

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Tatjana ROBIČ

**MERITVE ZNOTRAJCELIČNE AKTIVNOSTI KALCIJA V
CELICAH SVEŽE IZOLIRANEGA EPITELA ČLOVEŠKE LEČE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**MEASUREMENTS OF INTRACELLULAR ACTIVITY OF CALCIUM
IN THE FRESH ISOLATED EPITHELIAL CELLS OF HUMAN
OCULAR LENS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek dodiplomskega študija biologije. Opravljeno je bilo v laboratorijih na oftalmološkem oddelku za raziskovalno delo na Očesni kliniki Kliničnega centra v Ljubljani in na katedri za Fiziologijo živali na Biotehniški fakulteti v Ljubljani.

Senat Biotehniške fakultete je za mentorja diplomskega dela imenoval doc. dr. Gregorja Zupančiča in za somentorja prof. dr. Marka Hawlino.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Kazimir Drašlar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Gregor Zupančič
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Marko Hawlina
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Oddelek za oftalmologijo

Član: doc. dr. Peter Stušek
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 23. 7. 2008

Diplomsko delo 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.

Tatjana Robič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 612.014:617.74(043.2)=163.6
KG acetilholin/aktivnost/epitel/fluorescenza/fura-2/kalcij/katarakta/očesna leča
AV ROBIČ, Tatjana
SA ZUPANČIČ, Gregor (mentor)/HAWLINA, Marko (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2008
IN MERITVE ZNOTRAJCELIČNE AKTIVNOSTI KALCIJA V CELICAH SVEŽE IZOLIRANEGA EPITELA ČLOVEŠKE LEČE
TD Diplomsko delo
OP XI, 55 str., 4 pregl., 36 sl., 32 vir.
IJ sl
JI sl/en

AI Namen raziskave je bil izdelati preparat epitela človeške leče in izvesti meritve znotrajcelične aktivnosti kalcija ($[Ca^{2+}]_i$) s fluorescentnim barvilkom fura-2. Uporabili smo sveže izolirane lečne kapsule, saj so na teh epitelne celice pritrjene kot v očesu in tudi celični stiki so ohranjeni. Vezava acetilholina (Ach) na muskarinske receptorje v plazemski membrani povzroči dvig $[Ca^{2+}]_i$ zaradi sproščanja Ca^{2+} iz znotrajceličnih zalog (predvsem ER). Te spremembe lahko opazujemo s fluorescentnim barvilkom fura-2, katerega ekscitacijski spekter se spreminja v odvisnosti od vezave Ca^{2+} . Ob povečanju $[Ca^{2+}]_i$ se poveča absorpcija in s tem ekscitacija pri valovni dolžini 340 nm pri 380 nm pa se le-ta istočasno zmanjša. Razmerje jakosti fluorescenc, izmerjenih ob izmenični ekscitaciji z obema valovnima dolžinama, se ustrezno dvigne z dvigom $[Ca^{2+}]_i$. Aplikacija ACh je povzročila povišanje razmerja od $0,248 \pm 0,121$ v mirovanju na $0,368 \pm 0,107$ ($n=10$). Ob aplikaciji ionomicina, ionofora za Ca^{2+} ione, v prisotnosti zunajceličnega Ca^{2+} je bila sprememba mnogo manjša ($0,286 \pm 0,104$, $n=9$), ne glede na njegovo koncentracijo. Zato nismo mogli uporabiti standardnega načina kalibracije fluorescence fura-2 v živih celicah. Vendarle smo ugotovili, da so sveže izolirane lečne kapsule primeren preparat za študij delovanja lečnih epitelnih celic in njihovega uravnavanja znotrajcelične aktivnosti kalcija.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
DC UDC 612.014:617.74(043.2)=163.6
CX acetylcholine/activity/epithelium/fluorescence/fura-2/calcium/cataract/ocular lens
AU ROBIČ, Tatjana
AA ZUPANČIČ, Gregor (supervisor)/HAWLINA, Marko (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2008
TI MEASUREMENTS OF INTRACELLULAR ACTIVITY OF CALCIUM IN THE FRESH ISOLATED EPITHELIAL CELLS OF HUMAN OCULAR LENS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 55 p., 4 tab., 36 fig., 32 ref.
LA sl
AL sl/en

AB The purpose of the investigation was to produce a preparation of human lens epithelium and make on it the measurements of the intracellular calcium activity ($[Ca^{2+}]_i$) using a fluorescent dye fura-2. We have used freshly isolated lens capsule cells, as these have all the connections to the basement membrane as well as to neighboring cells intact. The binding of acetylcholine (ACh) to muscarinic receptors in the plasma membrane causes a rise in $[Ca^{2+}]_i$ due to the release of Ca^{2+} from intracellular stores (mainly ER). These changes can be monitored with the fluorescent dye fura-2, whose excitation spectrum changes depending on Ca^{2+} binding. At the increase of $[Ca^{2+}]_i$ the absorption and with it also the excitation at 340 nm is increased, while it simultaneously decreases at 380 nm. The ratio of fluorescence intensity measured with alternating excitation with both wavelengths rises together with the rise in $[Ca^{2+}]_i$. The application of ACh caused the rise in the ratio from $0,248 \pm 0,121$ at rest to $0,368 \pm 0,107$ ($n=10$). The change was much smaller ($0,286 \pm 0,104$, $n=9$) with the application of ionomycin, a Ca^{2+} ionophore, in the presence of extracellular Ca^{2+} , regardless of the concentration of ionomycin. Therefore we could not use the standard way of calibrating the fura-2 fluorescence in live cells. Nevertheless we have found out that freshly isolated lens capsules are a suitable preparation for studying the functioning of lens epithelial cells and their intracellular calcium regulation.

KAZALO VSEBINE

| | |
|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| Ključna dokumentacijska informacija..... | III |
| Key words documentation..... | IV |
| Kazalo vsebine..... | V |
| Kazalo preglednic | VII |
| Kazalo slik | VIII |
| Okrajšave in simboli..... | X |
| | |
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 PREDSTAVITEV PROBLEMA..... | 2 |
| 1.2 DELOVNE HIPOTEZE | 2 |
| 1.3 CILJI..... | 2 |
| | |
| 2 PREGLED OBJAV | 3 |
| 2.1 OČESNA LEČA..... | 3 |
| 2.1.1 Embrionalni razvoj leče | 3 |
| 2.1.2 Epitel in njegove lastnosti | 6 |
| 2.1.2.1 Epitel je največji del transporta in metabolizma | 8 |
| 2.1.2.2 Električne lastnosti | 8 |
| 2.1.3 Lamelne celice in lastnosti leče | 9 |
| 2.1.3.1 Kristalini | 10 |
| 2.1.3.2 Tokovi v leči..... | 10 |
| 2.1.3.3 Oskrba jedra leče s kisikom..... | 11 |
| 2.1.3.4 Povezave med celicami – presledkovni stiki..... | 12 |
| 2.2 KATARAKTA ALI SIVA MRENA | 13 |
| 2.3 FLUORESCENCA IN MERITVE FLUORESCENCE | 15 |
| 2.4 FURA-2, ACETILHOLIN IN IONOMICIN..... | 17 |
| 2.4.1 Fluorescentni indikator kalcija – fura-2 | 17 |
| 2.4.2 Acetilholin | 19 |
| 2.4.3 Ionofor ionomicin | 20 |
| 2.5 AKTIVNOST IN KONCENTRACIJA RAZTOPIN | 21 |
| 2.6 RAZISKAVE NA LEČNEM EPITELU | 22 |
| 2.6.1 Načini priprave preparata lečnega epitela | 22 |
| 2.6.2 Meritve znotrajceličnega kalcija | 24 |
| 2.6.3 Ugotavljanje vloge mitohondrijev v epitelu | 27 |

| | | |
|--------------|---------------------------------------------------|----|
| 3 | MATERIAL IN METODE DELA | 28 |
| 3.1 | MATERIAL | 28 |
| 3.2 | METODE DELA | 29 |
| 3.2.1 | Priprava celic | 29 |
| 3.2.2 | Inkubacija in poskusi | 29 |
| 3.2.2.1 | Inkubacija s fluorescentnim barvilkom fura-2..... | 29 |
| 3.2.2.2 | Poskusi z aplikacijo ACh in ionomicina..... | 29 |
| 3.2.3 | Obdelava podatkov | 31 |
| 4 | REZULTATI | 32 |
| 4.1 | POSKUSI Z APLIKACIJO ACH IN IONOMICINA..... | 32 |
| 4.2 | POSPLOŠITEV REZULTATOV..... | 44 |
| 5 | RAZPRAVA IN SKLEPI | 46 |
| 5.1 | RAZPRAVA..... | 46 |
| 5.2 | SKLEPI..... | 49 |
| 5.3 | PREDLOGI ZA NADALJNJE RAZISKAVE | 50 |
| 6 | POVZETEK | 51 |
| 7 | VIRI | 53 |

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| pregl. 1: Sestava fiziološke raztopine s kalcijem..... | 28 |
| pregl. 2: Sestava fiziološke raztopine brez kalcija. | 28 |
| pregl. 3: Povprečne vrednosti vseh točk vseh preparatov: najmanjše in največje razmerje fluorescenc, višina odgovora, čas do največjega odgovora in čas celotnega odgovora. | 44 |
| pregl. 4: Povprečne vrednosti vseh točk vseh preparatov: najmanjše in največje razmerje fluorescenc ter fluorescanca celic kot odgovor na ionomicin..... | 45 |

KAZALO SLIK

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| sl. 1: Lega človeške očesne leče v očesnem zrku (levo) in izpreparirana leča (desno)..... | 1 |
| sl. 2: Povečan prikaz prereza sprednjega dela človeške očesne leče. Na zgornji površini je bazalna membrana (lečna kapsula), pod njo leži enoslojni epitel, spodaj so v skladih naložene lamelne celice. | 3 |
| sl. 3: Embrionalni razvoj očesne leče. | 4 |
| sl. 4: Preprosta skica odrasle očesne leče. | 5 |
| sl. 5: Prerez embrionalne leče. a) Z zelenim pravokotnikom so označene ekvatorialne epitelne celice, ki se izoblikujejo v lamelne celice, b) še večja povečava ekvatorialnih celic (Gilbert, 2008). | 6 |
| sl. 6: Prerez lamelnih celic. Dobro se vidi ogromna nagubana membranska površina (Lust). | 9 |
| sl. 7: Tokovi preko in okrog leče po Robinsonu in Patternu (Mathias in sod., 1997). | 10 |
| sl. 8: Primerjava med zdravo lečo (levo) in lečo s sivo mreno (desno). | 13 |
| sl. 9: Proces fluorescence (Wolska, 2001). | 15 |
| sl. 10: Absorpcijski in emisijski spekter (Wolska, 2001). | 15 |
| sl. 11: Sestava »fluorescentne kocke«. | 16 |
| sl. 12: Ekscitacijski spekter barvila fura-2 (Invitrogen, 2007). | 17 |
| sl. 13: Kemijska zgradba barvila fura-2..... | 19 |
| sl. 14: Kemijska formula acetilholina..... | 19 |
| sl. 15: Kemijska struktura ionofora ionomicina vezanega na Ca ²⁺ | 21 |
| sl. 16: Mikroskop Axiovert S 100 (Zeiss, 2008). | 30 |
| sl. 17: Menjalnik filtrov Sutter Lambda 10-2 (Sutter Instrument, 2008). | 30 |
| sl. 18: Fotografije poskusa 11 pri 340 nm in 380 nm (v sivini a) in b) ter v umetnih barvah c) in d)) pred aplikacijo ACh..... | 32 |
| sl. 19: Fotografije poskusa 3 pri 380 nm med aplikacijo ACh..... | 33 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| sl. 20: Fotografije poskusa 11 pri 340 nm med aplikacijo ACh. Čas je označen desno zgoraj v sekundah po aplikaciji ACh. | 34 |
| sl. 21: Fotografije poskusa 11 pri 380 nm med aplikacijo ACh. Čas je označen desno zgoraj v sekundah po aplikaciji ACh. | 35 |
| sl. 22: Fotografije razmerja valovnih dolžin 340 nm / 380 nm poskusa 11 med aplikacijo ACh. Čas je označen desno zgoraj v sekundah po aplikaciji ACh..... | 36 |
| sl. 23: Fluorescanca preparata ob ekscitaciji s 340 nm in 380 nm v eni točki preparata. .. | 37 |
| sl. 24: Razmerje fluorescenc pri poskusu 6 v več točkah na preparatu. Viden je vrh po dodatku ACh in spremembe po dodatku ionomicina. | 37 |
| sl. 25: Odgovori celic na aplikacijo ACh v različnih točkah poskusa 3. Različne celice odgovorijo z različnim zamikom po aplikaciji..... | 38 |
| sl. 26: Povprečno razmerje fluorescenc, SD in izračunane vrednosti poskusa 1..... | 39 |
| sl. 27: Povprečno razmerje fluorescenc, SD in izračunane vrednosti poskusa 2..... | 39 |
| sl. 28: Povprečno razmerje fluorescenc, SD in izračunane vrednosti poskusa 3..... | 40 |
| sl. 29: Povprečno razmerje fluorescenc, SD in izračunane vrednosti poskusa 4..... | 40 |
| sl. 30: Povprečno razmerje fluorescenc, SD in izračunane vrednosti poskusa 8..... | 41 |
| sl. 31: Povprečno razmerje fluorescenc, SD in izračunane vrednosti poskusa 9..... | 41 |
| sl. 32: Povprečno razmerje fluorescenc, SD in izračunane vrednosti poskusa 5..... | 42 |
| sl. 33: Povprečno razmerje fluorescenc, SD in izračunane vrednosti poskusa 6..... | 42 |
| sl. 34: Povprečno razmerje fluorescenc, SD in izračunane vrednosti poskusa 7..... | 43 |
| sl. 35: Povprečno razmerje fluorescenc, SD in izračunane vrednosti poskusa 10..... | 43 |
| sl. 36: Prikaz povprečja (m) vseh izbranih točk in izmerjenih vrednosti vseh poskusov... | 44 |

