnih celic v kontrolnem tretmaju.

4 REZULTATI

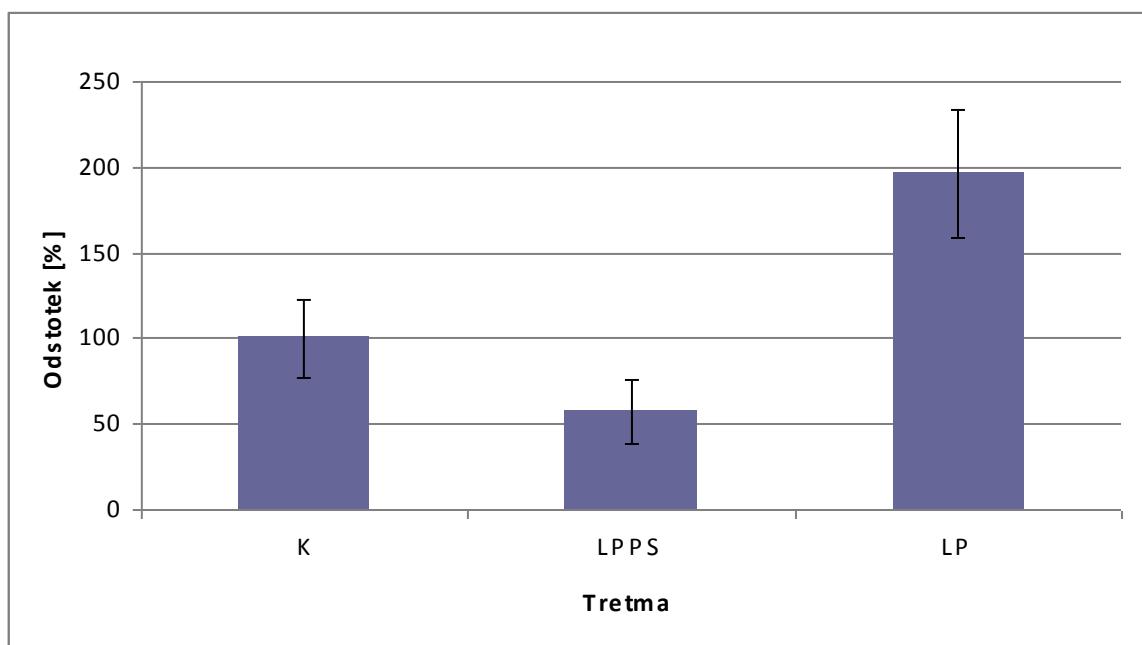
4.1 PRERAŠČANJE POŠKODBE *IN VITRO*

Na slikah (13, 14, 15) je prikazan odstotek preraščenosti postrgane površine pri brezholesterolnem mediju – LPPS in mediju s 3-kratno količino holesterola – LP glede na povprečno preraščenost v kontrolnem tretmaju.

Pri MDC2 celični kulturi je tretiranje z LP statistično značilno povečalo odstotek preraščenosti postrgane površine, tretiranje z LPPS pa je statistično značilno zmanjšalo odstotek preraščenosti postrgane površine glede na kontrolni tretma (slika 13, preglednica 2).

Pri RT4 celični kulturi je LP medij statistično značilno pospešil preraščanje postrgane površine v primerjavi s kontrolnim medijem. Med tretmajem z medijem, ki je vseboval LPPS in kontrolnim medijem ni bilo značilnih razlik (slika 14, preglednica 3).

V primeru HaCaT celične kulture ni bilo statistično značilnih razlik v preraščanju postrgane površine pri LPPS in LP glede na kontrolni tretmatreh (slika 15, preglednica 4).

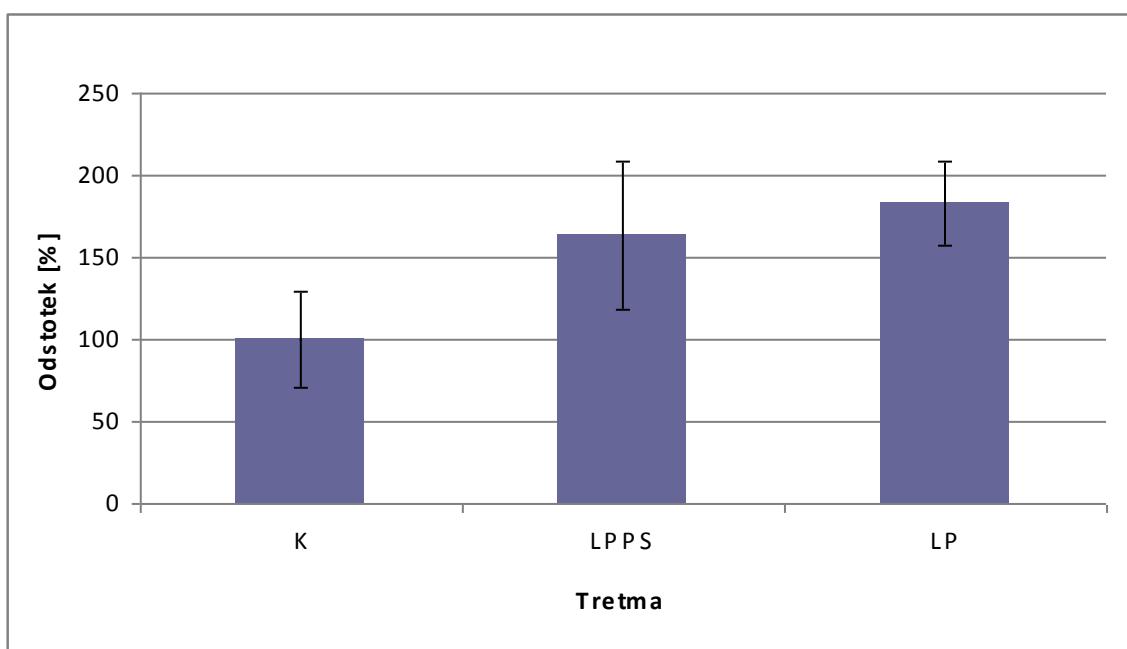


Slika 13: Odstotek preraščenosti postrgane površine MDC2 celične kulture za LPPS in LP tretma glede na kontrolni tretma. Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.

Preglednica 2: Stopnje statistične značilnosti razlik preraščanja postrgane površine za MDC2 celično kulturo.

Tretma	p
K – LPPS	0,041*
K - LP	0,001*

Opomba: Značilna razlika ($p < 0,05$) je označena z *.

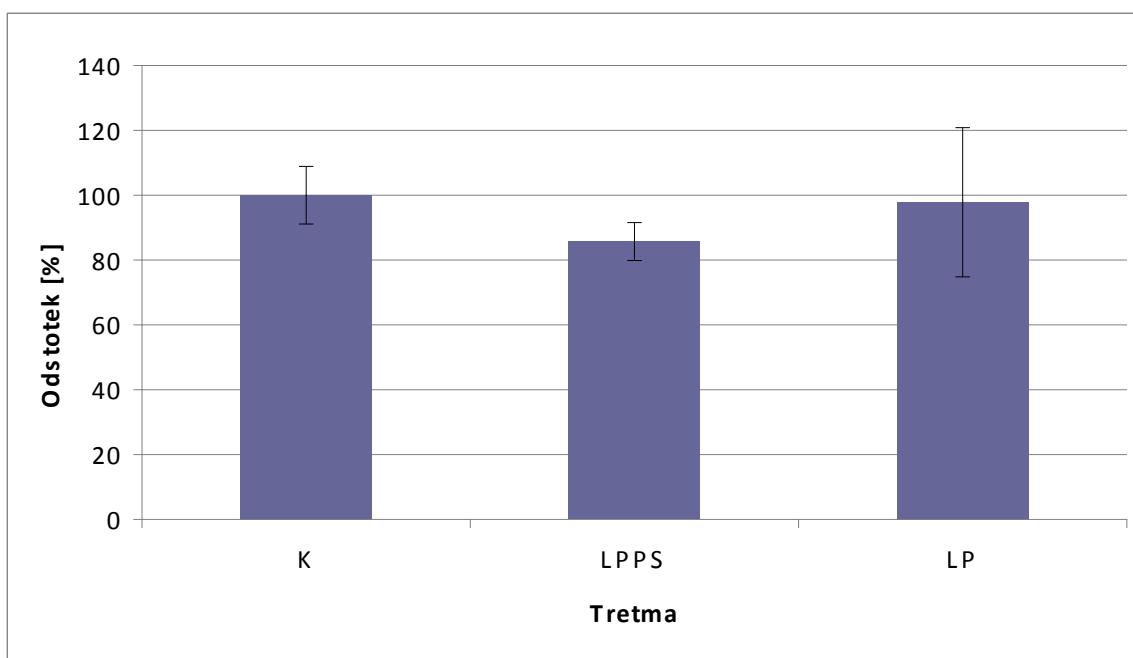


Slika 14: Odstotek preraščenosti postrgane površine RT4 celične kulture za LPPS in LP tretma glede na kontrolni tretma. Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.

Preglednica 3: Stopnje statistične značilnosti razlik preraščanja postrgane površine za RT4 celično kulturo.

Tretma	p
K – LPPS	0,058
K - LP	0,041*

Opomba: Značilna razlika ($p < 0,05$) je označena z *.



Slika 15: Odstotek preraščenosti postrgane površine HaCaT celične kulture za LPPS in LP tretma glede na kontrolni tretma. Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.

Preglednica 4: Stopnje statistične značilnosti razlik preraščanja postrgane površine za HaCaT celično kulturo.

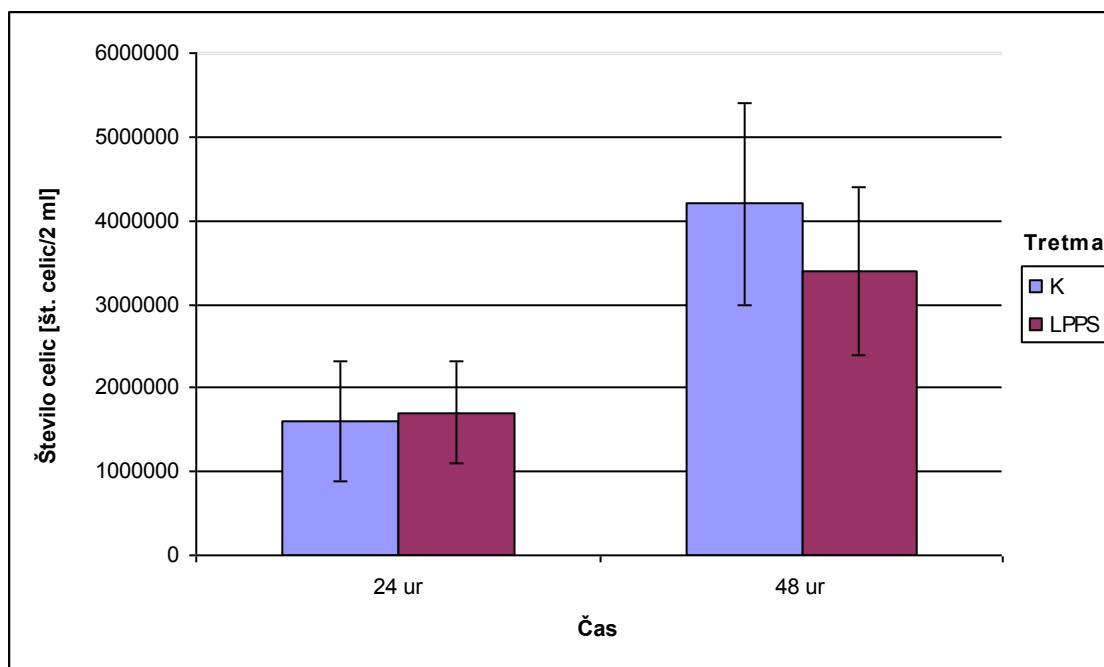
Tretma	p
K – LPPS	0,922
K - LP	0,555

4.2 DELITEV CELIC

Za proučevanje namnoževanja celic smo uporabili 6 paralelk (za vsak tretma dve paralelki) in jih inkubirali 48 ur v treh različicah medija (kontrolni, LPPS in LP).

Pri MDC2 celični kulturi se je število celic po 48 urah tretiranja s kontrolnim medijem (K) statistično značilno povečalo v primerjavi s 24 urami tretiranja s K, medtem ko pri tretiranju z medijem, ki je vseboval LPPS ni bilo statistično značilne razlike med 24 in 48 urami inkubiranja (slika16, preglednica 5).

Pri RT4 celični kulturi se število celic po 24 in 48 urah tako v kontrolnem mediju kot ob dodatku LPPS ni značilno spremenilo (Slika 17; preglednica 6), prav tako se pri HaCaT celični kulturi število celic pri tretiranju s K in LPPS po 24 in 48 urah statistično ni značilno spremenilo (Slika 18, preglednica 7).