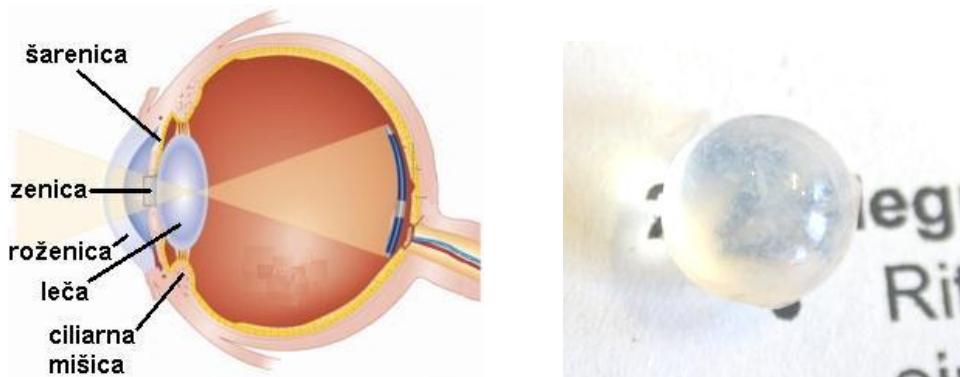
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| | |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| 3-NPA | 3-nitropropionična kislina |
| AAH | artificial aqueous humor – umeten vodni medij |
| ACh | acetilholin |
| AM | acetoksimetilni ester (barvila fura-2) |
| ARNC | Age-Related Nuclear Cataract – starostno pogojena jedrna katarakta |
| ATP | adenozin trifosfat |
| [Ca ²⁺] _i | znotrajcelična aktivnost / koncentracija kalcija |
| cADPR | ciklična ADP-riboza |
| CCCP | karboksil cianid m-kloro fenil hidrazon – mitohondrijski metabolni strup |
| CCD | hlajena kamera za snemanje |
| CCh | karbahol – nehidroliziran analog acetilholina |
| DMSO | dimetilsulfoksid – topilo |
| EDTA | etilen diamino tetraocetna kislina – helator kationov |
| EGTA | etilen glikol tetraocetna kislina – helator kationov |
| EMEM | Eagle´s minimalni esencielni medij |
| FCS | fetalni telečji serum |
| HBOT | Hyperbaric Oxygen Therapy – hiperbarična kisikova terapija |
| HBSS | Hank's buffered salt solution – Hank´s solna raztopina |
| HEPES | 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina – pufer |
| HRT | hormone replacement therapy – hormonska zamenjevalna terapija |
| i.u./ml | international units per milliliter – mednarodnih enot na mililiter |
| IP ₃ | inozitol trifosfat |
| ipd. | in podobno |
| mAChR | muskarinski acetilholinski receptor |
| MEM | minimalni esencielni medij |
| MD | mišična distrofija |
| nAChR | nikotinski acetilholinski receptor |
| NHLECs | Native Human Lens Epithelial Cells – sveže človeške leče epitelne celice |
| npr. | na primer |
| oz. | oziroma |
| PBS | fosfatizirana solna raztopina |
| PMA | 4-metoksiamfetamin – poživilo |
| pregl. | preglednica |
| pril. | priloga |
| SD | standard deviation – standardna deviacija |
| sl. | slika |
| str. | stran |

št. število
t. time – čas
t.i. tako imenovano

1 UVOD

Fiziološka funkcija leče v povezavi z roženico je usmerjanje slike na mrežnico. Da to zmore, mora biti leča kristalno čista, imeti mora visok lomni količnik in mora se prilagajati (spreminjati obliko, da usmeri svetlobo). To ji omogoča posebna kombinacija celičnih lastnosti.



Slika 1: Lega človeške očesne leče v očesnem zrku (levo) in izpreparirana leča (desno).

Odrasla leča vsebuje dve enostavno ločljivi, morfološko različni komponenti; epitel in maso lamelnih celic. Masa lamelnih celic daje leči funkcionalni fenotip – prosojnost. V primerjavi s temi je epitel metabolno bolj aktivna komponenta očesne leče. Ta enojni sloj celic deluje kot metabolni stroj, ki vzdržuje fiziološko zdravje leče in služi kot izvor prekurzorskih celic, iz katerih nastanejo z molekularno in morfološko diferenciacijo lamelne celice. Morfološka enostavnost, točno znan razvoj in lahek dostop so povod za številne raziskave na epitelu, ki iščejo odgovore na vprašanja o rasti celic, razvoju, epitelni vlogi, raku in staranju.

Obstajata dva pomembna pogleda na uporabnost lečnega epitelja:

1. Ne obstaja klinično prepoznavni rak očesne leče. Pomanjkanje ožilenosti v leči verjetno lahko pojasni odsotnost tumorjev v tem tkivu, saj rakovo tkivo za svoj razvoj nujno potrebuje preplet žil (onemogočena angiogeneza).
2. Lečni epitel človeka z morfološkega pogleda je prvič opazen že v 5. - 6. tednu gastrulacije. V tem morfološkem stadiju ostane kot sprednji epitel leče do konca življenja, kar je pomembno za preučevanje učinkov staranja na epitelno funkcijo.

Razvoj očesne leče doprinese veljaven vpogled v raziskave za razvojno biologijo. Pojasnitev mehanizmov, ki vodijo razvoj leče, so nam omogočili razumeti, kako se izoblikuje normalna leča in kako so vključeni razvojni procesi (celična delitev in

diferenciacija) pri vzdrževanju normalne zgradbe, funkcije in rasti preko celega življenja. To znanje je temeljno za naše razumevanje mnogih napak leče. Očesna leča je postala prav tako model za razumevanje razvojne biologije drugih kompleksnih organskih sistemov.

1.1 PREDSTAVITEV PROBLEMA

Katarakta ali siva mrena je eden pogostejših vzrokov slepote pri človeku. Pri njenem nastanku so ključnega pomena mehanizmi, ki uravnavajo delovanje celic leče – tako epitelnih kot tudi ostalih. Pri tem igra homeostaza znotrajcelične aktivnosti kalcija ($[Ca^{2+}]_i$) ključno vlogo, kar je bilo potrjeno že v mnogih raziskavah. Za študij različnih mehanizmov nastanka sive mrene pri človeku je nujno imeti na voljo preparat, ki to omogoča.

Namen diplomske naloge je izdelati čim boljši postopek priprave preparata celic človeškega lečnega epitela, primerrega za tovrstne poskuse in preizkusiti odzive $[Ca^{2+}]_i$ na aplikacijo znanih farmakoloških agonistov.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Kapsule, izolirane ob operaciji sive mrene, so lahko vir materiala za meritve $[Ca^{2+}]_i$ in študij vplivov farmakoloških dejavnikov.

Sveže izolirane celice epitela človeške leče se odzovejo s povišanjem $[Ca^{2+}]_i$ na aplikacijo farmakoloških dejavnikov kot je acetilholin, pri oblikovanju tega odgovora so pomembno udeleženi mitohondriji.

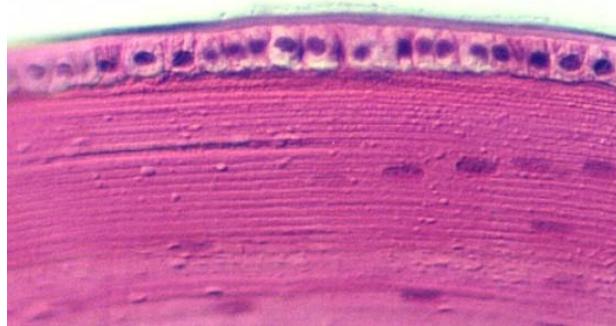
1.3 CILJI

- Izdelava protokola za pripravo preparata epitela človeške leče iz lečnih kapsul, ki so ostanek operacij sive mrene na Očesni kliniki Kliničnega centra Ljubljana.
- Meritve $[Ca^{2+}]_i$ s pomočjo sistema za dinamično slikanje kalcija in fluorescentnega barvila fura-2.
- Dodajanje agonistov svežemu preparatu lečnega epitela in primerjava odzivov glede na umerjene vrednosti z ionoforom ionomicinom.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OČESNA LEČA

Očesna leča je sestavljena iz mase skupaj stisnjениh lamelnih celic, ki so spredaj prekrite z epitelnim monoslojem pod svojo debelo basalno membrano, lečno kapsulo (McNulty in sod. 2004).

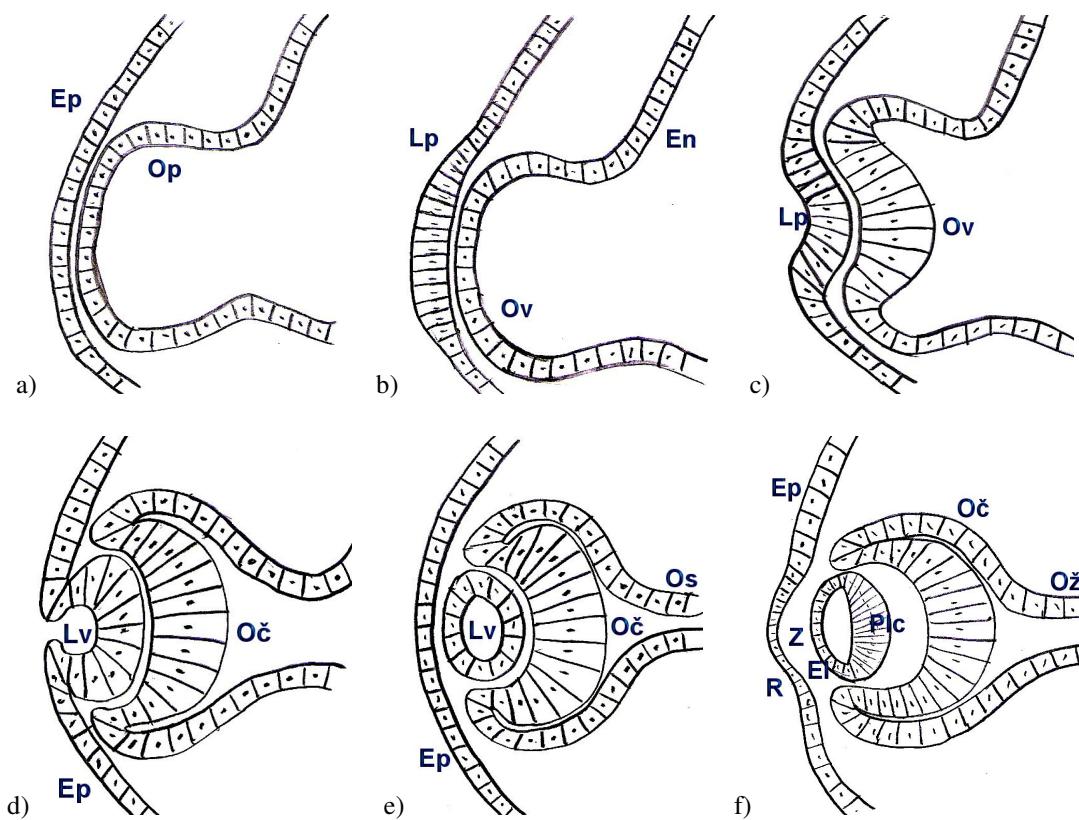


Slika 2: Povečan prikaz prereza sprednjega dela človeške očesne leče. Na zgornji površini je basalna membrana (lečna kapsula), pod njo leži enoslojni epitel, spodaj so v skladih naložene lamelne celice.

Je neožiljen organ, položen med vodeno tekočino spredaj in steklovino zadaj, v očesu. Celična struktura je simetrična glede na os v anteriorno-posteriorni smeri in asimetrična preko ravnine na njenem ekvatorju. Zaradi svoje nesimetričnosti so leči v preteklih obdobjih pripisovali, da skozi njo poteka transport snovi med vodnato tekočino in steklovino. Tako so posebej izolirali sprednjo in zadnjo stran leče ter izmerili tokove. V očesu pa ta dva dela seveda nista izolirana. Ko so celotno lečo merili z vibracijsko tehniko, so ugotovili, da je gostota tokov na površini presenetljivo velika, celo večja od prejšnjih meritev *in vitro*. Tokovi niso potekali direktno v anteriorno-posteriorni smeri, ampak kot krožni tokovi tudi v ekvatorialni smeri. Ti tokovi so najbolj dinamična fiziološka lastnost normalne očesne leče. Za to je odgovorna cela tovarna različnih Na^+/K^+ črpalk, ionskih kanalov in presledkovnih stikov (Mathias in sod, 1997).

2.1.1 Embrionalni razvoj leče

Nastanek prosojne leče je sklop morfoloških preoblikovanj, celičnih diferenciacij in razvoj iz enega samega celičnega tipa – površinskega (glavinega) ektoderma. To je del lečnega polja v razvijajočem se zarodku. Lečna morfogeneza se začne s pojavom odebilitve v vnaprej determiniranem področju, v bodoči lečni plakodi – točka, pod katero se stranska zasnova sprednjih možganov uviha, da izoblikuje optični vezikel. Zunanji ektoderm (lečna plakoda) se prav tako invaginira in odcepi v lečni vezikel (slika 3). Raziskave, narejene z izrezanim površinskim ektodermom in optičnim veziklom, so pokazale, da fizični kontakt med obema površinama ni potreben za izoblikovanje lečnega vezikla (Bhat, 2001).



Slika 3: Embrionalni razvoj očesne leče. a) Povezava optične plakode (Op) in površinskega ektoderma (Ep). b) Kontakt med nevralnim ektodermom (En) in optičnim veziklom (Ov). Pod vplivom optičnega vezikla se površinski ektoderm začne spreminjati v lečno plakodo (Lp). c) Lečna plakoda se prične uvhavati skupaj z optičnim veziklom. d) Lečna plakoda se izoblikuje v lečni vezikel (Lv), ki se odtrga od površinskega epitela. e) Uvihan optični vezikel izoblikuje dvoslojno optično čašo (Oč), ki ostane povezana z možgani preko optičnega steba (Os), ki se kasneje oblikuje v optični živec (Ož). f) Lečni vezikel inducira površinski ektoderm, da se izoblikuje v prozorno roženico (R), pod njo nastane zenica (Z). Sprednje celice lečnega vezikla se preoblikujejo v lečni epitel (El), zadnje pa v primarne lamelne celice (Plc).

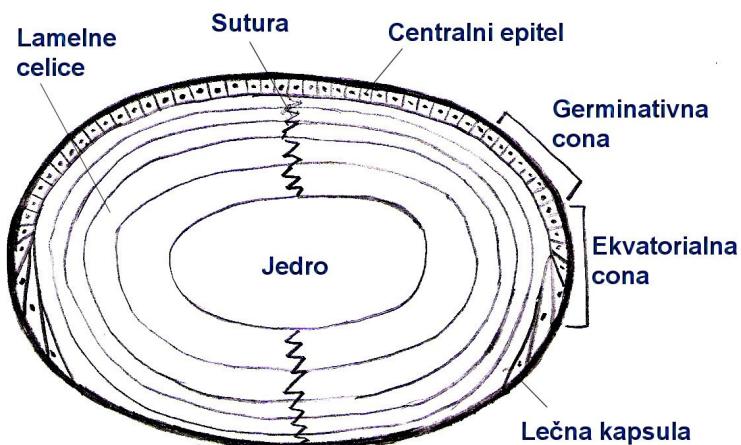
Ko se leča odcepi, nad njo nastane nov površinski ektoderm. Lečni vezikel potem inducira ektoderm, da se izoblikuje v prozorno roženico. Izoblikovanje lečnega tkiva v prozorno strukturo, ki omogoča usmerjanje svetlobe na mrežnico, vključuje spremembe v celični strukturi in obliki ter sintezo prosojnih, za lečo značilnih proteinov kristalinov.

Celice v notranjem delu lečnega vezikla se podaljšujejo in postanejo lečne lamelne celice (primarne lamelne celice) pod vplivom nevralne mrežnice. Sprednje celice lečnega vezikla izoblikujejo germinalni epitel, ki se še naprej deli. Deljene celice se pomaknejo proti ekvatorju vezikla in se med pomikanjem v ekvatorialno regijo tudi te začnejo podaljševati. Na ta način leča vsebuje tri regije: sprednji del delečih se epitelnih celic, ekvatorialno regijo podaljševanja celic in zadnjo centralno regijo lamelnih celic s kristalini. Ta sestava

ostaja enaka preko celotnega življenja živali, saj se lamelne celice stalno dodajajo (Gilbert, 2003).

Asimetrična morfogeneza znotraj lečnega vezikla omogoči obstoj sloja epitelnih celic na sprednji strani leče, ki prekriva maso lamelnih celic. Nadaljnja rast leče je odvisna od tega sprednjega epitela. Celice lečnega vezikla imajo svoje apikalne površine obrnjene navznoter proti lumnu vezikla in bazalne površine navzven, dotikajoče se basalne membrane (kapsule), ki obdaja vezikel. Preoblikovanje tega vezikla v strukturo, ki jo prepoznamo kot lečo, se začne z diferenciacijo posteriornih epitelnih celic v lamelne celice. Celice, ki nastajajo na grebenu sprednjega epitela, so poznane kot sekundarne lamelne celice (Bhat, 2001).

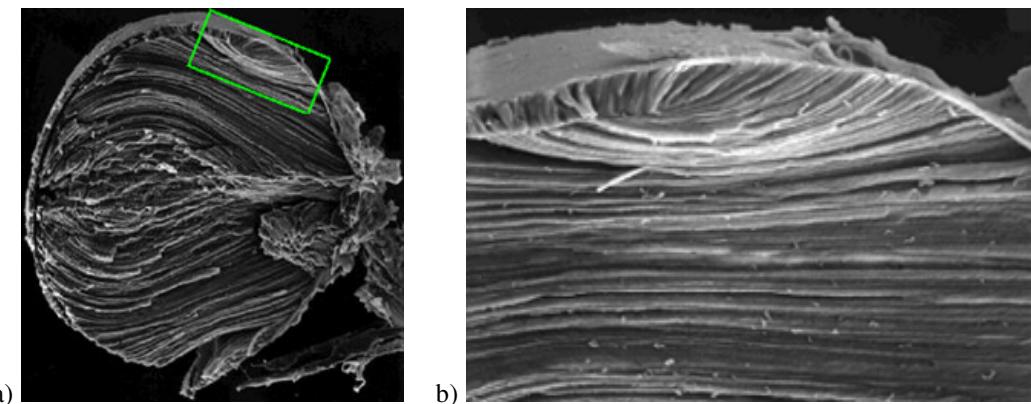
Skozi ta proces pridejo apikalne površine podaljšanih lamelnih celic direktno v kontakt z apikalno površino sprednjih epitelnih celic, to področje kontakta je poznano kot apikalna vmesna plošča. Zadnja površina leče se tako zaradi pomanjkanja stikov preoblikuje v lamelne celice. Sprednji epitel, ki zaradi razdalje od dna optične čaše izgubi njen vpliv (bodoča mrežnica), ostane nediferenciran. Neposredna bližina zarodne mrežnice do sprednjega lečnega vezikla predvidoma povzroča diferenciacijo in morfogenezo lamelnih celic (Bhat, 2001).



Slika 4: Preprosta skica odrasle očesne leče. Epitel je razdeljen na tri regije: centralni epitel, ki se ne deli, germinativna cona, kjer potekajo delitve, in ekvatorialna cona diferenciacije epitelnih celic v lamelne celice. Lečna kapsula (bazalna membrana) obdaja celotno lečo. Sutura je mesto, kjer se stikajo lamelne celice z leve in desne strani.

Razumno je pričakovati, da na fiziologijo in funkcijo lečnega epitela vplivajo vodnata tekočina v ospredju, vitreozna tekočina zadaj in ciliarno telo na ekvatorialni coni. Ciliarno telo, ki nastane iz sprednje ustne optične čaše, presenetljivo spominja na nediferencirano nevralno mrežnico, katera naj bi vplivala na diferenciacijo zadenjskih epitelnih celic v

lečnem veziklu. Obdajajoče ciliarno telo ima regulativni vpliv na celične delitve in DNK sintezo v ekvatorialni regiji lečnega epitela (Bhat, 2001).



Slika 5: Prerez embrionalne leče. a) Z zelenim pravokotnikom so označene ekvatorialne epitelne celice, ki se izoblikujejo v lamelne celice, b) še večja povečava ekvatorialnih celic (Gilbert, 2008).

Pomembna je pozicijska celost epitela in oklice okoli njega. To je pojasnjeno z dvema objavama dveh različnih raziskav okoli tri desetletja narazen. Coulombre in Coulombre sta leta 1963 obrnila razvijajočo se lečo za 180° in izpostavila epitel vitreozni tekočini in vplivu mrežnice. To je povzročilo diferenciacijo epitelnih celic v sekundarne lamelne celice. Hightower in McReady (1991) pa sta odkrila, da le v primeru, ko je bila sprednja površina leče izpostavljena selenitu (mineral – kalcijev sulfat), se je razvila katarakta. Izpostavljanje zadenjske površine, ki ni imela epitelnega sloja, ni imelo učinka. To opazovanje nakazuje zelo pomemben zaključek, da sprememba okolja okoli leče ne more le spremeniti razvojni status spredaj ležečega epitela, ampak lahko vodi tudi do fizioloških sprememb v ostali masi lamelnih celic (Bhat, 2001).

Med normalnim razvojem se optična kvaliteta vretenčarske leče očitno izboljša med degradacijo vseh organelov z membranami v lamelnih celicah, katerih število se zmanjšuje proti centru leče. V odrasli leči torej zmotijo svetlobo, ki vstopi preko zenice, samo organeli, ki so ostali v sprednjem epitelu in v površinskih lamelnih celicah (Bantseev in sod., 2003).

2.1.2 Epitel in njegove lastnosti

Vse leče imajo asimetrično ukrivljen epitel z mestno specifično morfološko in fiziološko specializacijo. Enojni sloj celic prekriva sprednjo površino leče, ki gleda na roženico in zunanji svet. Lečni epitel se konča na robu sprednje površine leče (ovalne ali okrogle površine, odvisno od vrste živali). Vsebuje celice v osrednji regiji, ki se ne delijo in so zaloga zdrave DNK v mirovanju, obkrožajo pa jih germinativne, deleče se celice, katerim sledijo (na ekvatorialnem zunanjem robu) deleče se celice, ki se diferencirajo v lamelne

celice. Pri novorojeni podgani so določili, da epitel vsebuje okoli 4,7% delečih se celic. Pomembna lastnost je delitev in diferenciacija skoraj preko celotnega življenja. Vzorec rasti, ki nastane zaradi delitev in diferenciacije celic lečnega epitela na ekvatorialnem robu, daje leči svojo edinstveno »fiziognomijo« (Bhat, 2001).

Celice v lečnem epitelu imajo tipično epitelno morfologijo. So kubične v svojem nativnem stanju *in vitro*, v kulturi pa brez pretiranih prehodov. Epitelne celice imajo zelo malo medceličnega prostora. Nekateri znanstveniki so opazovali lečni epitel pod fazno-kontrastnim mikroskopom in opisali svetle poliedrske in temne zvezdasto oblikovane celice. Novejša *in vivo* raziskava je z uporabo nekontrastnega refleksijskega mikroskopa ločila štiri morfološke poteze živega človeškega lečnega epitela (Bhat, 2001).

Premer epitela človeške leče je od 9 do 17 mm. Velikost celic narašča s starostjo, kar določuje spremembo v celični gostoti. Ženske naj bi imele večjo gostoto celic v epitelu kot moški. Moramo pa tudi upoštevati, da sta tako velikost kot gostota celic specifične za vsako regijo ali položaj lečnega epitela. Dejstvo je, da v istem časovnem okviru celice germinativne cone številčno naraščajo, celice osrednjega epitela pa številčno upadajo (Bhat, 2001).

Razmerje med gostoto in starostjo je zanimivo, čeprav sporno. S starostjo naj bi upadla gostota celic v lečnem epitelu. Sodobna raziskava preračunava izgubo 675 celic/mm² v 75 letnem življenjskem razponu (kar pomeni izgubo 14% celic). Ta ocena je osnovana na nedokazani predpostavki, da je stopnja upada linearна s starostjo. Nekateri pa pišejo o upadu mitotičnega indeksa lečnega epitela tako pod normalnimi kot tudi kataraktimi pogoji. Zaključili so, da ni povezave med celično gostoto in ostrostjo katarakte ali med celično gostoto in starostjo. Poročajo tudi, da je v epitelu kataraktne leče direktno nad motnostjo večja celična gostota če primerjamo to z epitelom, ki leži nad prozornim delom. Možno je, da izguba krpe celic, ki leži nad kataraktimi lamelnimi celicami, vodi do aktivacije celičnih delitev in se zato poveča celična gostota (Bhat, 2001).

Navadno opažajo, da celice gojene v kulturi pri nizki gostoti ne rastejo dobro. In to velja tudi za lečni epitel. Dokazali so, da medij iz kulture celic z visoko gostoto povečuje preživetje celic v kulturi z manjšo gostoto. Predpostavljaljali so, da te celice izločajo rastni – preživetveni faktor. Pri nizki koncentraciji celic se ti faktorji razredčijo in zato niso dostopni za celice in za njihovo preživetje. Odkrili so proteine – faktorje, ki očitno povečujejo preživetje celic lečnega epitela v kulturi (Bhat, 2001).

2.1.2.1 Epitel je največji del transporta in metabolizma

Celotni metabolni status lamelnih celic v odsotnosti endoplazemskega retikla, mitohondrijev in jedra je primerjalno zelo nizek. Tam ni žilnega sistema, da bi dovajal hrano in kisik do lamelnih celic in odstranjeval metabolne produkte ter vzdrževal intra- in intercelularni milje leče. Sama difuzija kot proces za vzdrževanje počasne, vendar trdne fiziologije očesne leče je nezadostna, da bi opravljala to vlogo. Raziskave relativnih razmerij transporta po anteriorni in posteriorni površini leče so vodile do modela »pomanjkanje črpalk«. Dinamika aktivnega transporta preko lečnega epitela iz vodnate tekočine ustvarja gradient Na^+ in K^+ ionov v leči; visok K^+ na sprednji in visok Na^+ na zadnji strani leče. Epitel opravlja večino dela za vzdrževanje nizke Na^+ koncentracije v leči in mirovnega potenciala, prečrpava K^+ in izloča Na^+ , ki vstopa v lečo preko zadnje površine z difuzijo (Bhat, 2001).

Očesna leča vzdržuje visok gradient Ca^{2+} in lečni epitel igra pomembno vlogo pri vzdrževanju teh nivojev. Prosti Ca^{2+} v celicah lahko poveča sprostitev iz znotrajceličnih zalog v endoplazemskemu retiklu ali pa v odsotnosti tega s transportom Ca^{2+} iz zunajceličnega prostora. Iz zalog vstopa v celico z velikim dotokom (Bhat, 2001).

2.1.2.2 Električne lastnosti

Direktne električne meritve so pokazale, da je mirovni potencial leče (-69,6 mV za lečo podgane) pogojen predvsem s kalijevim gradientom. Celice vzdržujejo svojo prostornino z ohranjanjem negativnega mirovnega potenciala. To dosežejo z vzdrževanjem nizke koncentracije Na^+ in visoke koncentracije K^+ v celici, ter visoke prepustnosti membrane za K^+ ione. Epitelne celice vzdržujejo volumen z omejevanjem dotoka ionov. Aktivni Na^+/K^+ transporter vzdržuje razmerje Na^+/K^+ nizko (Bhat, 2001). Črpalka v vsakem ciklu prenese tri Na^+ iz celice in dva K^+ v njo.