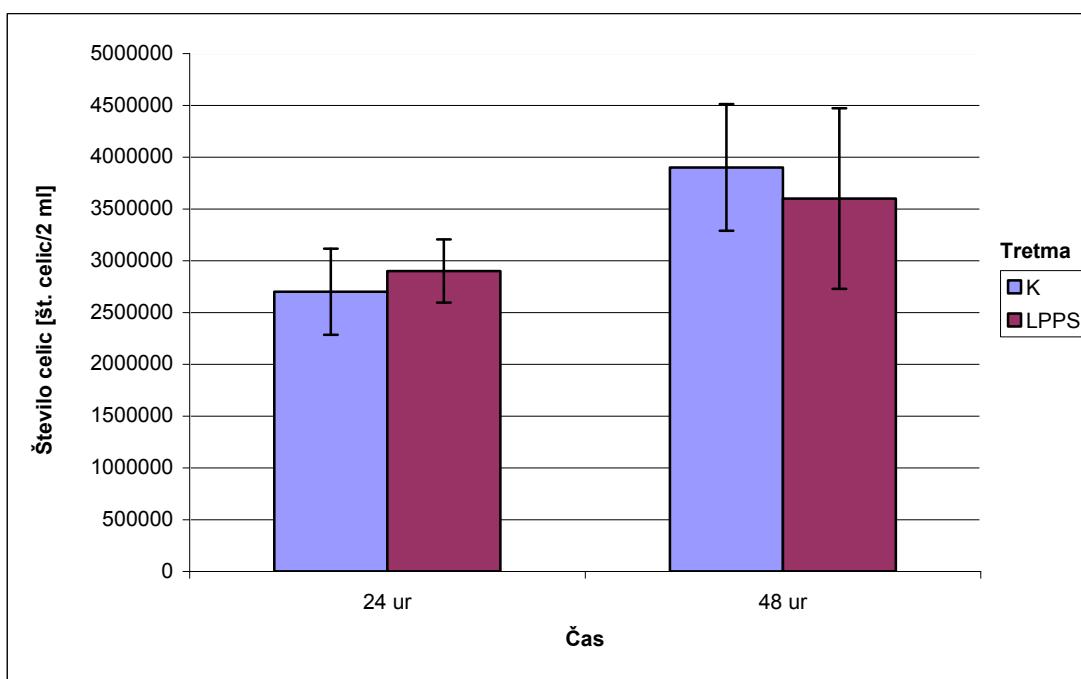


Slika 16: Število celic MDC2 celične kulture po 24 in 48 urah tretiranja s kontrolnim medijem in medijem LPPS. Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.

Preglednica 5: Stopnje statistične značilnosti sprememb števila celic MDC2 celične kulture po 24 in 48 urah tretiranja s kontrolnim medijem in LPPS.

Tretma	K	LPPS
24 ur - 48 ur	0,046*	0,076

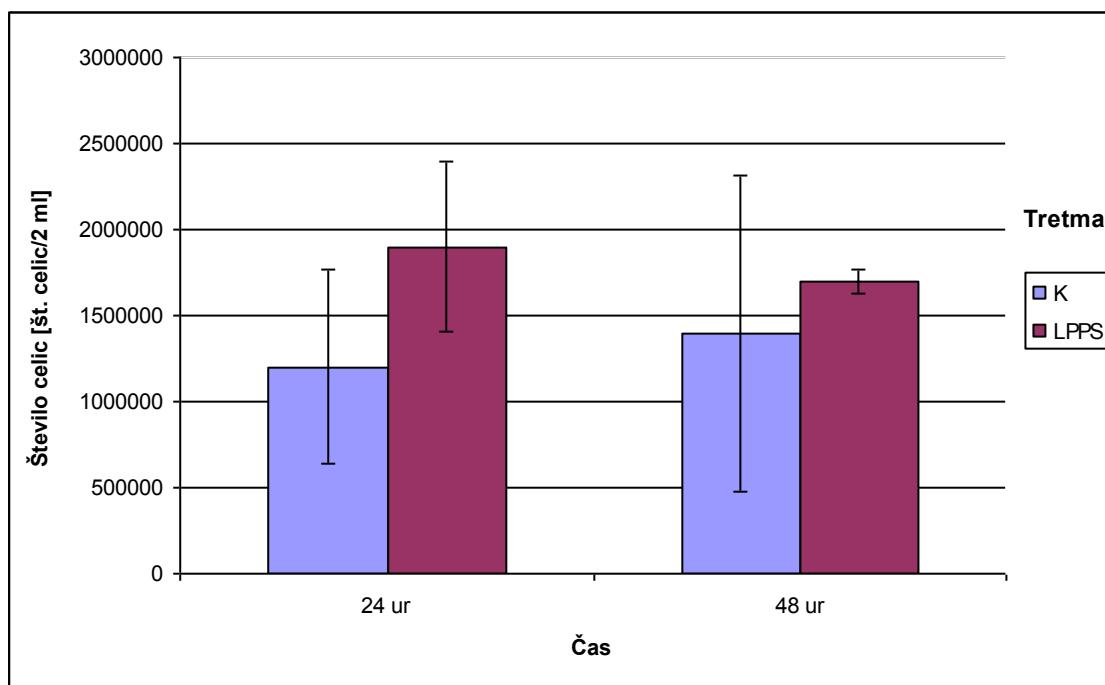
Opomba: Značilna razlika ($p < 0,05$) je označena z *.



Slika 17: Število celic RT4 celične kulture po 24 in 48 urah tretiranja s kontrolnim medijem in medijem LPPS. Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.

Preglednica 6: Stopnje statistične značilnosti sprememb števila celic RT4 celične kulture po 24 in 48 urah tretiranja s kontrolnim medijem in LPPS.

Tretma	K	LPPS
24 ur – 48 ur	0,065	0,316



Slika 18: Število celic HaCaT celične kulture po 24 in 48 urah tretiranja s kontrolnim medijem in medijem z LPPS. Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.

Preglednica 7: Stopnje statistične značilnosti sprememb števila celic HaCaT celične kulture po 24 in 48 urah tretiranja s kontrolnim medijem in LPPS.

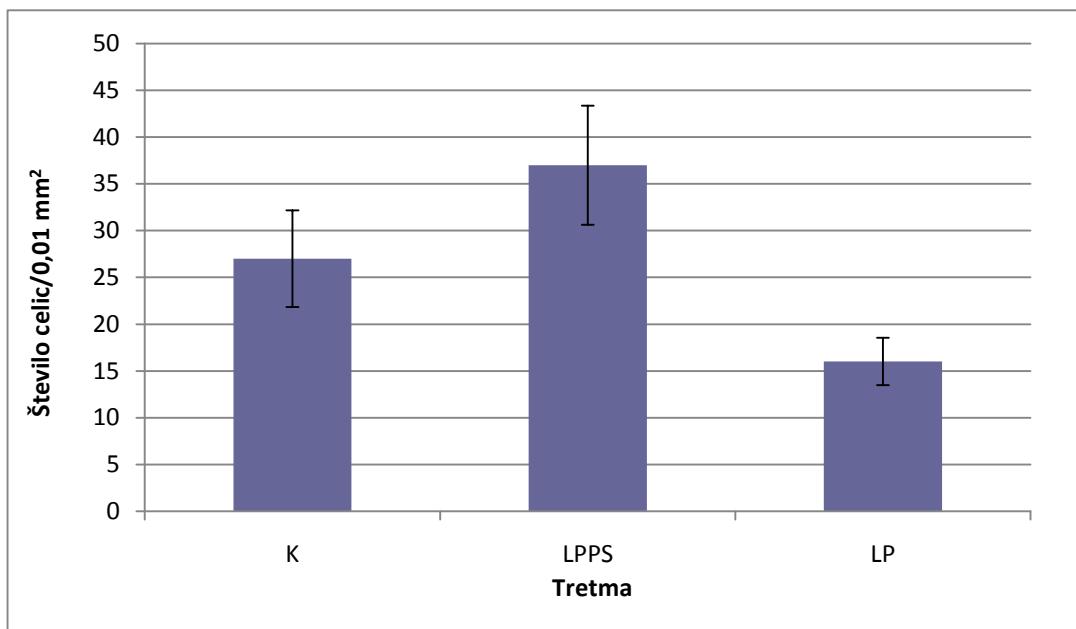
Tretma	K	LPPS
24 ur – 48 ur	0,866	0,669

4.3 ŠTEVILO CELIC NA POVRŠINSKO ENOTO

Na slikah z označenim aktinom in jedri smo prešteli število celic oz. jeder na določeno površino.

Pri MDC2 celični kulturi se je po tretiranju z LP tretmajem število celic na določeni površini statistično značilno zmanjšalo, medtem ko je bilo po tretiranju z LPPS število celic statistično značilno večje (slika 19, preglednica 8). Pri RT4 celični kulturi je bilo tako po LP tretmaju kot tudi po tretiranju z LPPS število celic na določeno površino statistično

značilno manjše (slika 20, preglednica 9). Pri HaCaT celični kulturi ni bilo statistično značilne razlike v številu celic pri nobenem tretmaju (slika 21, preglednica 10).

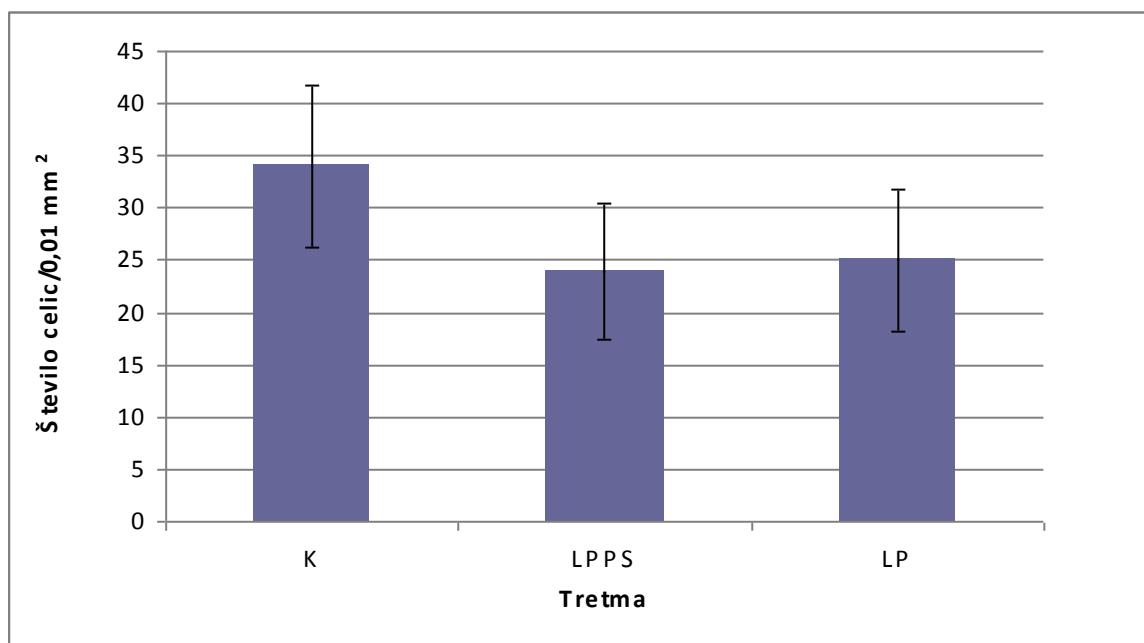


Slika 19: Števila celic na določeno površino MDC2 celične kulture za K, LPPS in LP. Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.

Preglednica 8: Stopnje statistične značilnosti sprememb števila celic na določeno površino MDC2 celične kulture.

Tretma	p
K-LPPS	0,010*
K-LP	0,002*

Opomba: Značilna razlika ($p < 0,05$) je označena z *.

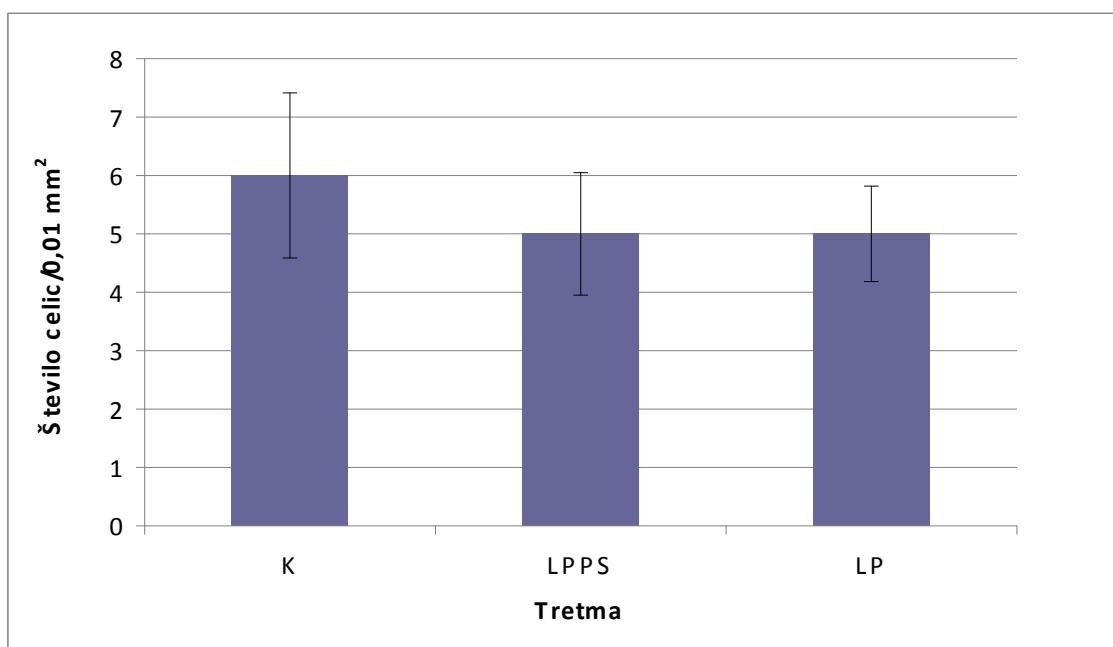


Slika 20: Število celic na določeno površino RT4 celične kulture za K, LPPS in LP. Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.