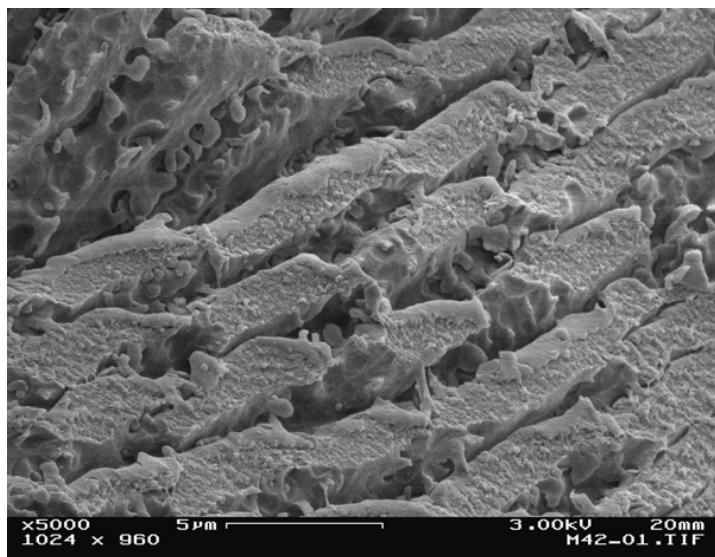
V lečnem epitelu najdemo različne kanalčke in transporterje: Na^+/K^+ črpalke (v goveji leči največ α_1 , nekaj tudi α_2 in α_3 izomer), s Ca^{2+} aktivirani K^+ kanalčki (SK družina kanalčkov), prenašalci K^+ v notranjost, prenašalci K^+ navzven, Na^+ kanalčki (njihova vloga še ni poznana), Cl^- kanalčki (v govejih lamelnih celicah), akvaporini za vodo CHIP28, MIP ali MIP26 (Mathias in sod., 1997), purinergični receptorji P_{2u} , α_{1A} adrenergični receptorji (Churchill in Louis, 1996b) ter nikotinski in muskarinski acetilhololinski receptorji za prenos Ca^{2+} .

Dokazali so izražanje vseh treh članov SK družine v sprednjih in ekvatorialnih epitelnih celicah leče. Aplikacija agonistov G-proteina ali tirozinske kinaze je povzročila hiperpolarizacijo membrane. Dokazali so, da je hiperpolarizacija posledica dviga $[\text{Ca}^{2+}]_i$, saj je dodatek kalcijevega ionofora ionomicina prav tako povzročil hitro hiperpolarizacijo,

odstranitev Ca^{2+} ionov iz zunajcelične raztopine pa je povzročila depolarizacijo. Tak odgovor je skladen z aktivacijo SK kanalov z dvigom $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Ta odgovor so tudi prekinili z apaminom in trifluoperazinom in ga poudarili z aktivatorjem SK kanalov 1-etyl-2-benzimidazolinom (Rhodes in sod., 2003).

2.1.3 Lamelne celice in lastnosti leče

Jedro leče sestavljajo lamelne celice. Nove celice na ekvatorialnem robu se ves čas dodajajo na vrh starejših lamelnih celic na tak način, da starejše celice potiskajo globlje v lečo. Tako gledano, bi odluščenje ene lamelne celice za drugo v nekem času teoretično dalo časovni prikaz molekularnih sprememb, ki bi se začele od zunaj (najmlajše ali najbolj recentne lamelne celice) proti centru (najstarejše, jedro leče, ki vsebuje lamelne celice že od 5. - 6. tedna gastrulacije človeka) (Bhat, 2001). Ko te lamelne celice v embrionalnem razvoju rastejo, izdelujejo kristaline, ki zapolnijo celice in povzročijo izrivanje jedra. Te kristalin-izdelujuče lamelne celice zapolnijo prostor med obema slojema lečnega vezikla (Gilbert, 2003).



Slika 6: Prerez lamelnih celic. Dobro se vidi ogromna nagubana membranska površina (Lust).

Zanimiva dejstva so, kako leča vzdržuje celični volumen in konstanten notranji milje, saj ni ožiljena, da bi dovedla hrano in odvedla odpadne produkte iz celic, nima mitohondrijev, da bi polnila zaloge ATP, in nima celičnega jedra ter endoplazemskega retikla za sintezo novih membranskih proteinov. Poleg tega se morajo celice postaviti v tesno urejene vrste z vmesnim prostorom manjšim od valovne dolžine svetlobe (slika 6). Tudi regulacija celične prostornine je izjemna, saj bi redukcija na tako majhen volumen citosola moral povzročiti povečanje medceličnih prostorov, kar pa bi spet omotnilo lečo (Mathias in sod., 1997).

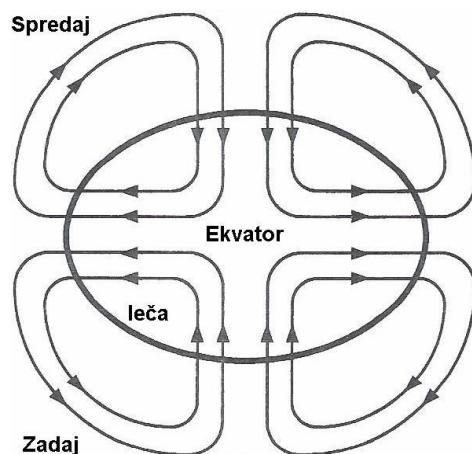
2.1.3.1 Kristalini

Prosojnost leče je zagotovljena z odsotnostjo elementov, ki bi razpršili svetlobo, z visoko koncentracijo citoplazemskih proteinov kristalinov, ki imajo visok lomni količnik, in prilagoditvijo, da citoplazma in celične membrane ostanejo fluidne. Vsebnost kristalinov je visoka v vseh lamelnih celicah, vendar upade za polovico od zunanjosti proti jedru. Ta radialni gradient koncentracije povzroči tudi gradient lomnih količnikov, kar omogoča leči odpravo sferične aberacije, ki bi drugače nastala. Te beljakovine lečnega jedra so lahko stare celo kot organizem, vendar kljub temu ne agregirajo in ne sipajo svetlobe. Prosojnost kristalinov je splošno odvisna od homeostaze znotrajcelične tekočine z rastjo in starostjo. Horwitz je leta 1992 prvi opisal α -kristaline kot molekulske šaperone, ki vežejo delno denaturirane proteine in s tem preprečijo njihovo agregacijo (Mathias in sod., 1997).

Blakely in sod. (2000) so z metodo Western blot spremljali prisotnost različnih beljakovinskih markerjev, tudi α A-, α B- in β -kristalinov med diferenciacijo leče. Analize so pokazale stalno količino α A-kristalina in povečane količine α B- ter β B2-kristalinov (slednjih dveh je bilo v zgodnjem razvoju manj). Ekspresija α B-kristalina je bila večja od produkcije α A-kristalina po razvoju očesa. Protein γ -kristalin so dokazali v konfluentnih kulturah celic z uporabo metode imunofluorescence, ne pa tudi v rastočih celicah.

2.1.3.2 Tokovi v leči

Da kljubuje energijskim in prehrambenim problemom, ima leča svoj lastni notranji obtočilni sistem. Vzorec tokov preko in okrog leče je eno najbolj presenetljivih opazovanj zadnjih desetletij. Zaradi ektodermalnega izvora in asimetrične strukture, so v preteklosti veliko preiskovali njen transport. Veliko poskusov je bilo osnovanih na izolaciji anteriorne in posteriorne površine in meritev ionskih tokov preko leče. Ko sta Robinson in Patterson uporabila vibracijsko metodo za meritev tokov okoli samostoječe leče, se je izkazalo, da je tok usmerjen navznoter od obeh polov in navzven ob ekvatorju (Mathias in sod., 1997).



Slika 7: Tokovi preko in okrog leče po Robinsonu in Patternu (Mathias in sod., 1997).

V očesu pa ni izolacije sprednjega in zadnjega dela leče, in takšnih tokov verjetno ni. Je pa zagotovo obtok okrog in skozi lečo. Ta zanimiv in kompleksen vzorec ionskih tokov so opazovali v lečah od dvoživk do malih sesalcev, tako da pričakujemo ta vzorec splošno v lečni fiziologiji (Mathias in sod., 1997).

2.1.3.3 Oskrba jedra leče s kisikom

Leča je navadno zaščitena pred potencialnimi škodljivimi efekti kisika s svojo lokacijo in nenavadno fiziologijo. Notranjost očesa je razmeroma hipoksično okolje, ki vsebuje le okoli 5 - 10% količine kisika, ki jo najdemo v krvi (~ 5,3 kPa) (McNulty in Bassnett, 2005).

Leči primanjkuje krvne oskrbe (hemoglobin bi absorbiral svetlobo) in kisik, ki je namenjen v notranje celice, mora difundirati preko površinskih ploskev tkiva. Pred kratkim so predstavili nov model leče, pri katerem metabolni procesi v zunanjih celičnih plasteh ustvarjajo stalni gradient kisika znotraj tkiva. Tako so celice v jedru leče stalno v hipoksičnih pogojih (McNulty in Bassnett, 2005).

Najstarejše lamelne celice so v sredini leče, tiste, ki so se diferencirale pred kratkim, pa bližje površini. Med dokončno diferenciacijo se iz celične citoplazme odstranijo vsi organeli (tudi mitohondriji). Posledično odrasla leča vsebuje dve populaciji lamelnih celic: zunanji sloj diferencirajočih celic, ki še vsebujejo organele, ter notranje zrele lamelne celice, ki jih nimajo več (McNulty in sod. 2004).

Kisik vstopa v lečo z difuzijo iz okoljne tekočine. Prehaja preko vseh membran in če se sproti ne porabi, doseže jedro leče. Poraba kisika v zunanjih slojih leče s produkcijo ATP je načrtno zniževanje parcialnega pritiska kisika (P_{O_2}) v jedru. McNulty in sod. (2004) so ga merili z optičnim detekcijskim sistemom na lamelnih celicah. Povprečne vrednosti v jedru leče so bile $0,17 \pm 0,07$ kPa ($n = 8$) pri inkubaciji v raztopini s 5% kisika, merjeno najkasneje 15 minut po smrti goveda. Proti zunanjosti leče se je parcialni tlak zviševal do 3,99 kPa.

Respirometrične meritve so pokazale, da mitohondriji v površinskih celicah porabijo 90% vsega kisika, ki vstopa v lečo, in s tem zmanjšajo koncentracijo kisika v lečnem jedru na $< 2 \mu M$. V teh stalno hipoksičnih celicah je dovanjanje kisika verjetno zelo škodljiv pojav. Leča ne dobi večino potrebne energije od oksidativne fosforilacije, temveč od glikolize. In res veliko kaže na lečno sposobnost za delovanje (vključno s tkivno prosojnostjo) v popolni odsotnosti od kisika. Verjetno je zato v tem tkivu vloga mitohondrijev pri generaciji ATP z oksidativno fosforilacijo šele drugotnega pomena glede na nalogu odstranjevanja kisika iz lečnega jedra (McNulty in Bassnett, 2005).

2.1.3.4 Povezave med celicami – presledkovni stiki

Neposredne povezave med celicami so presledkovni stiki, ki jih najdemo pri vseh mnogoceličnih živalih. Igrajo pomembno vlogo pri medceličnem sodelovanju in prepoznavanju. Če se presledkovni stiki prekinejo, se celice lahko prenehajo obnašati kot enotno tkivo in nastane rakavo nekontrolirano razmnoževanje celic.

Kanalček presledkovnega stika se tvori z oligomerizacijo šestih proteinov (konekson) v vsaki celici. Osnovni gradbeni elementi koneksona so koneksini, ki pripadajo veliki družini homolognih, a genetsko različnih proteinov (Mathias in sod., 1997). Tudi lečne celice so povezane med seboj z mrežo presledkovnih stikov, ki tudi vsebujejo različne koneksine. Vloga teh pri homeostazi leče ni poznana (Gong in sod., 1998).

Kanalček stika tvori konekson ene celice (hemi-kanal), ki se spari s koneksonom sosednje celice. Funkcionalno povezovanje lečnih celic predstavlja ekspresijo treh tipov koneksinov. Epitelne celice izražajo α_1 (Cx43) koneksin, v diferencirajočih lamelnih celicah pa α_1 ne zaznamo. Te lamelne celice so povezane med seboj z mrežo α_3 (Cx46) in α_8 (Cx50) koneksini. Ko celice zorijo, se koneksini preoblikujejo s fosforilacijo in cepljenjem njihovega N in C konca (Gong in sod., 1998).

Vse tri koneksine so klonirali in preiskovali v heterogenih sistemih, kjer oblikujejo homotipične (enak tip koneksinov v vsaki celici) ali heterotipične (α_3 se izrazi v eni celici, α_1 ali α_8 pa v drugi) kanale, ki so občutljivi na pH. Obstaja celo biokemični dokaz, da ima leča heterotipične presledkovne stike, v katerih se izrazita α_3 in α_8 naenkrat v enem koneksonu (Gong in sod., 1998).

Ne ve se natančno, zakaj so v leči trije različni proteini koneksini, čeprav si lahko predstavljamo, da imajo verjetno različne funkcionalne lastnosti. Raziskave so pokazale, da se presledkovni stiki lamelnih celic razlikujejo po razporeditvi in prepustnih lastnostih. V coni zrelih lamelnih celic so povezave razmeroma enotne z razmeroma visoko upornostjo in niso občutljive na pH. V coni diferencirajočih lamelnih celic pa se povezovalna upornost zelo spreminja od polov proti ekvatorju (zelo nizka upornost pri ekvatorju). Razlikujejo se tudi v odgovoru glede na padec citoplazemskega pH. Na nekatere te funkcionalne lastnosti lahko vplivamo s sestavo presledkovnih stikov (Gong in sod., 1998).

2.2 KATARAKTA ALI SIVA MRENA

Očesne leče navadno ne vidimo. In to iz dobrega razloga, saj mora svetlobo posredovati in fokusirati. Skoraj vsaka motnja v lečnem metabolizmu se kaže kot motnost tkiva, ki jo poznamo pod imenom katarakta. Čeprav naj bi prehrana, bogata z antioksidanti in vitaminimi, počasi zmanjšala možnosti obolevanja za sivo mreno, pa je edino uspešno zdravljenje še vedno kirurška odstranitev kataraktne leče (McNulty in Bassnett, 2005).