Preglednica 9: Stopnje statistične značilnosti sprememb števila celic na določeno površino RT4 celične kulture.

Tretma	p
K-LPPS	0,042*
K-LP	0,041*

Opomba: Značilna razlika ($p < 0,05$) je označena z *.



Slika 21: Število celic na določeno površino HaCaT celične kulture za K, LPPS in LP tretmajih. Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.

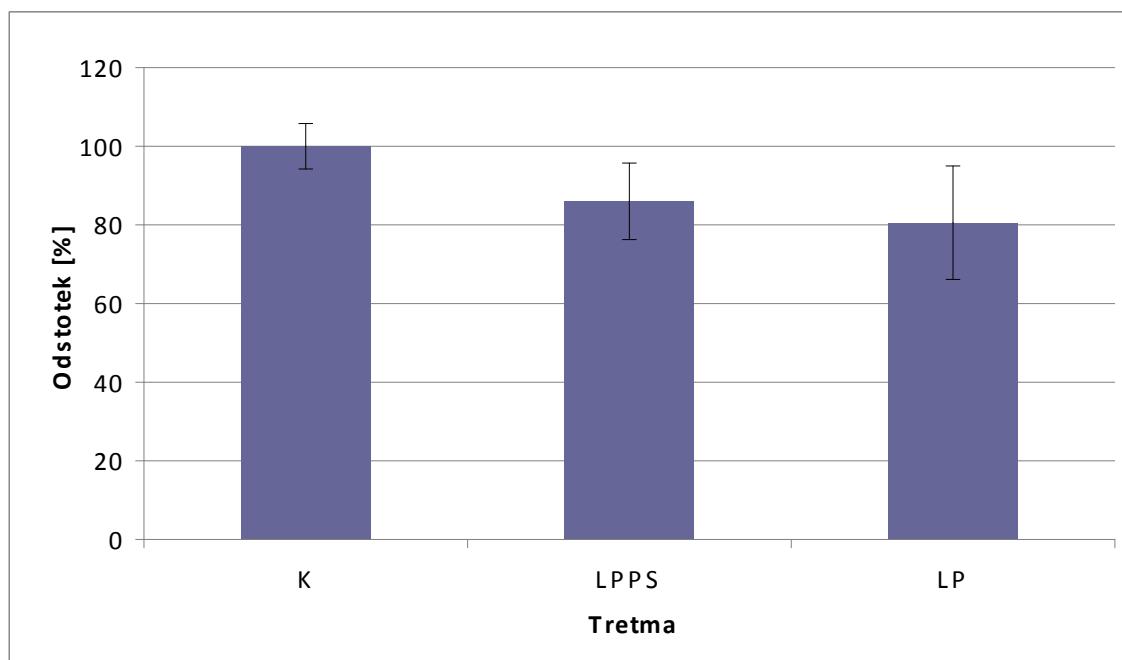
Preglednica 10: Stopnje statistične značilnosti sprememb števila celic na določeno površino HaCaT celične kulture.

Tretma	p
K-LPPS	0,066
K-LP	0,347

4.4 DISPAZNI TEST

Z dispaznim testom smo preverjali trdnost medceličnih stikov. Izračunali smo odstotek posameznih celic po tretmaju z LPPS in LP glede na kontrolni tretma.

Pri RT4, MDC2 in HaCaT celičnih kulturah tretiranje s tremi različnimi koncentracijami holesterola ni statistično značilno spremenilo odstotka posameznih celic v primerjavi s kontrolnim medijem (slika 22, 23, 24, preglednica 11, 12, 13).

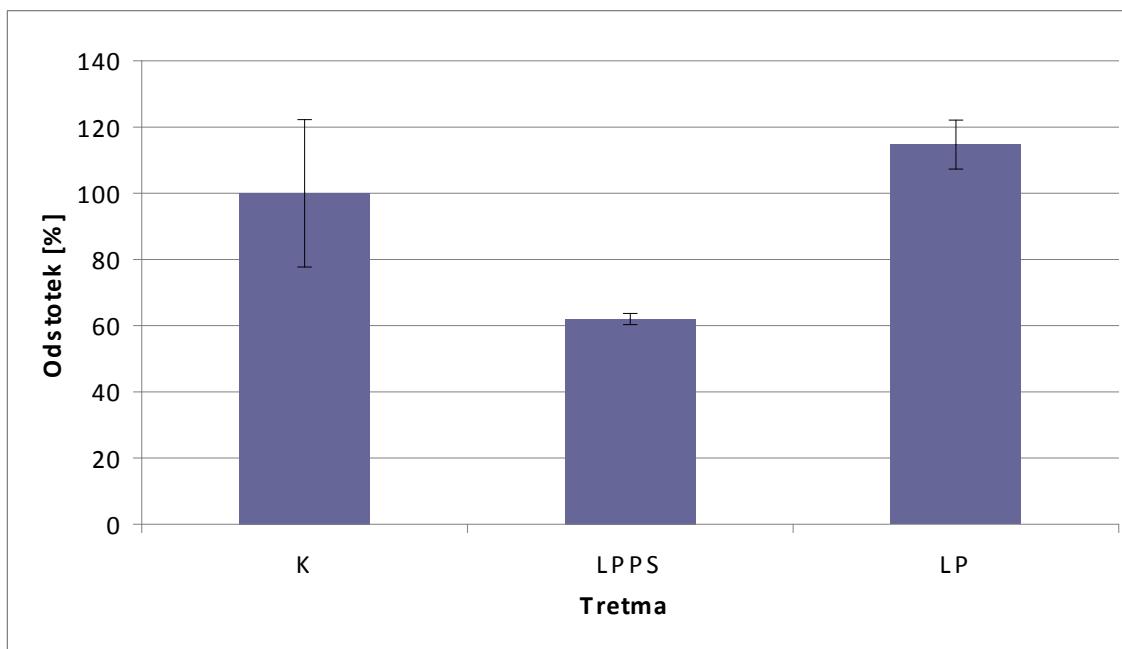


Slika 22: Odstotek posameznih celic MDC2 celične kulture pri LPPS in LP glede na kontrolni tretma.

Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.

Preglednica 11: Stopnje statistične značilnosti sprememb števila posamičnih celic pri MDC2 celični kulturi.

Tretma	p
K-LPPS	0,117
K-LP	0,121

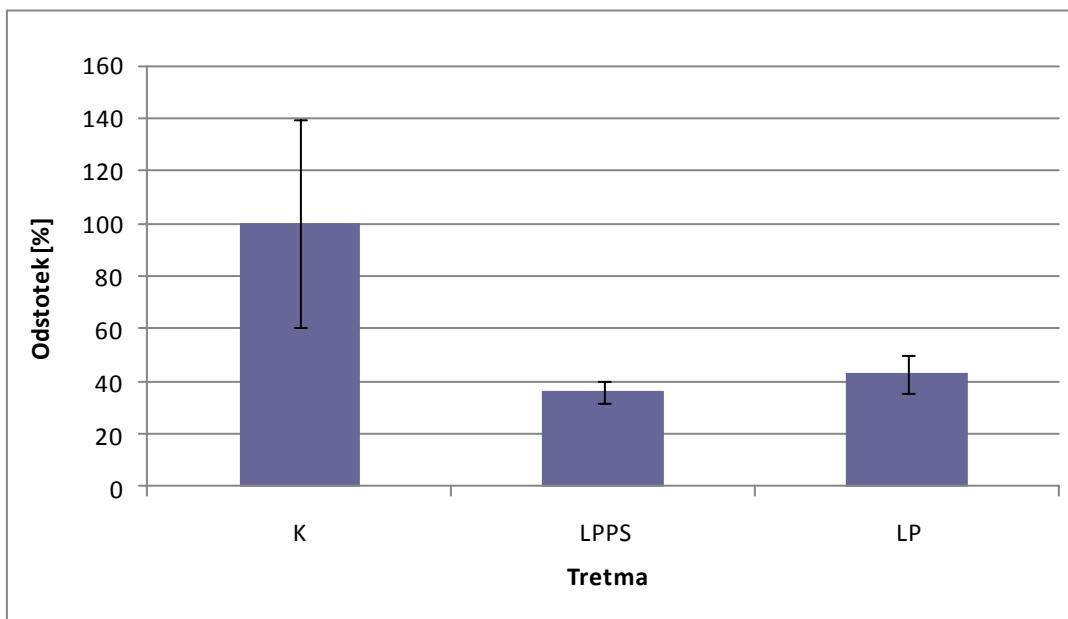


Slika 23: Odstotek posameznih celic RT4 celične kulture pri LPPS in LP glede na kontrolni tretma.

Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.

Preglednica 12: Stopnje statistične značilnosti sprememb števila posamičnih celic pri RT4 celični kulturi.

Tretma	p
K-LPPS	0,096
K-LP	0,430



Slika 24: Odstotek posameznih celic HaCaT celične kulture pri LPPS in LDL glede na kontrolni tretma.

Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.

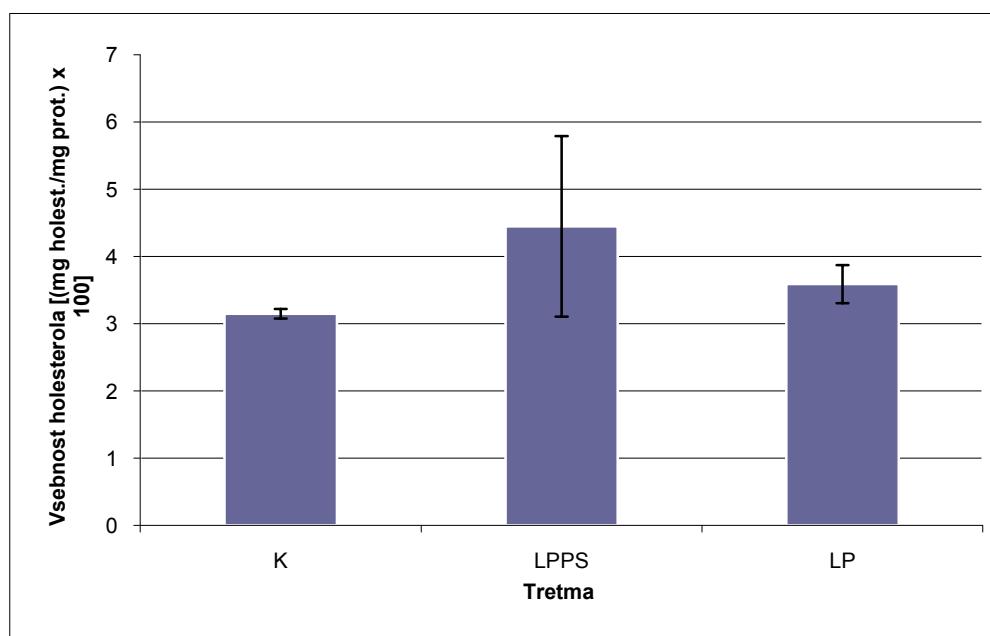
Preglednica 13: Stopnje statistične značilnosti sprememb števila posamičnih celic pri HaCaT celični kulturi.

Tretma	p
K-LPPS	0,111
K-LP	0,157

4.5 VSEBNOST HOLESTEROLA

Izmerili smo vsebnost holesterola po 24 urni inkubaciji v treh različnih tretmajih. Rezultati so prikazani kot [(mg holest./mg prot.) x 100] za vsak posamezen tretma (K, LPPS in LP) pri treh celičnih kulturah.

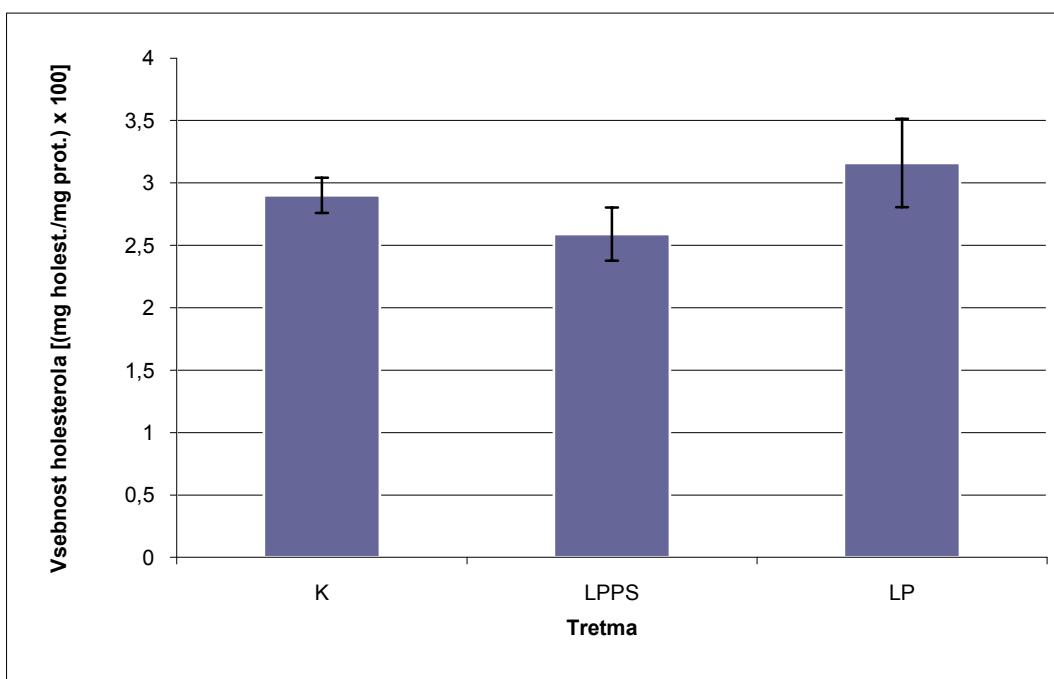
Pri merjenju holesterola za RT4, MDC2 in HaCaT celične kulture ni prišlo do statistično značilnih razlik v vsebnosti holesterola po 24 urah inkubiranja v različnih tretmajih (slika 25, 26, 27; preglednica 14, 15, 16).



Slika 25: Vsebnost holesterola v posameznih tretmajih za MDC2 celično kulturo. Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.

Preglednica 14: Stopnje statistične značilnosti sprememb vsebnosti holesterola pri MDC2 celični kulturi.

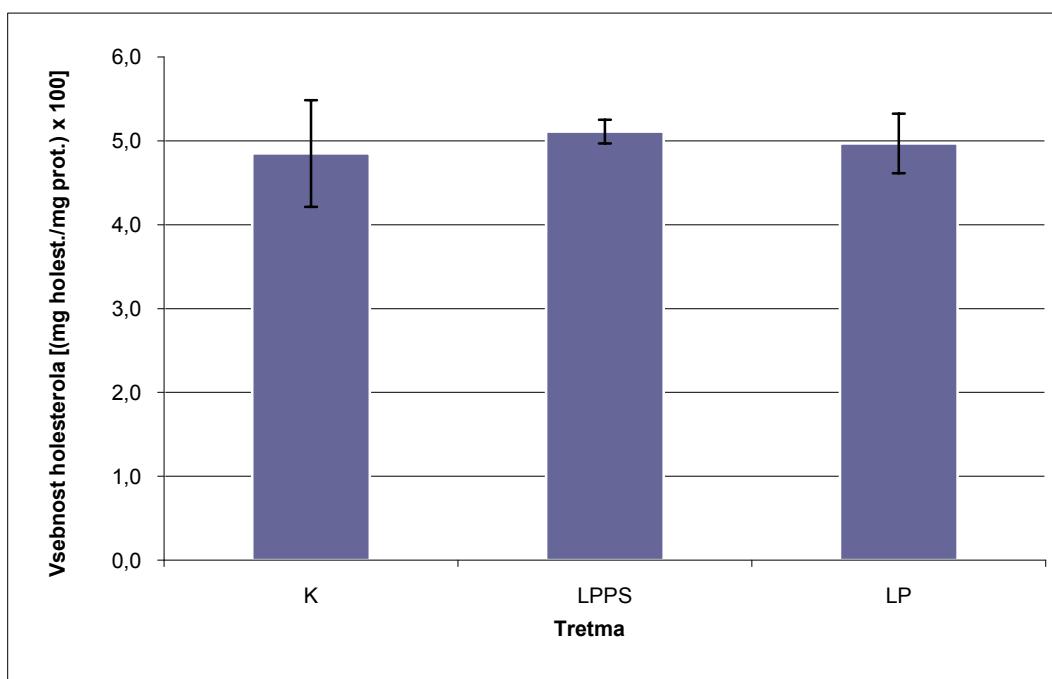
Tretma	p
K-LPPS	0,401
K-LP	0,251



Slika 26: Vsebnost holesterola v posameznih tretmajih za RT4 celično kulturo. Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.

Preglednica 15: Stopnje statistične značilnosti sprememb vsebnosti holesterola pri RT4 celični kulturi.

Tretma	p
K-LPPS	0,210
K-LP	0,492



Slika 27: Vsebnost holesterola v posameznih tretmajih za HaCaT celično kulturo. Variabilnost je prikazana kot standardna deviacija.

Preglednica 16: Stopnje statistične značilnosti sprememb vsebnosti holesterola pri HaCaT celični kulturi.

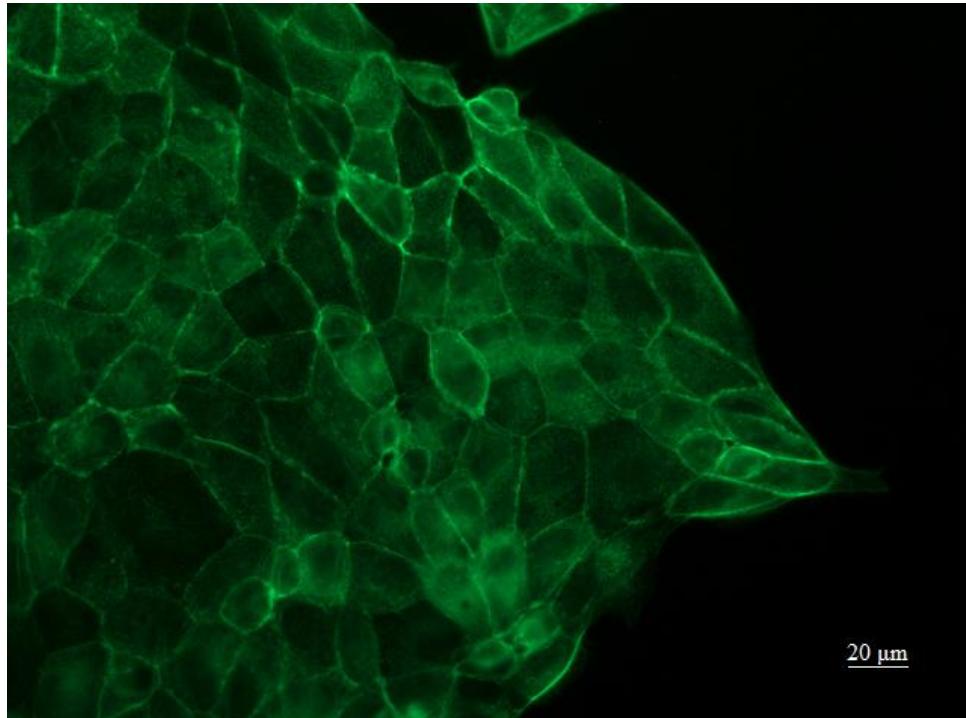
Tretma	p
K-LPPS	0,677
K-LP	0,868

4.6 MORFOLOGIJA CELIC

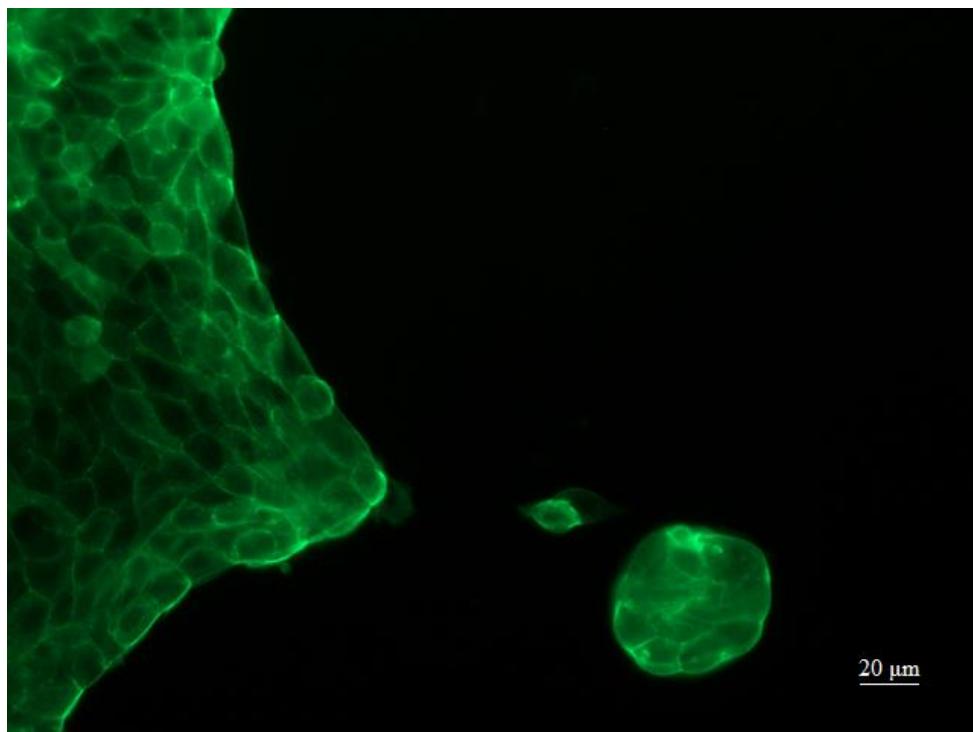
4.6.1 Razporeditev aktina

Pri MDC2 celični kulturi smo opazili, da so celice, tretirane z LP medijem, bolj sploščene in večje, v primerjavi s celicami v K in LPPS tretmaju (slika 28, 29, 30).

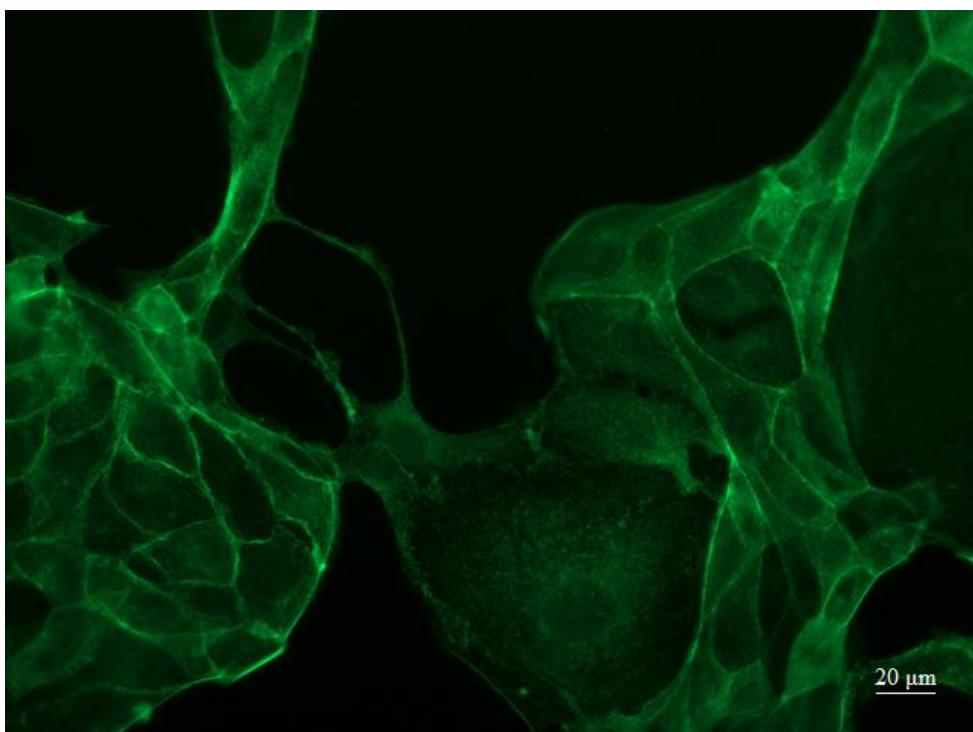
Pri RT4 in HaCaT celični kulturi ni bilo opaziti razlik v razporeditvi aktina in velikosti celic med posameznimi tretmaji (slika 31, 32, 33, 34, 35, 36).