Slika 8: Primerjava med zdravo lečo (levo) in lečo s sivo mreno (desno).

Najpogostejsa oblika katarakte je starostno pogojena jedrna katarakta (»Age-Related Nuclear Cataract« - ARNC). To je rumeno-rjava katarakta, ki nastane v sredini leče. Ta tip je verjetno vodilni razlog za slepoto po svetu. Model, da molekularni kisik igra ključno vlogo pri razvoju ARNC, podpirata dve raziskavi. Natančne biokemične analize ARNC so razkrile široko razširjeno oksidacijo lečnih proteinov. Kot drugo pa so neposredno vpletli kisik kot dejavnik pri razvoju katarakte. Jedrna katarakta se pogosto pojavi pri pacientih, ki so imeli hiperbarično kisikovo terapijo (HBOT) ali pa vitrektomični kirurški poseg. HBOT očitno prepoji lečo s kisikom, kar povzroči oksidativni stres. Med vitrektomijo, kirurškim zdravljenjem za mrežnične bolezni, odstranijo steklovino iz očesa in jo zamenjajo s fiziološko solno raztopino. Mešanje teh tekočin vodi do prenosa kisika med mrežnico in lečo (McNulty in Bassnett, 2005).

Ker je nizka količina kisika v jedru leče zelo odvisna od delovanja mitohondrijev, lahko manipulacije z njihovim delovanjem hitro povzročijo poplavno jedra s kisikom. Na primer, preprosto znižanje temperature s 37 °C na sobno temperaturo je dovolj, da povzročimo hiter porast kisika v lečnem jedru, saj se v hladnejši vodi raztaplja večja količina O₂. To lahko klinično opazujemo, saj pogosto v oko dovajajo hlajeno raztopino med očesno operacijo. Katarakta je neprijeten stranski učinek takih operacij, četudi je jedro leče izpostavljeno kisiku le med postopkom. Tudi s starostjo se delovanje mitohondrijev splošno znano zmanjša. In zmanjšana poraba kisika zaradi odpovedi mitohondrijev v zunanjih plasteh leče tako s starostjo zmanjša hipoksijo jedra. To sproži motnost jedra oz. sivo mreno (McNulty in Bassnett, 2005).

Katarakto pa lahko povzročijo tudi določene bolezni, npr. mišična distrofija (bolezen mišic zaradi pomanjkljive prehrane – MD). Ta povzroči povečano tveganje za katarakto, kar zaznamo večinoma kot motnost leče po 40. letu starosti. Vendar je mnogo primerov

zgodnje katarakte vzrok bolezni. V raziskavi z več kot 300 osebami iz devetih družin z MD so vse okužene osebe po 20. letu imele katarakto. V zgodnjih stadijih je MD katarakta opazna kot svetlobno-razpršilna motnost v zunanjih delih leče. Kasnejše stopnje so očitne nabrekline ob spojih leče in to nazadnje privede do zrele katarakte, ki jo z ozkim žarkom svetlobe vidimo kot svetlikajoče se barve. Pri pacientih z MD so odkrili spremembe v lečnem epitelu (Rhodes in sod., 2003).

Izpostavitev različnim oblikam stresa (tudi sevanje, oksidacija in terapije z različnimi zdravili) prav tako povzroči razne oblike katarakte. Npr. fenotiazin, zdravilo za shizofrenijo, povečuje tveganje za katarakto. Spremembe pri prepisovanju genov za s Ca^{2+} aktivirajočo SK družino kanalčkov naj bi pri tem igrale pomembno vlogo. K^+ kanalčki na splošno igrajo očitno pomembno vlogo pri določevanju membranskega potenciala leče in pri kontroli rasti leče. Prav tako pa motnje v homeostazi Ca^{2+} povzročajo kortikalno katarakto (Rhodes in sod., 2003).

Akumulacija Ca^{2+} v leči je povezana s kataraktogenezo. Povišano $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v leči so opazili pri več kot 75% primerov katarakt. Pri inhibiciji Ca^{2+} črpalke s kalmodulinskim antagonistom so ugotovili spremembe v lečni prepustnosti in prosojnosti. Ca^{2+} in njegovo uravnavanje je osnova za vzdrževanje prosojnosti leče. To vidimo v kulturi leč brez Ca^{2+} , kjer pride do omotnjenja leč. Nizko $[\text{Ca}^{2+}]_i$ lahko vzdržujejo le aktivne epitelne celice. V ekvatorialni ravnini nastale lamelne celice pa začnejo akumulirati kristaline (~ 30%) in postopno izgubijo organele ter sposobnost regulacije Ca^{2+} (Wang in sod., 2000).

Spremembe koncentracij dodanih hormonov v leči lahko povzročijo nastanek katarakte. Na primer holinesterazni inhibitor povzroči katarakto pri ljudeh in lososih s povečanjem koncentracije ACh, ki lahko povzroči dvig $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v lečnih celicah. Hormonska regulacija Ca^{2+} v lečnih celicah je pomembna tema kliničnih raziskav, saj je Ca^{2+} močno povezan s človeško površinsko katarakto in večino živalskih modelov katarakte. Ti izsledki kažejo na pomembnost raziskav mehanizmov, pri katerih agonisti uravnavajo $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Za veliko agonistov so *in vitro* dokazali, da zvišujejo Ca^{2+} v lečnem epitelu, med drugim ACh, histamin, adenosin trifosfat (ATP), fenilefrin, bradikinin, bombesin in vazopresin (Churchill in Louis, 1996b).

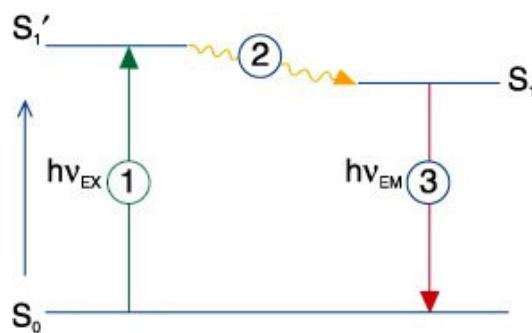
Katarakta pri starejših ženskah je pogostejši pojav kot pri starejših moških, kar pomeni, da odsotnost estrogena v postmenopavzalnem obdobju verjetno povečuje tveganje. In res so odkrili pozitiven vpliv hormonske zamenjevalne terapije (HRT) proti obolelosti za katarakto. Estradiol v fizioloških koncentracijah namreč prepreči oksidacijo membran, saj zmanjšuje lipidno peroksidacijo z glutamatom, zavira produkcijo znotrajceličnega peroksida in varuje pred inhibitorji elektronske verige (Wang in sod., 2003).

2.3 FLUORESCENCA IN MERITVE FLUORESCENCE

Barvilo fura-2, ki smo ga uporabili pri naši raziskavi, je fluorescentna molekula ali fluorofora, katere absorpcijske lastnosti se spreminjajo v odvisnosti od $[Ca^{2+}]_i$.

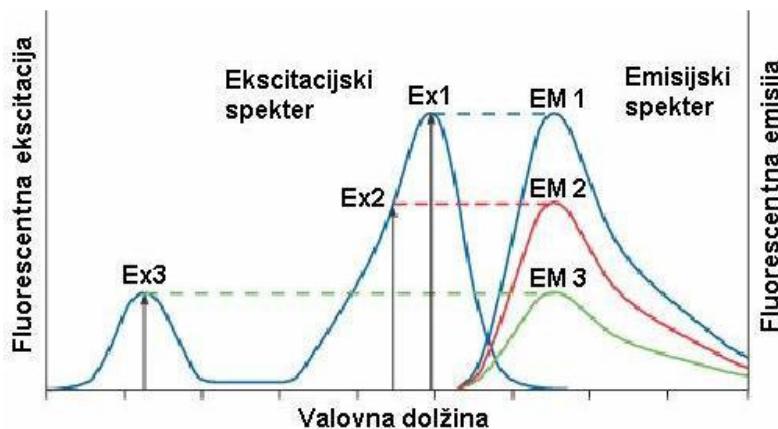
Fluorescencija je proces, kjer molekula absorbira foton visoke energije, nato pa čez določen čas izseva foton nizke energije. Emitira se le del energije, ostanek pa izseva kot toplota oz. kot vibracija.

V redkih primerih se to zgodi z vsemi absorbiranimi fotoni. Navadno povzroči izsevanje fluorescentnega fotona vsak drugi oz. tretji absorbirani foton, pri šibko fluorescentnih molekulah pa še manj.



Slika 9: Proses fluorescence. S_0 – osnovno stanje, 1 – ekscitacija, S_1' - eksitirano elektronsko singlet stanje, 2 – življenjski čas eksitiranega stanja je 10^{-9} - 10^{-8} s, lahko izguba kot toplota, S_1 – eksitirano singlet stanje, 3 – fluorescentna emisija. Modra puščica prikazuje naraščajočo energijo (Wolska, 2001).

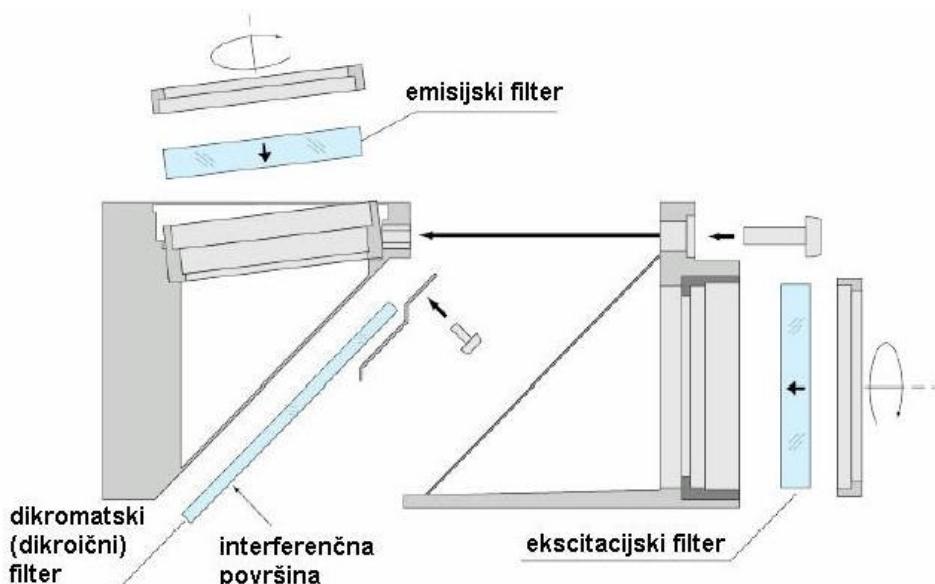
Večina optičnih nevrofizioloških metod temelji na meritvah spremembe fluorescence. Absorpcijske in/ali emisijske lastnosti substanc se spreminjajo v odvisnosti od koncentracije (aktivnosti) inonov, membranskega potenciala, polarnosti okolja, prisotnosti ligandov, bližnjih molekul, ki omogočajo resonantni prenos energije...



Slika 10: Absorpcijski in emisijski spekter (Wolska, 2001).

Valovne dolžine, pri katerih snov absorbira fotone, so absorpcijski spektri, valovne dolžine oddajanja fotonov pa so emisijski spektri. Pri snoveh, ki recimo vežejo različne ligande, je pogost pojav, da ima ista snov več absorpcijskih in/ali več emisijskih spektrov, odvisno od prisotnosti ali odsotnosti liganda. Določanje teh lastnosti je zelo pogosto uporabljeno kot detekcija snovi, saj se molekule po teh lastnostih med seboj edinstveno razlikujejo.

Za takšno opazovanje uporabimo ekscitacijski in emisijski filter. Z ekscitacijskim filtrom osvetlimo objekt s svetlobo, ki jo fluorofora absorbira. Z emisijskim ali zapornim filtrom pa odrežemo vso ostalo svetlobo razen emitirane valovne dolžine. Vmes lahko postavimo tudi dikroično zrcalo, ki odbija svetlobo do neke valovne dolžine, prepušča pa svetlobo nad to valovno dolžino. Glede na želeno opazovano molekulo uporabimo različne filtre. V ta namen se je uveljavil pristop uporabe t.i. fluorescentnih kock, ki imajo že pripravljeno kombinacijo ekscitacijskega, dikroičnega in emisijskega filtra za določeno barvilo.



Slika 11: Sestava »fluorescentne kocke«.

Dobre lastnosti merjenja fluorescence so omogočena uporaba visoko občutljivih detektorjev, ki imajo ugodno razmerje signala in šuma, omogočene meritve izredno majhnih sprememb koncentracij ligandov in poenostavljena uporaba konfokalne mikroskopije. Slabe strani fluorescence so v bledenju in prekrivanju spektrov. Fluorescentne molekule namreč po več ciklih vzbujenja razpadajo in s tem se spremeni koncentracija snovi. Sočasna uporaba več barvil naenkrat je lahko težavna, saj se ekscitacijski in emisijski spektri snovi lahko zelo prekrivajo.

Naša naloga je zahtevala opazovanje prostega Ca^{2+} v celicah, zato smo uporabili ustrezno barvilo, ki je za tovrstno raziskavo najprimernejše.

2.4 FURA-2, ACETILHOLIN IN IONOMICIN

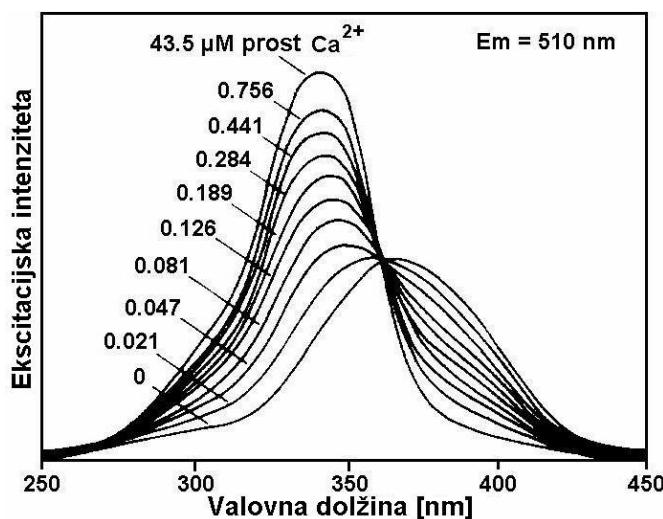
2.4.1 Fluorescentni indikator kalcija – fura-2

Spremljanje $[Ca^{2+}]_i$ v celicah je izredno pomembno za razumevanje delovanja skoraj vseh celic, zato so razvili mnoga barvila za dinamične meritve in slikanje $[Ca^{2+}]_i$, med katerimi je najbolj v uporabi barvilo fura-2.