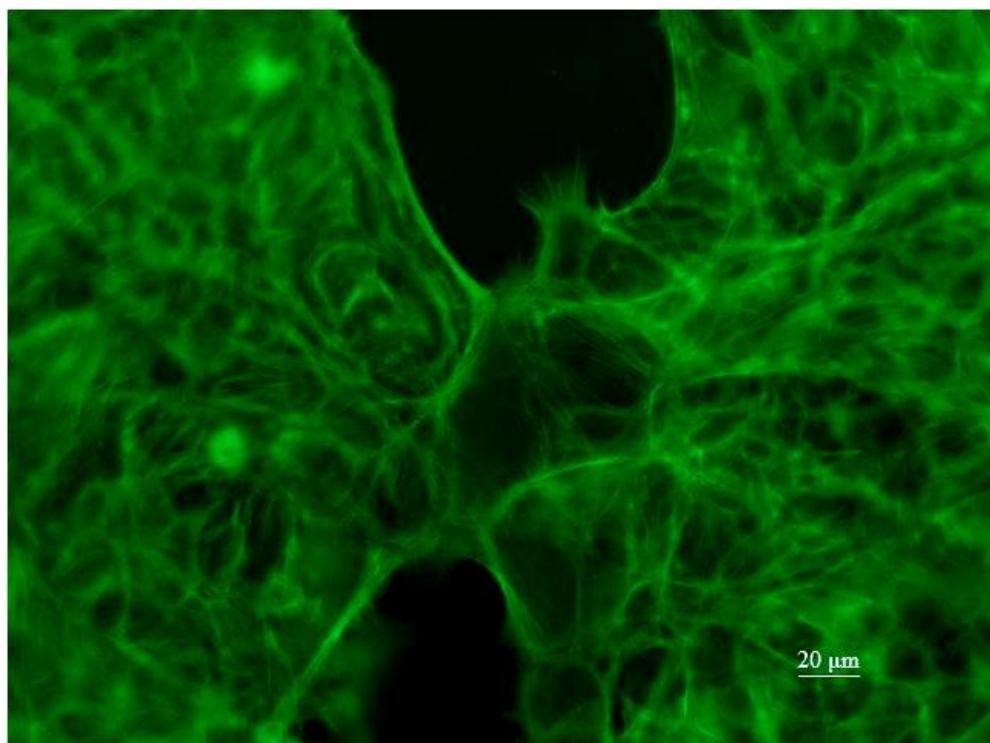
Slika 28: Razporeditev aktina pri MDC2 celicah, tretiranih s kontrolnim medijem.



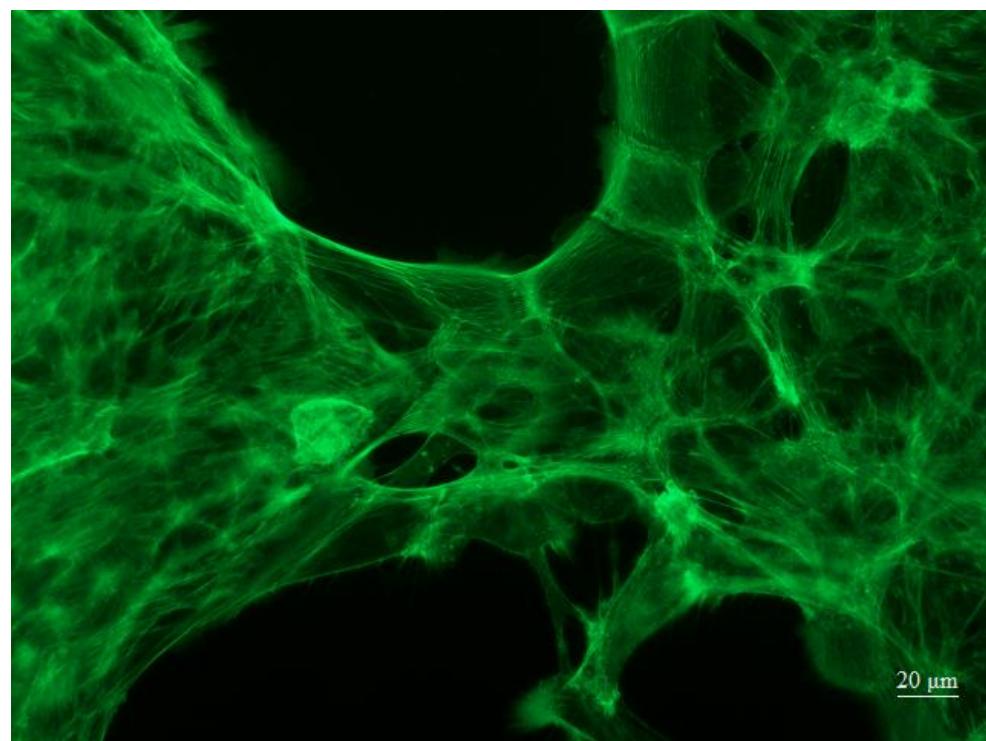
Slika 29: Razporeditev aktina pri MDC2 celicah, tretiranih z LPPS.



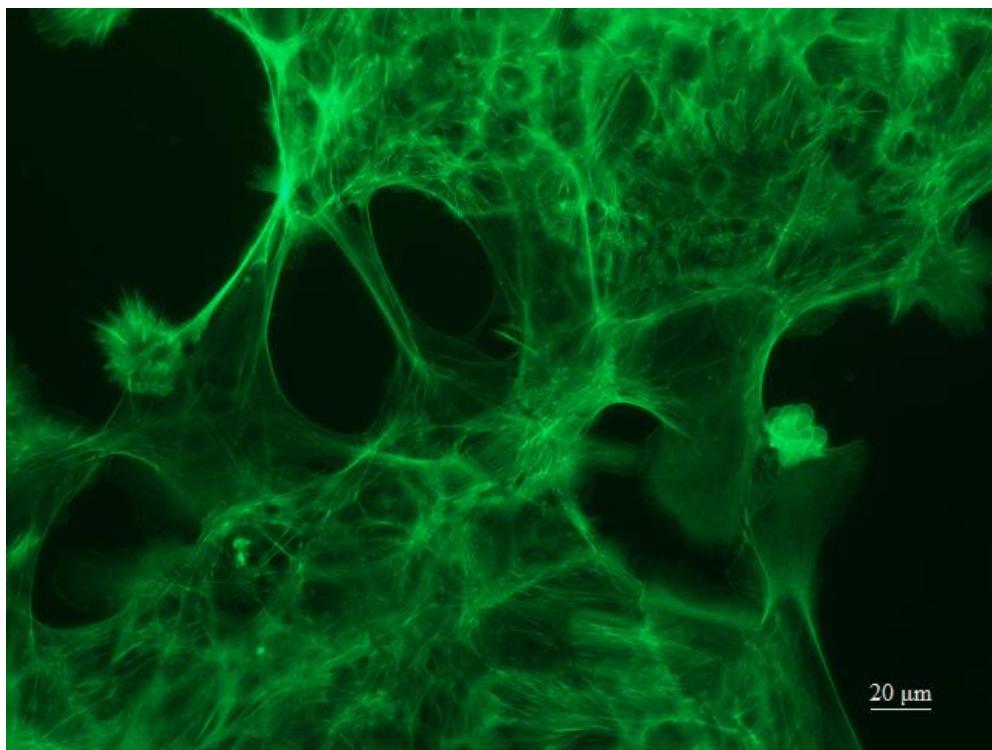
Slika 30: Razporeditev aktina pri MDC2 celicah, tretiranih z LP.



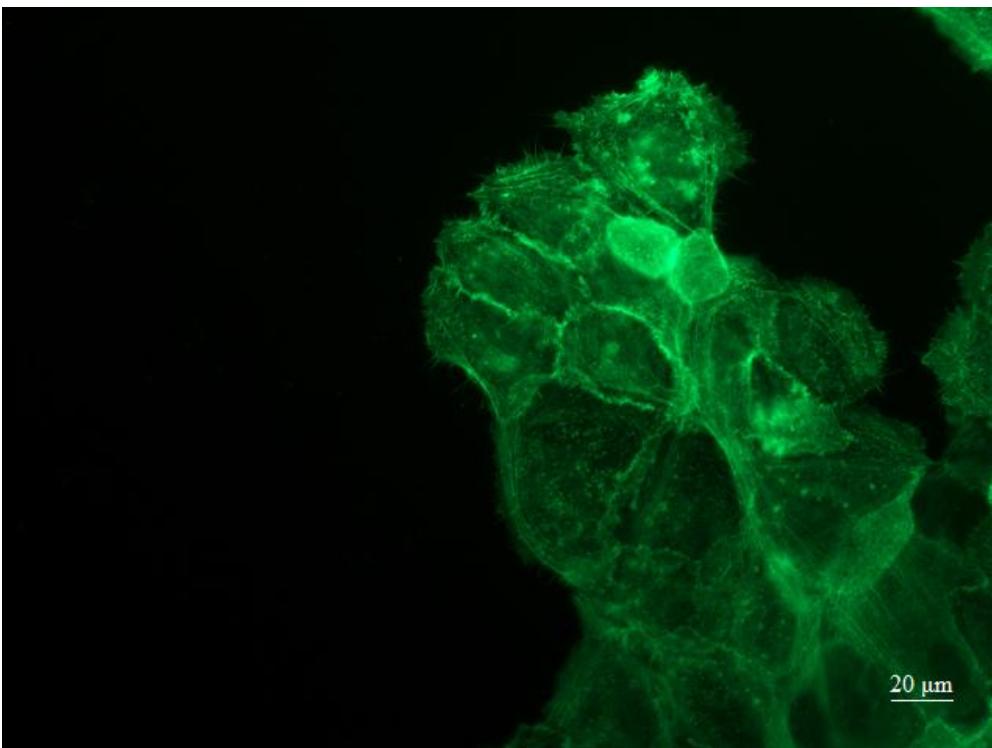
Slika 31: Razporeditev aktina pri RT4 celicah, tretiranih s kontrolnim medijem.



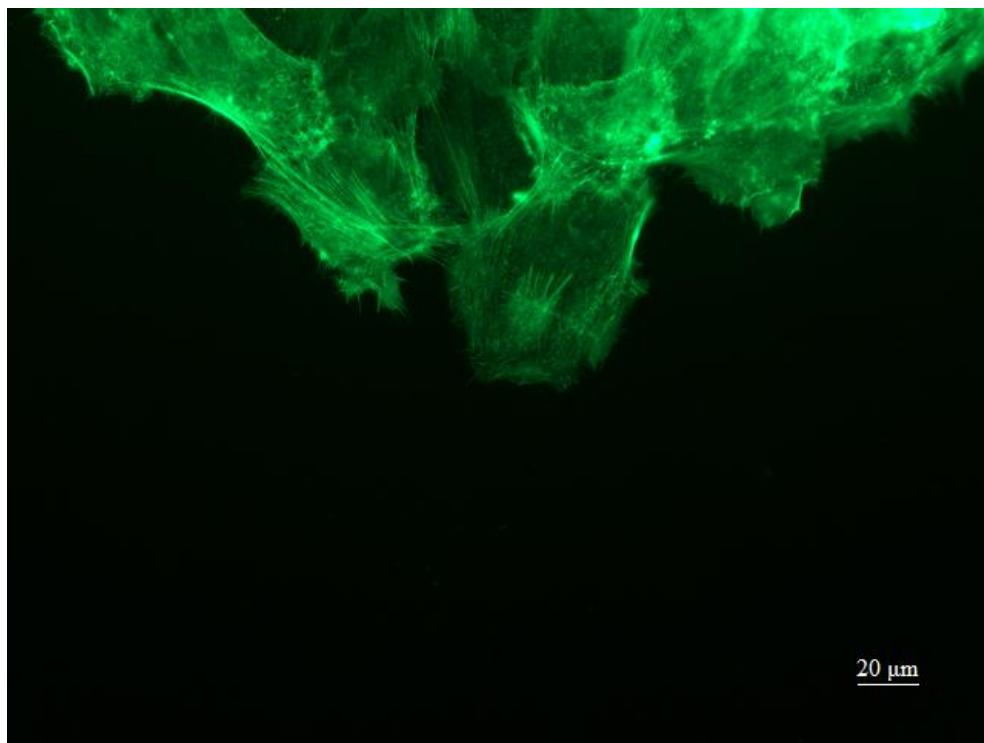
Slika 32: Razporeditev aktina pri RT4 celicah, tretiranih z LPPS.



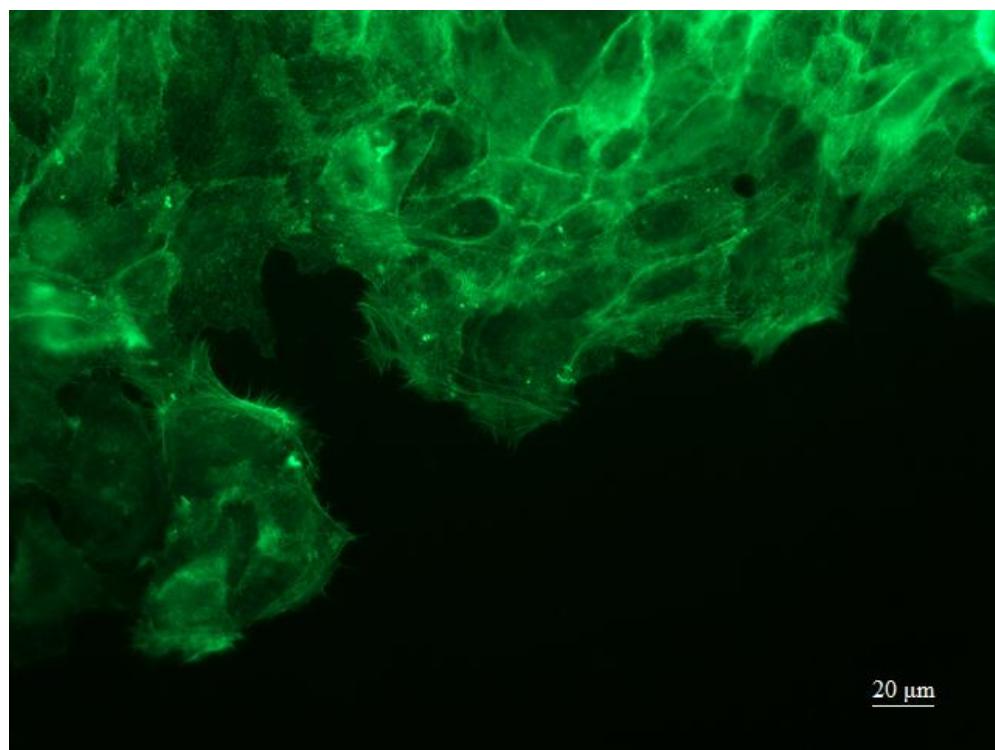
Slika 33: Razporeditev aktina pri RT4 celicah, tretiranih z LP.



Slika 34: Razporeditev aktina pri HaCaT celicah, tretiranih s kontrolnim medijem.



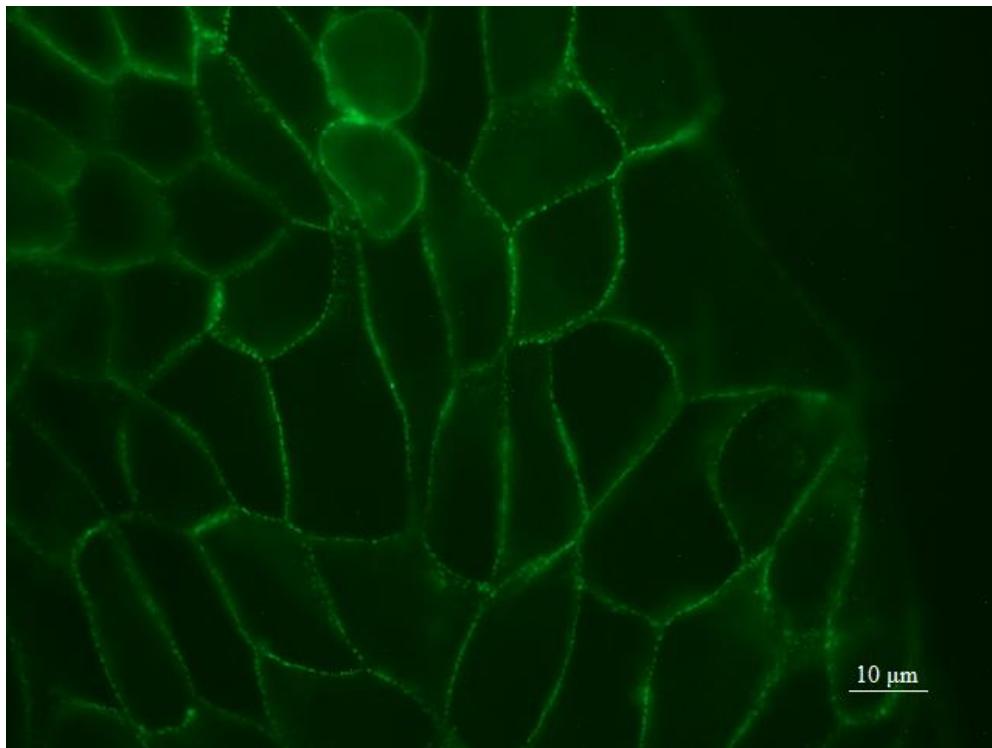
Slika 35: Razporeditev aktina pri HaCaT celicah, tretiranih z LPPS.



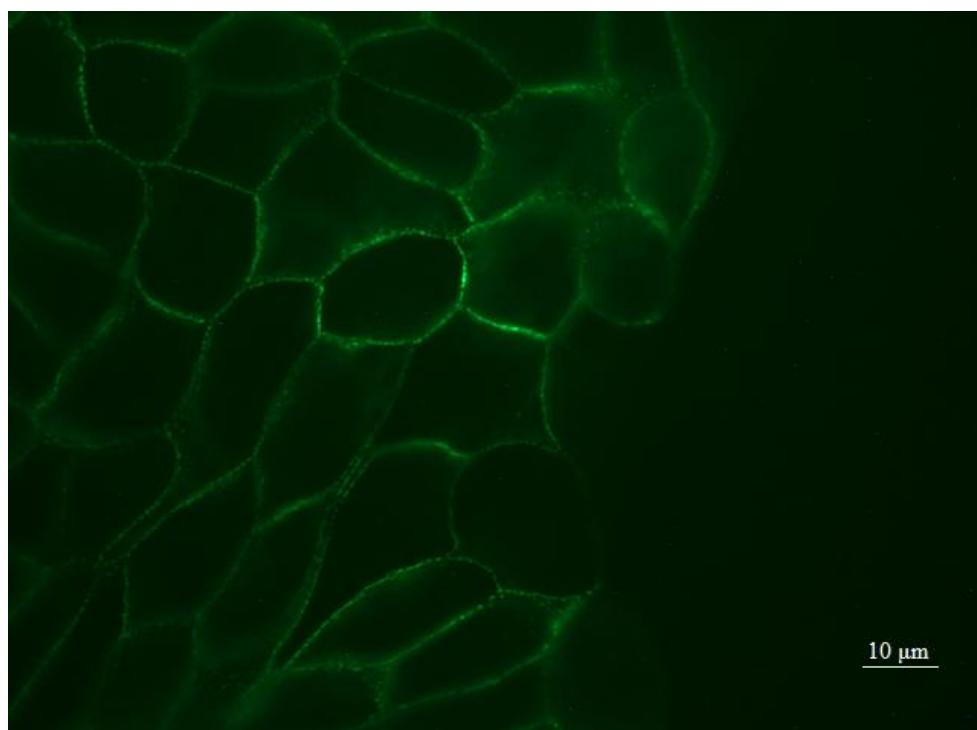
Slika 36: Razporeditev aktina pri HaCaT celicah, tretiranih z LP.

4.6.2 Razporeditev dezmosome

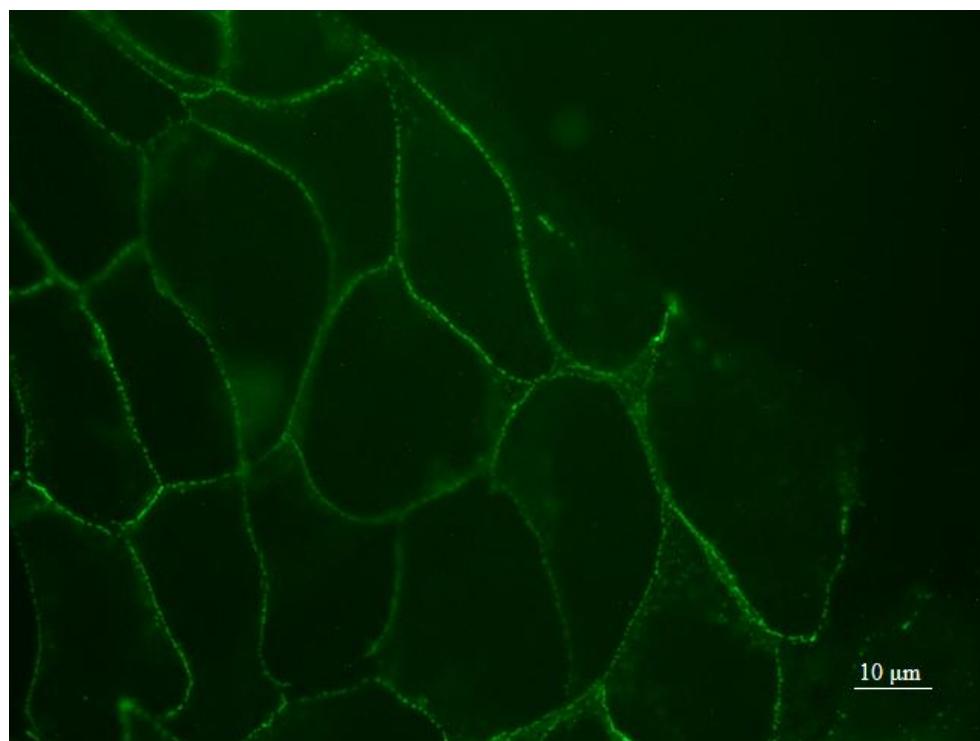
Pri MDC2 celični kulturi, tretirani z LP medijem so celice vsebovale točkovno organiziran desmokolin-YFP, kar označuje dezmosome. Razporeditev označbe se pri nobenem od tretmajev ni razlikovala (slike 37, 38, 39).



Slika 37: Razporeditev dezmosome pri MDC2 celicah, tretiranih s kontrolnim medijem.



Slika 38: Razporeditev dezumokolina pri MDC2 celicah, tretiranih z LPPS.



Slika 39: Razporeditev dezumokolina pri MDC2 celicah, tretiranih z LP.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Pomen holesterola na zaraščanje poškodbe tkiva so v dosedanjih študijah proučevali predvsem s pomočjo kemijskega prenašalca holesterola ciklodekstrina (Corvera in sod., 2000; Sun in sod., 2007) in inhibitorjev sinteze holesterola – statinov (Guíjarro in sod., 1998; Jakobisiak in Golab, 2003; Lamprecht in sod., 1999; Wang in Macaulay, 2003; Wong in sod., 2001). V naših raziskavah nas je zanimalo, kako na zaraščanje poškodbe vplivajo različne koncentracije holesterola v epitelijih, ki se razlikujejo po sposobnosti sprejemanja holesterola iz serumskih prenašalcev – LDL delcev.

Izkazalo se je, da so MDC2 celice med celičnimi kulturami, ki smo jih proučevali, najbolj odzivne na spremembe koncentracije LDL. Na povišano koncentracijo holesterola so se celice odzivale s hitrejšim preraščanjem postrgane površine in z večjim iztezanjem. Po 48 urah inkubiranja celičnih kultur s trikratno koncentracijo holesterola (tretma LP) so celice MDC2 celične kulture statistično značilno hitreje preraščale postrgano površino v primerjavi s celicami v kontrolnem mediju. Pri RT4 celični kulturi so celice prav tako preraščale postrgano površino statistično značilno hitreje, vendar v manjši meri kot pri MDC2. HaCaT celična kultura se na večjo koncentracijo holesterola v LP mediju ni odzivala s statistično značilno drugačno hitrostjo preraščanja postrgane površine v primerjavi s kontrolnim medijem.

Pri tretiraju MDC2 celične kulture z LPPS medijem se je število celic med 24 in 48 urami gojenja značilno manj povečalo v primerjavi s kontrolnim tretmajem, pri katerem je bila razlika v številu celic med 24 in 48 urami gojenja celic statistično značilna. Iz tega lahko sklepamo, da se v mediju z LPPS MDC2 celice počasneje delijo, morda zaradi potrebe po večji lastni sintezi holesterola.

Rezultati morfološke analize celic so pokazali, da so se pri MDC2 celični kulturi, tretirani z LP, celice sploščile in iztezale predvsem v postrgano področje. Štetje celic na določeno površinsko enoto je potrdilo takšno povečanje površine, ki jo prekriva posamezna celica.

Pokazalo se je namreč, da je bilo število celic na določeno površino manjše kot v kontrolnih pogojih.

Rezultati hitrejšega preraščanja postrgane površine, proučevanja namnoževanja celic in morfološke analize celic na določeno površino pri naših raziskavah epitelijskih celic MDC2 se skladajo z raziskavami Dobreva in sod. (2005), ki so ugotovili, da LDL pospeši raztezanje fibroblastov in tvorbo lamelipodijev in posledično hitrejše celjenje poškodbe. Prav tako so ugotovili, da LDL s povečanjem sinteze interlevkina-8 pospeši delitve celic, raztezanje in gibanje celic.