Sintezo barvila fura-2 so prvič objavili leta 1985 (Grynkiewicz in sod., 1985). Razvili so ga za raziskave koncentracije prostega Ca^{2+} v živalskih in rastlinskih celicah. Prosti Ca^{2+} ima v celici fiziološko nalogu sporočevalne molekule. Celično barvilo ima naslednje lastnosti: v celico ga je potrebno dovesti čim bolj previdno, ne sme biti toksično, saj bi drugače uničilo preiskovano celico, in mora biti selektivno za Ca^{2+} . Na ostale ione se ne sme, ali pa v zelo majhni meri, odzivati (Willert, 1995).

Fura-2 je barvilo, ki ga vzburimo z UV svetlobo, in je indikator razmerja $[Ca^{2+}]_i$ v celicah. Uporabljo ga v mnogih poskusih, saj gre za najstarejše barvilo za meritve $[Ca^{2+}]_i$, ki omogoča uporabo razmerja absorpcij. Za dinamično slikanje $[Ca^{2+}]_i$ je namreč bolj praktično spremeniti ekscitacijsko valovno dolžino kot pa slikati isti motiv pri dveh različnih emisijskih valovnih dolžinah. Fura-2 je relativno odporna na bledenje preparata med obsevanjem (Invitrogen, 2007).

V odvisnosti od vezave Ca^{2+} fura-2 prikaže absorpcijski premik (slika 12). To spremembo absorpcijskih lastnosti lahko zaznamo z izmenično ekscitacijo pri 380 nm (visoka absorpcija brez vezanega Ca^{2+}) in 340 nm (visoka absorpcija z vezanim Ca^{2+}), emisijo pa opazujemo pri valovni dolžini približno 510 nm, kjer je njen edini emisijski vrh.



Slika 12: Ekscitacijski spekter barvila fura-2 (Invitrogen, 2007).

Spremembo $[Ca^{2+}]_i$ določimo z razmerjem med obema valovnima dolžinama, kot narekuje enačba (1).

$$R = (\text{fluorescenza pri } 340 \text{ nm}) / (\text{fluorescenza pri } 380 \text{ nm}) \quad \dots (1)$$

Prednost uporabe razmerja je v tem, da se na ta način »pokrajšajo« vsi dejavniki, ki sicer vplivajo na jakost signala fluorescence pri eni valovni dolžini – moč svetlobnega vira, koncentracija barvila, dolžina optične poti v preparatu itd. Vsi namreč vplivajo na fluorescenco pri obeh valovnih dolžinah. To kar ostane pa je odvisno le od koncentracije liganda – v primeru fura-2 je to Ca^{2+} .

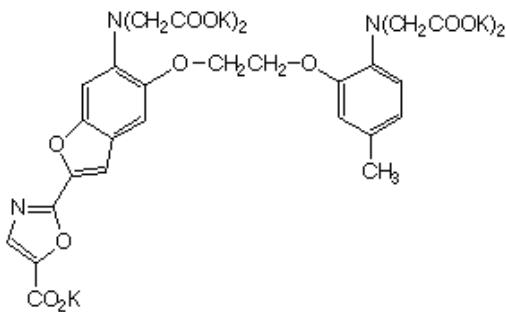
Za izračun koncentracije kalcija se sicer navadno uporablja enačba (2),

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \beta \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \quad \dots (2)$$

kjer sta R_{\max} in R_{\min} razmerji fluorescence (340 nm / 380 nm) pri maksimalni in minimalni saturaciji barvila s Ca^{2+} , R je razmerje v vsaki določeni točki v času, β pa je razmerje fluorescenc pri ekscitaciji s 380 nm v prisotnosti in v odsotnosti Ca^{2+} . To enačbo smo sprva nameravali uporabiti tudi pri našem delu. Vendar se je ob kasnejšem delu izkazalo, da je bil postopek kalibracije, s katerim se določi faktor β z ionomicinom pri našem preparatu, neuporaben. Zato, ker nas je bolj kot kvantitativna vrednost $[Ca^{2+}]_i$ v epitelnih celicah zanimal sam odziv na aplikacijo agonista, smo se na koncu odločili le za uporabo razmerja, iz katerega je sicer vedno možno tudi naknadno izračunati $[Ca^{2+}]_i$ ob poznavanju faktorja β za konkretno kombinacijo optične poti.

Med porastom $[Ca^{2+}]_i$ v citoplazmi se (razvidno tudi iz slike 12) fluorescence pri 340 nm poveča, fluorescence pri 380 nm pa zmanjša. Razmerje med obema valovnima dolžinama se tako poveča in celoten preparat se osvetli. To lahko spremljamo z meritvijo jakosti fluorescence pri obeh valovnih dolžinah.

Fura-2 hidrolizira pri nespecifičnih esteraznih pasteh in je indikator v citosolu. Njena molekuljska masa je 1001,9 g/mol. Topi se v DMSO (dimetil sulfoksid, topilo), je živo rumena tekočina in jo hranimo proč od svetlobe pri -20 °C. Kemijsko ime: 1-[6-amino-2-(5-karboksi-2-oksazolil)-5 - benzofuraniloksi]-2-(2-amino-5-metilfenoksi) etan-N,N,N',N'-tetraocetna kislina.

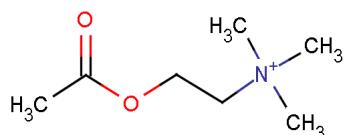


Slika 13: Kemijska zgradba barvila fura-2.

Barvilo raztpljamamo v DMSO, ki je kemična komponenta s kemijsko formulo $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, je brezbarvna tekočina in pomembno aprotično topilo, ki vsebuje polarni in nepolarni del. Pogosto se uporablja kot topilo za soli v kemijskih reakcijah. Je šibka kislina in tolerira relativno močne baze. Uporablja pa se v zadnjem času tudi kot zdravilo proti raku, saj se veže na kemoterapevtske substance (Tucker in sod., 1968).

2.4.2 Acetilholin

Acetilholin je bil prvi identificirani živčni prenašalec. Je kemični transmiter tako osrednjega živčnega sistema kot tudi parasympatičnega živčnega sistema v mnogih organizmih vključno s človekom. Njegova kemijska formula je $\text{C}_7\text{H}_{16}\text{NO}_2$, polno sistematizirano kemijsko ime pa 2-(acetiloksi)-N,N,N-trimetiletanamin. Molekulska masa je 146,21 g/mol.



Slika 14: Kemijska formula acetilhololina.

ACh ima v telesu funkcijo prenosa signala med živčnimi celicami in mišičnim vlaknom na motorični ploščici. Kot živčni prenašalec deluje tudi pri prenosu signala med nevroni vegetativnega živčevja (tako simpatičnega kot parasympatičnega živčevja). Pri parasympatiku prenaša signal tudi iz končnega nevriona na tarčni organ (pri simpatiku ima to funkcijo noradrenalin). Kot živčni prenašalec se pojavlja tudi v osrednjem živčevju; pomemben je predvsem pri kognitivnih procesih. Poleg γ -aminomaslene kisline in glicina je najpogosteje zastopan živčni prenašalec v možganih. Raziskave kažejo, da ima ACh pomembno vlogo pri procesu učenja.

Učinkuje na dvoje receptorjev: na nikotinske in muskarinske. Nikotinski acetilholinski receptorji ali nAChR, so holinergični receptorji, ki tvorijo ionske kanalčke v plazmalemi.

Odpirajo se z vezavo liganda. Tako kot tudi drugi acetilholinski receptorji, muskarinski acetilholinski receptorji (mAChR), se odpirajo z vezavo ACh, vendar tudi z vezavo nikotina. nAChR ne sodelujejo s sekundarnimi sporočevalci, ampak se sami odprejo kot ionski kanalček.

Muskarinski acetilholinski receptorji pa so bolj občutljivi na muskarin (toksin iz gob) kot na nikotin. Spadajo v razred metabotropnih receptorjev, ki se povezujejo z G-proteinom in njegovim sporočevalskim sistemom znotraj celice. Pri teh receptorjih se signalna molekula (ligand, pri nas ACh) veže na receptor iz sedmih transmembranskih regij.

Obstaja pet podtipov muskarinskih receptorjev. Raziskava iz leta 2000 je pokazala različno porazdelitev podtipov M1 do M5 v različnih tkivih očesa. PCR metoda je razkrila, da je več kot 90% vseh muskarinskih receptorjev iz svežih očesnih celic podtipa M1. Pri celični kulturi pa je več kot 95% receptorjev podtipa M3. M3 je najmočneje zastopan tudi v drugih tkivih očesnega zrkla. V šarenici in beločnici je velika zastopanost receptorja M1 (Collison in sod. 2000).

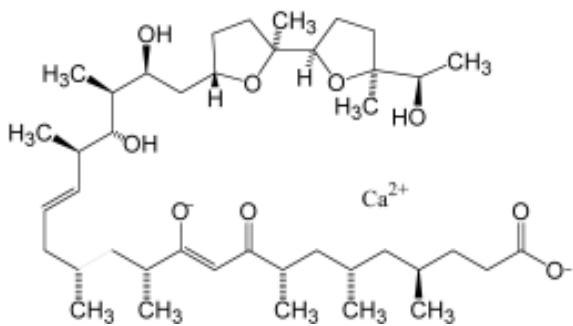
Substance, ki delujejo na holinergične receptorje posredno, imenujemo indirektne holinergično aktivne snovi. Mednje sodijo inhibitorji acetilholin-esteraze. Le-ti lahko inhibirajo encim le za krajši čas (reverzibilni inhibitorji) ali pa je inhibicija nepovratna (ireverzibilni inhibitorji). Med ireverzibilne inhibitorje acetilholin-esteraze sodijo različni organski estri fosforne kisline, ki se uporablajo kot insekticidi (npr. paration) in kot bojni plini (sarin, tabun...). Substance, ki preprečujejo vezavo ACh na receptor, se imenujejo antiholinergiki – alkaloidi, na primer atropin in skopolamin.

2.4.3 Ionomor ionomicin

Ionomicin je ionofor, ki izhaja iz aktinobakterije *Streptomyces conglobatus*. Ionomor je v lipidih topna proteinska molekula, ki jo navadno sintetizirajo mikroorganizmi, da transportira ione preko lipidnega dvošloja celične membrane. Obstajata dve vrsti ionoforov. Male molekule (mobilni prenašalci ionov) se vežejo z določenim ionom, zaščitijo njegov naboj pred okolnjim medijem in ga prenesejo preko hidrofobne lipidne membrane. Kanalčki pa ustvarijo hidrofilno poro v membrano in s tem omogočijo ionom prehod brez kontakta z membrano.

Ionomori prekinejo transmembranski koncentracijski gradient ionov, ki je potreben za pravo delovanje in preživetje mikroorganizmov, in imajo tako antibiotične lastnosti. Mikrobi jih izdelujejo zato, da se branijo pred drugimi konkurenčnimi mikrobi. V laboratorijskih raziskavah jih uporabljamo za porast prepustnosti bioloških membran za določene ione. Nekateri so v uporabi kot antibiotiki.

Ionomycin se uporablja v raziskavah za zvišanje $[Ca^{2+}]_i$ pri opazovanju transporta Ca^{2+} preko biološke membrane. Uporablja se tudi za stimulacijo znotrajcelične produkcije citokinov, interferona, perforina, IL-2 in IL-4, navadno v kombinaciji s PMA (4-metoksiamfetamin, poživilo). Ti citokini so pomembni v vnetnostnem odgovoru. Njegova molekulska formula je $C_{41}H_{70}O_9Ca$, molekulska masa je 747,1 g/mol.



Slika 15: Kemijska struktura ionofora ionomicina vezanega na Ca^{2+} .

2.5 AKTIVNOST IN KONCENTRACIJA RAZTOPIN

Naša naloga je bila zastavljena kot iskanje aktivnosti Ca^{2+} v lečnem epitelu in ne koncentracije. Vzrok je lažje merjenje prostega Ca^{2+} v celici kot pa celotne koncentracije v celici, pa tudi dejstvo, da se Ca^{2+} v prosti obliki v citosolu pojavlja v zelo kratkem časovnem obdobju. Večino časa je vezan oz. spravljen v celičnih organelih. Prosta citosolna aktivnost je zato tista, ki je biološko bolj relevantna.

V realnih raztopinah se aktivnost raztopine razlikuje od koncentracije, saj delci topjenca vstopajo v interakcije med seboj in z delci topila, zato vsi delci ne delujejo samostojno. Aktivnost je efektivna koncentracija snovi v raztopini in je proporcionalna koncentraciji (izraženi v mol/l). Velja enačba (3).

$$a = \gamma x c \quad \dots (3)$$

Tu je a = aktivnost, γ = aktivnostni koeficient in c = koncentracija.

Aktivnostni koeficient ni konstanta in v odvisnosti od koncentracije raztopine zavzema vrednosti od 0 do 1 (1 = v idealnih raztopinah in neskončno razredčenih realnih raztopinah). Določimo ga lahko s pomočjo koligativnih lastnosti. Pri neelektrolitih je γ razmerje med izmerjeno vrednostjo koligativne lastnosti in izračunano vrednostjo koligativne lastnosti; uporabimo lahko katerokoli koligativno lastnost.

2.6 RAZISKAVE NA LEČNEM EPITELU

2.6.1 Načini priprave preparata lečnega epitela

Naravni cikel epitelne celice je delitev in diferenciacija do končnega fenotipa tkiva. Zato je epitelne celice težko obdržati v kulturi nediferencirane. Starejši kot je darovalec celic, težje je vzdrževati uspevajočo kulturo. Ko gojimo lečne epitelne celice v kulturi, se sčasoma postopno zmanjša sinteza kristalinov, in celice lahko zaidejo iz pleuripotentnega stanja, kar vodi v diferenciacijo lamelnih celic. Če pa zarodne lečne celice gojimo s premišljenimi počasnimi prehodi, pa jih lahko vzdržujemo v kulturi dlje. Te celice nepretrgano sintetizirajo α B-kristalin in njegova ekspresija se celo povečuje. To je marker diferenciacije lamelnih celic. Lečni epitel izloči sam svoj kapsularni material v kulturi. Lečne celice gojene na kapsuli obdržijo svojo zmožnost sinteze α B-kristalina (Bhat, 2001).

Rae JL in Rae JS (1992) sta uporabila sveže človeške leče, ki sta jih z mikrodissekcijo odvzela ljudem 6 do 24 ur po smrti. Kapsulo z monoslojem epitela sta položila v raztopino z 0,125% kolagenazo (tip IV) in 0,05% proteazo (tip XXIV) v 10 ml fiziološke raztopine Na^+ -aspartata z nizkim Ca^{2+} in pH 7,35 ter inkubirala za 1,5 do 2 uri na sobni temperaturi. Nato sta kapsulo sprala v 5 ml fiziološke raztopine. Celice sta odstranila s kapsule s tritracijo s pipeto. Raztopino s celicami sta centrifugirala 3 - 5 minut pri 350 g, zamenjala supernatant s svežo fiziološko raztopino in celice spet resuspendirala.

TenBroek in sod. (1994) so za raziskavo medcelične komunikacije uporabili leče sveže zaklanih 1 leto starih ovc. Zrkla so po hlajenju na ledu (do 3 ure) sprali, prenesli v sterilno posodo in namočili v 95% etanol. Lečo so pomočili v hladen, sterilni HBSS (Hank's solna raztopina) z dodanimi 6 ml 0,4% tripsina 30 minut pri 37 °C. Suspenzijo celic so centrifugirali pri 239 g za 15 minut, supernatant odlili, celice pa spet raztopili v M199 z 10% fetalnega zarodnega seruma (FCS), 100 i.u./ml penicilina in 100 μM streptomicina do gostote 5×10^5 celic/ml. 2 ml te suspenzije so dali v petrijevko in jo pustili 48 ur pri 37 °C in 5% CO_2 , da so se celice sprijele. Kulturo celic so gojili na stekelcih s poliornitinom.

Churchill in sod. (1996a, 1996b, 1998, 1999) so podobno pripravili primarne kulture celic, izolirane iz ekvatorialne regije sveže leče. Šest leč so potopili v 6 ml HBSS brez dodanega Ca^{2+} ali Mg^{2+} in odstranjenima z 2,5 mg/ml tripsina za 15 minut. Dodali so 40 ml z ledom hlajene fiziološke raztopine za ovce, da so upočasnili reakcijo. Raztopina je bila trituirana 20 do 30 krat. Celice so centrifugirali (230 g za 4 minute) in ponovno raztopili na gostoto 5×10^5 celic/ml v M199 z 10% FCS in antibiotikoma. 2 ml te celične suspenzije so vlili v petrijevke s poli-D,L-ornitinom (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Celice so rasle v tem mediju na 37 °C in vlaženi atmosferi s 5% CO_2 5 - 28 dni. Ker so se nekatere celice spremenile v lamelne celice, so uporabili za raziskave le celice, ki so bile takoj podobne epitelnim.

Eckert in sod. (1998) so za raziskave tokov v leči podgane uporabili lamelne celice. Izpreperirali so jih iz leč 3 - 5 dni starih Wistar podgan. Leče so v minimalnem mediju inkubirali 30 minut pri 37 °C, prenesli v sveže petrijevke s fiziološko raztopino za podgane z EDTA in jih postavili pod secirni mikroskop. Kapsulo so odstranili s prelomom na posteriorni strani in nato počasnim lupljenjem z ostrimi kleščami.

Blakely in sod. (2000) so za raziskave rasti in diferenciacije uporabili primarno kulturo človeških lečnih celic 18 tednov starih prenatalnih leč. Celice so gojili na ekstracelularnem matriksu iz epitela goveje roženice. Pred poskusom so celice rasle v rastnem mediju z malo glukoze, 15% FCS, 50 µg/ml gentamicina, 2,5 µg/ml amfotericina B in 5 ng/ml fibroblastnega rastnega faktorja pri 37 °C in 10% CO₂. Po spiranju s fosfatizirano solno raztopino (PBS) brez Mg²⁺ in Ca²⁺ so jih tripsinizirali 30 sekund na 37 °C s 0,05% tripsinom in 0,02% versenom. Po nevtralizaciji tripsina so celice nežno premešali in prešteli.

Collison in sod. (2000, 2001) so uporabili HLE-B3 celično linijo človeških epitelnih celic in sveže človeške leče (NHLECs). Celična linija je rasla v Eagle's minimalnem esencielnem mediju (EMEM) z dodatkom 20% FCS pri 37 °C in 5% CO₂. Preden so dosegle konfluentno rast, so jih tripsinizirali, prešteli in jih pri gostoti 1 x 10³ celic/100 µl posejali v 10% EMEM. Celice so nato uporabili za opazovanje Ca²⁺ v roku šestih dni. Sveže človeške leče pa so izpreparirali iz donorskih oči 36 ur po odstranitvi roženice med operacijo. Epitel so ločili od preostalih delov lamelnih celic z umetnim vodnim medijem (AAH) pH 7,25 pri 30 °C. Donorji so bili stari 50 ali več let. Wang in sod. (2003) so prav tako uporabili kulture HLE-B3 celic, nesmrtne linije transformiranih celic z opičjim virusom (SV)-40. Gojili so jih z 20 µg/ml gentamicina.

Sanders in Parker (2002) sta uporabila celično kulturo piščančjih lamelnih celic. Jajca z zarodki so bila različno dolgo inkubirana pri 38 °C. Leče sta prerezala na štiri dele: centralni lečni epitel, ekvatorialni lečni epitel, periferno regijo površinskih lamelnih celic in jedro leče. Leče sta tripsinizirala pri 38 °C v 0,1% tripsinu, brez Ca²⁺ in Mg²⁺ 20 minut oz. dokler niso bile vse lečne kapsule prelomljene. Celice sta ločevala s ponavljačim pipetiranjem, odstranjevala supernatant in raztopljal spet v M199 z 10% FCS in gentamicinom. Opazovala sta jih pod konfokalnim mikroskopom.

Bontseev in sod. (2003) so uporabili sveže goveje leče. Inkubirali so jih v M199 s 5,96 g/l HEPESa, 2,2 g/l Na₂CO₃, 0,1 g/l L-glutamina, 7 ml/l 1 N NaOH, 10 ml penicilina in streptomicina ter 3% dializiranega FCS pri 37 °C in 4 - 5% CO₂. Leče, ki so v 24 urah postale motne, so odstranili. McNulty in sod. (2004) so opazovali svežo roženico in lečo. Povprečna teža leče je bila 2 g, ekvatorialni premer 16,6 mm in debelina 11 mm.

2.6.2 Meritve znotrajceličnega kalcija

Mnogo zunajceličnih signalov je povezanih s porastom $[Ca^{2+}]_i$ v citosolu. V posameznih celicah Ca^{2+} naraste, to pa lahko zaznamo časovno kot oscilacijo ali prostorsko kot valove Ca^{2+} . V skupinah celic, ki so med sabo spete s presledkovnimi stiki, lahko te valove opazujemo med celicami. Ti valovi $[Ca^{2+}]_i$ opravljajo procese kot je npr. informacijsko procesiranje v živčnih celicah (Churchill in Louis, 1998).

Porast $[Ca^{2+}]_i$ z aktivacijo njegovih znotrajceličnih zalog povzroči mnogo zunajceličnih signalov. Pri najbolje poznanem mehanizmu izpusta Ca^{2+} je sukundarni sporočevalec IP_3 , ki aktivira Ca^{2+} kanale v endoplazemskem retiklu. Tudi ciklična ADP-riboza (cADPR), ki deluje na rianodinske receptorje, aktivira Ca^{2+} zaloge, čeprav ta mehanizem ni tako dobro raziskan. Zaloge Ca^{2+} so dokazali zaradi njihove občutljivosti na različne agense. Večina celic vsebuje bazene Ca^{2+} , ki so občutljivi na thapsigargin (blokator SER Ca^{2+} -ATP-aze oz. črpalke za Ca^{2+} v ER-u) in ionomicin. Znotraj celice je razdeljen med različne kompartmente, ki so jih odkrili z različnimi barvili, občutljivimi na Ca^{2+} (Churchill in Louis, 1999).

Churchill in sod. (1996a, 1996b, 1998) so merili $[Ca^{2+}]_i$ v lečnem epitelu ovce. Celice so naložili z 1 μM barvilm fura-2 acetoksimetilnim estrom (AM) in M199 z FCS pri 22 °C v temi 20 - 40 minut. Nato so jih trikrat sprali z raztopino HBSS z 10 mM HEPES, pH 7,2. Petrijevke s celicami so opazovali pod epifluorescentnim mikroskopom. Uporabili so x40 objektiv z numerično aperturo 1,3 in imerzijsko olje. $[Ca^{2+}]_i$ so določili z metodo razmerij, ki je temeljila na *in vitro* kalibraciji. Barvilo so eksitirali izmenično pri 340 in 380 nm, fluorescenco pa merili pri 510 nm. Odboj in senčenje ozadja so popravili pred izračunom razmerij na slikah. Celice so vzdržili mehansko (1996a) ali s Ca^{2+} , IP_3 , cADPR ipd. (1996b, 1998). Za izračun koncentracije so uporabili enačbo (4).

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times [(R - R_{min}) / (R_{max} - R)] \times (R_{min} / R_{max}) \quad \dots (4)$$

Agoniste sta Churchill in Louis (1996b) dodajala s pipeto kot 1 ml 2x osnovne raztopine s HBSS-H v že prisoten 1 ml HBSS-H v petrijevki. Sprala sta ga dvakrat z odstranitvijo raztopine v petrijevki do prostornine ~ 0,3 ml in dodatkom 5 ml HBSS-H. Nadaljevala sta perfuzijo 10 minut s pretokom 1 ml/minuto. Ko je agonist izzval upadajoče manjše poraste Ca^{2+} , ločene vsaj 6 minut, sta jih dodajala v razmaku vsaj 15 minut, da se je prvotno stanje celic povrnilo. Pri izdelavi krivulje koncentracijskih odgovorov sta agoniste dodajala posamezno od najmanjše do največje koncentracije, da sta zmanjšala desenzitizacijo.

Moč kompetitivnih agonistov sta izrazila kvantitativno z meritvijo pA_2 , negativnim logaritmom molarne koncentracije agonista, ki zahteva koncentracijo agonista, ki jo je

treba podvojiti, da dosežemo pravi odgovor. pA_2 je meritev afinitete agonista za receptor, ki jo lahko primerjamo s pKi , vendar je pA_2 osnovan na funkcionalnih podatkih. Izračunala sta ga iz ene koncentracije agonista z uporabo Schildove enačbe (5),

$$pA_2 = -\log [B / (r - 1)] \quad \dots (5)$$

kjer je B koncentracija agonista in r koncentracijsko razmerje. Vendar v njuni raziskavi ACh skoraj ni povzročil dviga $[Ca^{2+}]_i$ v celicah (le v 3%) (Churchill in Louis, 1996b).

Mnogo poskusov in teoretičnih raziskav je bilo narejenih na sporočevalcih, ki povzročijo znotrajcelične in medcelične valove Ca^{2+} . Glavni kandidati za te sporočevalce so IP_3 in Ca^{2+} , saj sta obe molekuli dovolj majhni, da prehajata preko presledkovnih stikov (< 1 kDa) in oba lahko sprostita Ca^{2+} iz znotrajceličnih kalcijevih zalog. V mehansko vzdrženih epitelnih celicah je sporočevalec verjetno IP_3 , saj inhibicija tako IP_3 sinteze kot vezave IP_3 na svoj receptor prekineta medcelične kalcijeve valove (Churchill in Louis, 1998).

Leta 1999 sta Churchill in Louis ovčje lečne celice inkubirala s 6 μM mag-fura-2 barvilkom za 1 uro pri 37 °C. Nato sta celice sprala trikrat s HBSS-H in inkubirala 20 minut pri 37 °C, da sta pospešila popolno hidrolizo AM estra. Celice sta opazovala pod invertnim epifluorescentnim mikroskopom x40, 1,3-NA objektivom z imerznim oljem. Mag-fura-2 sta eksitirala s svetlobo iz 50 W živosrebrne obločne žarnice menjaje s 340 ali 380 nm. Fluorescentno emisijo pri 510 nm sta snemala s kamero. Celice sta naredila permeabilne z raztopino s pomanjkanjem ATP in vsebnostjo 50 $\mu g/ml$ saponina ali 10 - 15 $\mu g/ml$ digitonina. Prosto koncentracijo Ca^{2+} sta preračunala na 300 nM. Ko je 75% vseh celic pokazalo zmanjšanje fluorescence zaradi izgube citosolne mag-fura-2, sta detergent izprala z raztopino z dodatkom ATP. Uporabila sta kopel, ki je simulirala znotrajcelično raztopino (visok K^+). Slike sta posnela vsake 30 sekund, da sta zmanjšala bledenje barvila.