Pri RT4 celični kulturi, tretirani z LP medijem, je bila hitrost preraščanja postrgane površine statistično značilno večja, vendar pa v primerjavi z MDC2 celično kulturo precej manjša. Rezultati analize števila celic na določeno površino so pokazali, da je bilo število celic na površinsko enoto pri LP tretmaju statistično značilno manjše. Iz tega lahko sklepamo, da je sprememba koncentracije holesterola v mediju vzpodbudila iztezanje RT4 celic in zaradi tega omogočila hitrejše preraščanje poškodbe, kar je skladno z raziskavami Dobreva in sod. (2005).

HaCaT celična kultura se ni odzvala na spremembe v koncentraciji holesterola v mediju s spremenjeno hitrostjo preraščanja postrgane površine. Prav tako namnožitev celic po 48 urah gojenja v LPPS tretmaju in sprememba v številu celic na določeno površino ni značilno odstopala od rezultatov v kontrolnih pogojih. Iz teh rezultatov je razvidno, da se HaCaT celična kultura najmanj odziva na spremembe v koncentraciji zunajceličnega holesterola v primerjavi z ostalima proučevanimi kulturama (MDC2 in RT4).

Iz podatkov iz literature lahko sklepamo da je večja odzivnosti MDC2 celic na spremembe holesterola posledica večje sposobnosti endocitoze LDL delcev v primerjavi z RT4 in HaCaT celicami. Znano je, da imajo celice urotelija sečnega mehurja odrasle miši zelo nizko endocitotsko aktivnost (Romih in Jezernik, 1994). Tudi Kreft in sod. (2008) so ugotovili, da je endocitoza pri MDC2 celicah 5-15x večja kot pri urotelijskih celicah. Resnik (2006) je v raziskavah ugotovila, da se dezmplakini v urotelijskih celicah RT4 internalizirajo 10x počasneje v primerjavi z MDCK celicami in to povezala z manjšo

sposobnostjo endocitiranja v RT4 celicah. Urotelij opravlja funkcijo krvno-urinske bariere, zato je za te celice pomembna manjša izmenjava snovi z okoljem. Kaže, da RT4 celice tudi v kulturi ohranijo to lastnost zmanjšane endocitotske aktivnosti.

Pri HaCaT celični kulturi nismo opazili nobene statistično značilne spremembe tako pri preraščanju postrgane površine, obliku celic, frekvenci delitev celic, razporeditvi aktinskega citoskeleta kot tudi trdnosti medceličnih stikov. Pokazalo se je, da se HaCaT celice ne odzivajo na spremembo količine zunajceličnega holesterola, kar je sicer značilnost diferenciranih keratinocitov. Keratinociti se od drugih tipov celic razlikujejo po bistveno večji neodvisnosti od zunanjega holesterola. Keratinociti imajo povišano sintezo holesterola. V primerjavi s kožnimi fibroblasti sintetizirajo 10x večjo količino holesterola (Ponec in sod., 1983). Na plazmalemi keratinocitov epidermisa se pojavlja znatno manj LDL receptorjev kot v drugih tipih celic. Zmanjšanje izražanja receptorjev za LDL je sorazmerno diferenciacijski stopnji keratinocitov, kar daje predvsem višjim plastem epidermisa večjo neodvisnost od serumskega (Williams, 1987). HaCaT celična linija, ki je glavni model za študijo lipidnega metabolizma, je v primerjavi z NHAK (normalni keratinociti odraslega človeka) manj diferencirana celična linija (Schrüer in sod., 1993). Kljub temu so naše raziskave pokazale, da še vedno odražajo to tkivno značilnost in so manj odzivne na spremembe v koncentraciji holesterola v mediju, v primerjavi z ostalima celičnima kulturama (MDC2 in RT4). Torej sklepamo, da je vzrok za manjšo odzivnost HaCaT celične kulture na spremembo koncentracije zunajceličnega holesterola v manjši sposobnosti endocitoze LDL zaradi manjšega izražanja LDL receptorjev.

Gojenje celic v mediju brez dodanega holesterola (LPPS) je pri MDC2 celični kulturi statistično značilno zmajšalo hitrost preraščanja postrgane površine, kar skupaj z visoko značilnim zmanjšanjem premora celic in upočasnjenou proliferacijo celic nakazuje na negativen učinek manjše zunajcelične koncentracije holesterola na regeneracijo poškodovanega epitelija. Predvidevamo, da so morale celice zaradi odsotnosti lipoproteinskih delcev iz seruma same sintetizirati holesterol, kar je upočasnilo proces regeneracije. Pri RT4 in HaCaT celični kulturi odvzem lipoproteinskih delcev iz medija ni statistično značilno spremenil hitrosti preraščanja postrgane površine.

Iz rezultatov poskusa merjenja vsebnosti holesterola pri spremembah zunajceličnega holesterola lahko sklepamo, da imajo epitelijske celice tudi v kulturi učinkovito regulacijo sinteze in sprejemanja holesterola, kar so na tkivih ugotovili že Brown in Goldstein (1985) ter Maxfield in Wüstner (2002). Če je v mediju dovolj holesterola, se zmanjša biosinteza holesterola *de novo* (Li in sod., 1991). Celice izven jeter, črevesja in kože pridobivajo večino holesterola iz plazme in ga le manjši delež sintetizirajo *de novo* (Akoh in sod., 2008). Pri kožnih keratinocitih, ki so manj odzivne na spremembe zunajceličnega holesterola, ostane sinteza znotrajceličnega holesterola nespremenjena kljub spremembji koncentracije holesterola v mediju (Ponec in sod., 1983).

Rezultati dispaznega testa so pokazali, da trdnost celičnih stikov ni bila pri nobeni od preučevanih celičnih kultur odvisna od koncentracije holesterola v mediju. Rezultat, ki je sicer v nasprotju z rezultati dobljenimi po odtegnitvi holesterola z metil- β -ciklodekstrinom, kaže da sama sprememba koncentracije holesterola v mediju ne vpliva na trdnost medceličnih stikov. Je pa ta rezultat v skladu z rezultati meritev holesterola v celicah gojenih v enakih pogojih, kjer prav tako nismo zaznali sprememb v koncentraciji holesterola.

Izkazalo se je, da povišana koncentracija holesterola v obliki LP delcev pospeši regeneracijo poškodovanega epitela. Ta učinek holesterola je večji pri celicah z večjo sposobnostjo sprejemanja holesterola po endocitotski poti (MDC2 celice) in ga ne opazimo v celični kulturi, kjer je sprejemanje zunanjega holesterola zavrto, kot se je pokazalo pri HaCaT celični kulturi.

5.2 SKLEPI

- medij LP s trikratno koncentracijo holesterola v primerjavi s kontrolnim medijem:
 - pospeši hitrost preraščanja poškodbe *in vitro* pri MDC2 in RT4 celični kulturi
 - vpliva na večje iztezanje celic MDC2 in RT4 celične kulture
 - ne vpliva na spremembo vsebnosti holesterola v celici
 - ne vpliva na trdnost medceličnih stikov
- brezholesterolni medij (LPPS) v primerjavi s kontrolnim medijem:
 - zmanjša hitrost preraščanja poškodbe pri MDC2 celični kulturi
 - zmanjša premer celic pri MDC2 celični kulturi
 - upočasni delitev celic pri MDC2 celični kulturi
 - ne vpliva na spremembo vsebnosti holesterola
 - ne vpliva na trdnost medceličnih stikov
- različni tipi celic različno reagirajo na dodatek / pomanjkanje holesterola skladno s funkcijo celic tkiva, iz katerega so bile izolirane
- epitelijske celice v kulturi imajo učinkovito regulacijo vsebnosti holesterola tudi v *in vitro* pogojih
- regeneracija poškodbe je odvisna od sposobnosti sprejemanja holesterola v obliki LP delcev

6 POVZETEK

Epitelijske poškodbe so najpogosteje poškodbe v telesu. Poznavanje mehanizma obnove poškodovanega tkiva in vloge udeleženih bioloških molekul nam omogoča pospešiti naravno regeneracijo. Zanimalo nas je, kako različne fiziološke vrednosti holesterola v mediju vplivajo na preraščanje poškodbe epitelija.

Holesterol je molekula z mnogimi funkcijami. Celice ga uporabljajo za sintezo celičnih membran, žolčnih kislin in steroidnih hormonov, ali pa ga skladiščijo v obliki kapljic holesterolnih estrov. Glavni celični poti pridobivanja holesterola sta sinteza holesterola *de novo* ter receptorsko posredovana endocitoza LDL delcev. Vsebnost holesterola mora biti natančno regulirana, saj holesterol vpliva na membranske mikrodomene (strukturo raftov), lastnosti membran (fazne prehode ter fluidnost/rigidnost) in je v povišanih koncentracijah glavni povzročitelj aterosklerotičnih plakov, kar lahko posledično privede do srčno-žilnih bolezni. Holesterol in lipidi niso homogeno razporejeni znotraj lipidnega dvosloja. S holesterolom in sfingolipidi obogatena področja (mikrodomene) plazemske membrane imenujemo splavi oz. membranski rafti.

Kot model za proučevanje regeneracije mehansko povzročene poškodbe epitelija *in vitro* smo uporabili tri različne celične kulture:

- MDC2 celična kultura, izolirano iz celic ledvičnega epitelija, za katere je značilna intenzivna endocitotska aktivnost.
- RT4 celična kultura, izolirano iz celic urotelija, za katere je značilna manjša sposobnost endocitoze.
- HaCaT celična kultura, izolirano iz celic kožnih keratinocitov, za katere je značilno manjše izražanje receptorjev za LDL in s tem neodvisnost od zunanjega holesterola.

Izkazalo se je, da imajo celice tudi v pogojih v kulturi učinkovito regulacijo sinteze in privzema holesterola. Ob spremembi koncentracije zunajceličnega holesterola se pri nobeni od uporabljenih celičnih kultur statistično značilno ni spremenila koncentracija

znotrajceličnega holesterola. Znano je da celice, ki imajo na razpolago zunajcelični holesterol v obliki LDL delcev, raje endocitirajo LDL delce in zaradi tega znižajo lastno sintezo holesterola.

Kljub konstantni koncentraciji holesterola v celicah se je pokazalo, da ima dodatek lipoproteinskih prenašalcev holesterola stimulativen vpliv na regeneracijo epitelijske poškodbe. Na dodatek LP medija so se najizraziteje odzvale MDC2 celice, ki so hitreje prerastle postrgano progo in se bolj iztezale v primerjavi z regeneracijo v kontrolnem mediju. RT4 celice, za katere predvidevamo nižjo sposobnost endocitoze LDL delcev, kar je značilno za urotelijske celice v tkivu, so ob dodatku LP medija prav tako hitreje preraščale progo, vendar v manjši meri kot MDC2 celice. V HaCaT celični liniji keratinocitov se celice niso odzivale na spremembe serumskega holesterola, kar nakazuje, da HaCaT celična linija ohrani tkivno značilno manjšo odvisnost od zunajceličnega holesterola.

Dodajanje holesterola v obliki LP delcev se je pokazalo kot uspešen stimulator regeneracije poškodovanega epitelija. Ta učinek je odvisen od sposobnosti celic za endocitotsko sprejemanje serumskih prenašalcev za holesterol.

7 VIRI

Acharya P., Beckel J., Ruiz WG., Wang E., Rojas R., Birder L., Apodaca G. 2004. Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium . *Am J Physiol Renal Physiol*, 287: 305-318.

Akoh C.C., Min D.B., 2008. Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology. 3rd edition. Taylor & Francis Group: 914.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. 1994. Molecular biology of cell. 3rd edition. Garland Publishing, Inc.: 1294.

Alcamo E., Krumhardt B. 2004. Anatomy and physiology the easy way. Second edition. Barron's Educational Series, Inc.: 528.

Anderson R.G.W., Jacobson K., 2002. A role lipid shells in targeting proteins to caveole, rafts and other lipid domains. *Science*, 296: 1821-1825.

Apodaca, G. 2001. Endocytic traffic in polarized epithelial cells: Role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic* 2:149-159.

Apodaca G., Katz LA., Mostov KE. 1994. Receptor-mediated transcytosis of IgA in MDCK cells is via apical recycling endosomes. *J Cell Biol*, 125: 67–86.

Bang B., Gniadecki R., Gajkowska B. 2005. Disruption of lipid rafts causes apoptotic cell death in HaCaT keratinocytes. *Experimental Dermatology*, 14 (4): 266-272.

de Boer W. I., Schuller A. G. P., Vermey M., van der Kwast T. H. 1994. Expression of Growth Factors and Receptors during Specific Phases in Regenerating Urothelium after Acute Injury in Vivo. *American Journal of Pathology*, 145: 1199-1207.

Boukamp P., Petrussevska T. R., Breitkreutz D., Hornung J., Markham Q., Fusenig E. N. 1988. Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line. *The Journal of Cell Biology*, 106: 761-771.

Brown S.M., Goldstein L.J. 1985. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Physiology of Medicine*, 41: 284-324.

Carlier M. F., Pantaloni D. 1997. Control of actin dynamics in cell motility. *J. Mol. Biol.*, 269: 459-467.

Candia O.A., Mia A., Yorio T. 1997. Evidence of basolateral water permeability regulation in amphibian urinary bladder. *Biology of the Cell*, 89: 331-339.

Corvera S., DiBonaventura C., Shpetner H. S. 2000. Cell confluence-dependent remodeling of endothelial membranes mediated by cholesterol. *J. Biol Chem*, 275: 31414-31421.

Dobreva I., Waeber G., James W. R., Widmann C. 2005. Interleukin-8 secretion by fibroblasts induced by low density lipoproteins is p38 MAPK-dependent and leads to cell spreading and wound closure. *The Journal of Biological Chemistry*, 281: 199-205.

Eroschenko V. P., di Fiore M. S. H. 2008. Di Fiore's atlas of histology with functional correlations. 11th edition. Lippincott Williams & Wilkins, 532.

Farquhar M. G., Palade G. E. 1963. Junctional complexes of various epithelia. *The Journa of Cell Biology*, 17: 375-412.

Fields B. N., Knipe D. M., Peter M. Howley P. M. 2007. Field's virology. 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins, 3177.

Forgacs G., Yook H. S., Janmey A. P., Jeong H., Burd G. C. 2004. Role of the cytoskeleton in signaling networks. *Journal of cell sciences*, 117: 2769-2775.

Gimpl G., Burger K., Fahrenholz F. 2002. A closer look at the cholesterol sensor. *Trends in Biochemical Sciences*, 27: 596-599.

Guhe C., Föllmann W. 1994. Growth and characterization of porcina urinary bladder epithelial cells *in vitro*. *Renal Physiology*, Vol. 266, 2: 298-308.

Guijjarro C., Blanco-Colio L. M., Ortego M., Alonso C., Ortiz A., Plaza J. J., Hernandez G., Egido J., 1998. 3-Hydroksy-3-methylglutaril coenzyme A reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ Res*, 83: 490-500.

Guy R.K., 2000. Inhibition of sonic hedgehog autoprocessing in cultured mammalian cells by sterol deprivation. *PNAS*, 97, 13: 7307-7312.

Hay E. D. 1995. An Overviw of Epithelio-Mesenchymal Transformation. *Acta Anatomica*, 154: 8-20.

Henrikson R. C., Kaye G. I., Mazurkiewicz. 1997. NMS Histology. 3rd edition. Lippincott Williams & Wilkins, 512.

Hicks. R.M. 1975. The mammalian urinary bladder: an accomodating organ. Biol. Rev., 50: 215–246.

Hobbs H. H., Leitersdorf E., Leffert C. C., Dennis R., Cryer D. R., Brown M. S., Goldstein J. L. 1989. Evidence for a Dominant Gene That Suppresses Hypercholesterolemia in a Family with Defective Low Density Lipoprotein Receptors. The American Society for Clinical Investigation, Inc., 84: 656-664.

Horton D. J., Goldstein L. J., Brown S. M. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. J. Clin. Invest., 109: 1125 – 1131.

Huang S., Ingber Donald. E. 1999. The structural and mechanical complexity of cell-growth control. Nature Cell Biology, 1: 131-138.

Jacinto A., Martinez-Arias A., Martin P., 2001. Mechanisms of epithelial fusion and repair. Nature Cell Biology.

Jacobisiak M., Golab J. 2003. Potencial antitumor effects of statins. International Journal of Oncology, 23: 1055-1069.

Jacobs D., Blackburn H., Higgins M. 1992. Report of the Conference on Low Blood Cholesterol: Mortality Associations. Circulation 86 (3): 1046–60.

Kerr J.B. 1999. Atlas of functional histology. Mosby: 402.

Kierszenbaum A. L. 2002. Histology and cell biology: an introduction to pathology. Mosby, Inc., 619.

Koss L. R. 1969. The asymmetric unit membrane of the epithelium of the urinary bladder of the rat. An electron microscopy study of a mechanism of epithelial maturation and function. Lab. Invest., 21: 154-168.

Kovač M., Strel J., Mišigoj-Duraković M. 2003. Telesna vadba in zdravje, znanstveni dokazi, stališca in priporocila. Ljubljana: Zveza društev športnih pedagogov Slovenije: Fakulteta za šport: Zavod za šport Slovenije: Zagreb: Kineziološka fakulteta.

Kreft ME., Hudoklin S., Sterle M. 2005a. Establishment and Characterization of Primary and Subsequent Subcultures of Normal Mouse Urothelial Cells. Folia Biologica, 51: 126-132.

Kreft ME. Sterle M., Veranič P., Jezernik K. 2005b. Urothelial injuries and the early wound healing response: tight junction and urothelial differentiation. *Histochem Cell Biol*, 125: 475-285.

Kreft ME., Jezernik K., Kreft M., Romih R. 2009a. Endocytotic activity of bladder superficial urothelial cells is inversely related to their differentiation stage. *Differentiation*, 77: 48-59.

Kreft ME., Jezernik K., Kreft M., Romih R. 2009b. Apical plasma membrane traffic in superficial cells of bladder urothelium. *Ann NY Acad Sci*, 1152: 18-29.

Lamprecht J., Wojcik C., Jakobisiak M., Stoehr M., Scjrorter D., Paweletz N. 1999. Lovastatin induces mitotic abnormalities in various cell lines. *Cell Biology International*, 23, 1: 51-60.

Li C., Stifani S., Schneider W.J., Poznansky M.J. 1991. Low Density Lipoprotein Receptors on Epithelial Cell (Madin-Darby Canine Kidney) Monolayers. *The Journal of Biological Chemistry*, 266: 9263-9270.

Lodish H., Berk A., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., Bretscher A., Ploegh H., Matsudaira P. 2008. Molecular cell biology. 6th edition. W. H. Freeman and Company: 973.

Marini A., Carulli G., Azzara A., Grassi B., Ambrogi F. 1989. Serum cholesterol and triglycerides in hematological malignancies. *Acta Haematol.*, 81 (2): 75–9.

Masters R. W. J., Hepburn J. P., Walker L., Highman J. W., Trejdosiewicz K. L., Povey S., Parkar M., Hill T. B., Riddle R. P., Franks M. L. 1986. Tissue Culture Model of Transitional Cell Carcinoma: Characterization of Twenty-two Human Urothelial Cell Lines. *Cancer Research*, 46: 3630-3636.

Maxfield F. R., Wüstner D. 2002. Intracellular cholesterol transport. *J Clin. Invest.*, 110: 891-898.

Mialhe A., Levacher G., Champelovier P., Martel V., Serres M., Knudsen K., Seigneurin D., 2000. Expression of E-, P-, N-cadherins and catenins in human bladder carcinoma cell lines. *The Journal of Urology*, 164: 826-835.

Nusrat A., Parkos C. A., Verkade P., Foley C. S., Liang T. W., Innis-Witehouse W., Eastburn K. K., Madara J. L. 2000. Tight junctions are membrane microdomains. *J Cell Sci*, 113: 1771-1781.

Ohvo-Rekilä H., Ramstedt B., Leppimäki P., Slotte J.P. 2002. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress in Lipid Research*, 41: 66-97.

Ozturk S. S., Hu W. S. 2006. Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies. Taylor & Francis Group, 755.

Pasdar M., Li Z., Chan H., 1995. Desmosome assembly and disassembly are regulated by reversible protein phosphorylation in cultured epithelial cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, 30(2): 108-121.

Ponec M., Ph. D., Havekes L., Ph. D., Kempenaar J., Vermeer B. J., M. D. 1983. Cultured Human Skin Fibroblasts and Keratinocytes: Differences in the Regulation of Cholesterol Synthesis. *The Journal of Investigative Dermatology*, 81: 125-13.

Resnik N. 2006. Usoda dezmosomov v procesu ločevanja in vzpostavljanja medceličnih povezav. Diplomsko delo. Biotehniška fakulteta. Univerza v Ljubljani.

Romih R., Veranič P., Jezernik K. 1999. Actin filaments during terminal differentiation of urothelial cells in the rat urinary bladder. *Histochem Cell Biol* 112: 375-380.

Rook A., Burns T. 2004. Rook's textbook of dermatology. Seventh edition. Blackwell Publishing, Inc.: 4568.

Rosdahl C. B., Mary T. Kowalski M. T. 2007. Textbook of basic nursing. 9th edition. Lippincott Williams & Wilkins, 1741.

Schürer N., Köhne A., Schliep V., Barlag K., Goerz G. 1993. Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes. *Experimental Dermatology*, 2: 179-185.

Shaw A. J. 1996. Epithelial cell culture: a practical approach. Oxford University Press, Inc., 218.

Simons K., Ehehalt R. 2002. Cholesterol, lipid rafts and disease. *J. Clin. Invest.*, 110: 597-603.

Simons K., Toomre D. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1: 31-39.

Southgate J., Hutton K.A.R., Thomas D.F.M., Trejosiewicz L.K. 1994. Normal human urothelial cells *in vitro*: proliferation and stratification. *Lab Investigation*, Vol. 71, 4: 583-593.

Sun M., Northup N., Marga F., Huber T., Byfield J. F., Levitan I., Forgacs G., 2007. The effect of cellular cholesterol on membrane – cytoskeleton adhesion. *Journal of Cell Science*, 120: 2223-2231.

Troyanovsky M. S., Troyanovsky B. R., Eshkind G. L., Krutovskikh A. V., Leube E. R., Franke W. W. 1994. Identification of the Plakoglobin-binding Domain in Desmoglein and Its Role in Plaque Assembly and Intermediate Filament Anchorage. *The Journal of Cell Biology*, 127: 151 – 160.

Taub M., Chuman L., Saier H. M., Jr., Sato G. Growth of Madin-Darby canine kidney epithelial cell (MDCK) line in hormone-supplemented serum-free medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 3338-3342.

Vance D.E., Vance J.E. 2008. Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. 5th edition. Elsevier Science B.V., 631.

Voet, D., Voet, J.G. 1995. Biochemistry. Second edition. John Wiley & Sons, Inc.

Wang W., Macaulay R. J. B. 2003. Cell-cycle gene expression in lovastatin-induced medulloblastoma apoptosis. *The Canadian Journal of Neurological Sciences*, 30: 394-357.

Williams M. L., Mommaas-Kienhuis A.-M., Rutherford S. L., Grayson S., Vermeer B. J., Elias P. M. 1987. Free sterol metabolism and low density lipoprotein receptor expression as differentiation markers of cultured human keratinocytes. *Journal of Cell Physiology*, 132: 428-440.

Windoffer R., Borchert-Stühlträger M., Leube R. E. 2002. Desmosomes: Interconnected calcium-dependent structures of remarkable stability with significant integral membrane protein turnover. *The Journal of Cell Science*, 115: 1717-1732.

Wolf G., 1999. The function of cholesterol in embryogenesis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 10: 188-192.

Wong W. W. L., Tan M. M., Xia Z., Dimitroulakos J., Minden M. M., Penn L. Z. 2001. Cervistatin triggers tumor-specific apoptosis with higher efficacy than lovastatin. *Clinical Cancer Research*, 7: 2067-2075.

Wu W. R., Manabe M., Yu J., Sun T. T. 1990. Large scale purification and immunolocalization of bovine uroplakins I, II, III. *The Journal of Biological Chemistry*, 265: 19170-19179.

Xu X., London E. 2000. The effect of sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation. *Biochemistry*, 39: 844-849.

Yin T., Green K. J. 2004. Regulation of desmosome assembly and adhesion. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 15: 665-677.

7.1 ELEKTRONSKI VIRI

<http://www.stiffneck.org/Images/Cell%20Plasma%20Membrane.jpg> (1)

www.cholesterol-and-health.org.uk/hdl-ldl.html (2)

www.cellbiol.net/cbe/illustrations.php (3)

www.labdepotinc.com/Product_Details~id~441~pi... (4)

www.dsms.net/hista/.../2005-03-14%20Lipidi%20v%20plazmi.doc (5)

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Petru Veraniču za vso pomoč, nasvete in usmerjanje pri nastajanju diplomskega dela.

Zahvaljujem se tudi Nataši Resnik za pomoč pri delu v laboratoriju in obdelavi podatkov.

Hvala tudi vsem ostalim zaposlenim na Inštitutu za biologijo celice za pomoč in prijaznost, še posebej Sabini Železnik in Sanji Čebraja za pomoč v laboratoriju.

Zahvaljujem se tudi recenzentki prof. dr. Jasni Štrus in predsednici komisije prof. dr. Kristini Sepčić za hiter in temeljit pregled diplomske naloge.

Posebno zahvalo pa namenjam mojima staršema Florjanu in Mileni Mavrič, ki sta mi omogočila študij in me ves čas spodbujala ter mojemu fantu za vso potrpljenje, podporo in pomoč pri oblikovanju naloge.