Wang in sod. (2000) so preiskovali lamelne celice podgan na vlogo od Ca^{2+} odvisne proteaze na globalizacijo. Meritve $[Ca^{2+}]_i$ lamelnih celic so izvedli z barvanjem s Fluo-3-AM barvilkom. Lamelne celice so inkubirali z 10 μM barvilkom za 3 ure na 37 °C v HES raztopini. Nato so lamelne celice položili na dno petrijevke v različne raztopine. Fluorescenco (F) celic so merili pri eksitacijski valovni dolžini 490 nm in emisijski valovni dolžini 520 nm. Maksimalno fluorescenco (F_{max}) so določili z dodatkom 10 μM ionofora A23187, minimalno F_{min} pa z meritvijo fluorescence po zatrtju z dodatkom 2,0 mM $MnCl_2$. $[Ca^{2+}]_i$ so izračunali po enačbi (6).

$$[Ca^{2+}]_i = K_d [(F - F_{min}) / (F_{max} - F)] \quad \dots (6)$$

Uporabljena K_d za izračun je bila 400 nM in predstavlja disociacijsko konstanto Ca^{2+} vezanega na barvilo.

Rhodes in sod. (2003) so merili $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pri človeku. Lečo (celotno) so »naložili« s 3 μM fura-2 barvilom v esterski obliki (fura-2 AM) za 40 minut pri 35 °C. Lečo so spirali naslednjih 20 minut tako, da so jo položili s sprednjo površino navzdol v petrijevko in oblivali s fiziološko raztopino (35 °C). Razmernostno merjenje $[\text{Ca}^{2+}]_i$ so izvedli z epifluorescentnim mikroskopom. Celice so vzbujali menjajoče s svetlobo valovne dolžine 340 in 380 nm, emisijo pa zapisali s CCD kamero pri 510 nm vsaki 2 sekundi. V ozadju ali v jedru leče niso zaznali nobenega signala. Napetost leče so merili z vstavitvijo steklene mikropipete v kortikalno lamelno celico na zadnji strani leče. Mirovni membranski potencial leče in napetostne lastnosti odgovorov so bile nespremenjene pri merjenju $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in podobne kot pri drugih raziskavah.

Naše raziskovalno delo je najbolj podobno raziskavama Collisona in sod. (2000, 2001), ko so spremembe $[\text{Ca}^{2+}]_i$ primerjali med celično kulturo in svežimi celicami. Oba tipa celic so izpostavili estrski AM obliki 3 μM fure-2 za 40 minut. Nato so jo spirali z AAH 20 minut, da so omogočili popolno razestracijo. Uporabili so epifluorescentni mikroskop in x20 objektiv. Celice v kulturi so bile dovolj velike, da so lahko snemali vsako posebej, medtem ko so sveže celice bile za to premajhne in so uporabili 4 do 5 celic skupaj. Celicam so dovajali perfuzijo AAH in poskusnih raztopin pri 35 °C v vodni kopeli. Vzbujali so jih izmenjaje z valovnima dolžinama 340 nm in 380 nm. Nastalo fluorescentno emisijo obeh valovnih dolžin so zmerili s CCD kamero pri 510 nm vsaki 2 sekundi. Po odštetju svetilnosti ozadja in umeritvi, so razmerje fluorescenc pretvorili v pravo koncentracijo kalcija z enačbo (7),

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d [(R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)] (S1 / S2) \quad \dots (7)$$

kjer je K_d disociacijska konstanta, R_{\min} razmerje fluorescenc v raztopini brez Ca^{2+} , R_{\max} največje razmerje fluorescenc in $S1 / S2$ je fluorescentna intenziteta. Umeritev so izvedli s 5 μM ionomicinom in raztopino AAH brez Ca^{2+} ter 1 mM EGTA, 1 μM thapsigarginom, 150 mM KCl in 100 μM inhibitorjem membranske ATPaze, W7. To je omogočilo meritev v pogojih brez Ca^{2+} . Za meritev pri visoki $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pa so iste celice izpostavili še raztopini z 10 mM Ca^{2+} . Faktor $S1 / S2$ je fluorescentna intenziteta pri 380 nm, ko je vso barvilo v nevezani obliki, deljeno s fluorescentno intenzitetom, ko je barvilo v vezani obliki.

Na ta način so umerili $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pri svežem izoliranem epitelu v sprednji centralni regiji leče. Kalibracija celic v ekvatorialni regiji pa ni uspela, ker nismo mogli določiti R_{\min} , če je postopek trajal več kot eno uro.

Različne agoniste sta Collison in Duncan (2000, 2001) dodajala preparatom v različnem vrstnem redu. Vrstni red dodajanja ni vplival na odgovorne amplitude posameznih agonistov. Med vsako aplikacijo je bilo 15 minut zamika, ker so tako narekovali že testni agensi. ACh je povzročil porast $[Ca^{2+}]_i$ z različnimi vrhovi v obsegu 100 nM do 100 μM tako v kulturi kot v svežih celicah. ACh so dodajali kot 30 sekundni puls.

Celice ekvatorialne regije leče so zaznali kot fluorescentne površine široke okoli 50 μm . 30-sekundni puls ATP-ja (10 μM) je povzročil spremembo $[Ca^{2+}]_i$, ki je trajala okoli 100 s (Collison in Duncan, 2001).

Sprednje celice v leči so imele $[Ca^{2+}]_i$ okoli 100 nM in so močno odgovarjale na ACh, ATP in histamin, vendar ne na adrenalin, EGF ali TGF α . Celice na ekvatorialni coni leče so močno odgovorile na ATP in histamin, vendar zelo slabo na ACh in adrenalin (Collison in Duncan, 2001).

Lečna kapsula ima visoko aktivnost ACh-esteraze in je debelejša na ekvatorialnem delu kot v centralni coni. Da bi dokazali, da večja esterazna aktivnost povzroči manjši odgovor na ACh v ekvatorialnem delu, so uporabili nehidroliziran analog ACh – karbahol (CCh). V sprednji centralni coni je CCh izzval robusten tok Ca^{2+} , v ekvatorialni coni pa večji tranzient. Vendar je v obeh regijah izzval nižji odgovor kot ACh. To je posledica tega, da ima CCh pri enaki koncentraciji kot ACh manjšo zmožnost aktivacije muskarinskih receptorjev kot ACh (Collison in Duncan, 2001).

2.6.3 Ugotavljanje vloge mitohondrijev v epitelu

Mitohondriji so celični organeli z dvema membranama, ki proizvajajo energijo v obliki ATP z zelo učinkovitim procesom oksidativne fosforilacije, ki se odvija na notranji mitohondrijski membrani in obsega pet podenotnih encimskih kompleksov, I do V. Kompleksi I do IV sestavljajo elektronsko transportno verigo, ki oksidira vodikov ion. Pri tem sproščena energija se porabi za črpanje pozitivno nabitih protonov preko notranje membrane iz matriksa v medmembranski prostor, kar ustvari transmembranski elektrokemični gradient ($\Delta\psi_m$), ki deluje kot kondenzator. Energijo, ki je nakopičena v tem kondenzatorju, uporablja kompleks ATP sintaza za izdelavo ATP (Bantseev in sod., 2003).

McNulty in sod. (2004) so pri raziskavah parcialnega tlaka kisika v lečnem jedru opazovali tudi mitohondrije. Za odklop delovanja le teh so uporabili mitohondrijske inhibitorje v fiziološki raztopini. Uporabili so različne inhibitorje: miksotiazol, 3-NPA, natrijev azid in natrijev cianid. Da so se prepričali, da fluorescenten signal med poskusom izvira res iz lečnih mitohondrijev, so nekatere leče obdelali predhodno tudi s 100 μM CCCP, da so porušili mitohondrijski membranski potencial. Fluorescanca je takrat popolnoma izginila.

3 MATERIAL IN METODE DELA

3.1 MATERIAL

Epitelne celice smo dobili takoj po izolaciji iz očesa pri operaciji katarakte ali sive mrene. Uporabljali smo računalniško in programsko opremo raziskovalnega laboratorija Očesne klinike Kliničnega centra v Ljubljani in katedre za Fiziologijo živali Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Laboratorijska oprema: računalnik za avtomatsko upravljanje mikroskopa in kamere, mikroskop Axiovert S 100, hlajena kamera za snemanje (SensiCam PCO CCD imaging 12 BIT cooled imaging), inkubator (Innova CO – 48, Newbrunswick scientific), hladilniki in zamrzovalnik, laboratorijski pribor ter drugi pripomočki.

Programska oprema: MetaFluor V 4 6r 5, WinFluor V 3.1.8, ImageJ, Paint Shop Pro 7, Microsoft Excel, Microsoft Word, Microsoft PowerPoint...

Za inkubacijo celic smo uporabljali gojišče (90% osnovno gojišče – MEM + HBSS + L-glutamin – in 10% serum), za spiranje in medij med opazovanjem pa fiziološko raztopino s Ca^{2+} (preglednica 1) ali brez Ca^{2+} (preglednica 2). Za uravnavo pH fiziološke raztopine na 7,2 smo uporabili NaOH oz. HEPES.

Preglednica 1: Sestava fiziološke raztopine s kalcijem.

| spojina | NaCl | KCl | MgCl ₂ | NaH ₂ PO ₄ | NaHCO ₃ | CaCl ₂ | glukoza | HEPES |
|---------|-------|-----|-------------------|----------------------------------|--------------------|-------------------|---------|-------|
| mM | 131,8 | 5 | 2 | 0,5 | 2 | 1,8 | 10 | 10 |

Preglednica 2: Sestava fiziološke raztopine brez kalcija.

| spojina | NaCl | KCl | MgCl ₂ | NaH ₂ PO ₄ | NaHCO ₃ | CaCl ₂ | glukoza | HEPES |
|---------|-------|-----|-------------------|----------------------------------|--------------------|-------------------|---------|-------|
| mM | 131,8 | 5 | 2 | 0,5 | 2 | 0 | 10 | 10 |

Kot sredstvo za odstranitev Ca^{2+} iz petrijevke med poskusom smo uporabili 1 mM EGTA (etilen glikol tetraacetna kislina, helator kationov), ki smo ga primešali fiziološki raztopini brez Ca^{2+} pred uporabo. Za detekcijo dogajanja med poskusom smo celice inkubirali z barvilom fura-2. Furo-2 smo v osnovi raztoplili v DMSO.

Ligand za nikotinske in muskarinske receptorje, ki sprožijo kaskado dogodkov in posredno odprejo tudi Ca^{2+} kanale, je ACh. Uporabljali smo 10 μM - 100 μM raztopino ACh v fiziološki raztopini s Ca^{2+} . Kot Ca^{2+} ionofor za ugotavljanje največje in najmanjše $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v celicah smo uporabili ionomicin (80 μM - 100 μM) raztopljen v DMSO, kar pa iz neznanih razlogov ni delovalo, zato smo kalibracijo opustili.

3.2 METODE DELA

3.2.1 Priprava celic

Ker je celic v sveže izpreparirani leči dovolj za resne poskuse (velika gostota), poleg tega pa so ohranjeni vsi naravnji presledkovni stiki med epitelnimi celicami in njihova bazalna membrana, smo se odločili za sveže preparate, ki odgovarjajo optimalno, podobno kot dejansko v očesu.

Tako smo dobili sveže kapsule očesnih leč v mediju od operacij sive mrene, ki jih je izvajal prof. dr. Marko Hawlina. Kapsule smo dali v inkubator za celične kulture, pri 37°C , 5% CO_2 in 100% zračni vlagi, do poskusa. Poskuse smo izvedli še isti dan, saj so starejše kapsule že kazale znake propada ali degeneracije celic.

3.2.2 Inkubacija in poskusi

3.2.2.1 Inkubacija s fluorescentnim barvilm fura-2

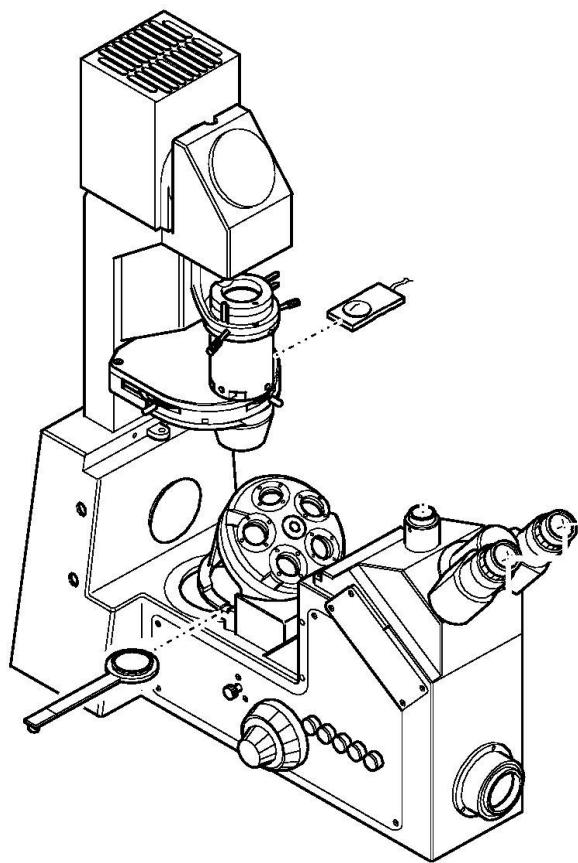
Kapsulo smo s pinceto potegnili iz stekleničke, v kateri je prišla iz operacijske sobe. Takoj smo jo položili v 2 ml osnovnega gojišča, ki smo ga prej prav tako inkubirala v inkubatorju, da ne bi bila sprememba temperature za celice prevelik šok. Gojišču smo dodali 2 μl 2 mM koncentracije barvila fura-2 raztopljenega v DMSO, rahlo pretresli in vrnili v inkubator za 25 do 45 minut, da se je barvilo razporedilo v celice. Kasneje smo ugotovili, da je krajša inkubacija že dovolj dobra in smo nadalje inkubirali le 25 minut.

Po inkubaciji smo sprali kapsulo dvakrat s 3 ml fiziološke raztopine s Ca^{2+} v sveži petrijevki, da se je nevezano barvilo spralo s preparata. V novo petrijevko z dodatnim notranjim prostorom smo dali 2 ml fiziološke raztopine s Ca^{2+} in vanjo položili kapsulo z epitelno bazalno membrano navzdol, da smo prosti raztopini izpostavili epitelne celice.

3.2.2.2 Poskusi z aplikacijo ACh in ionomicina

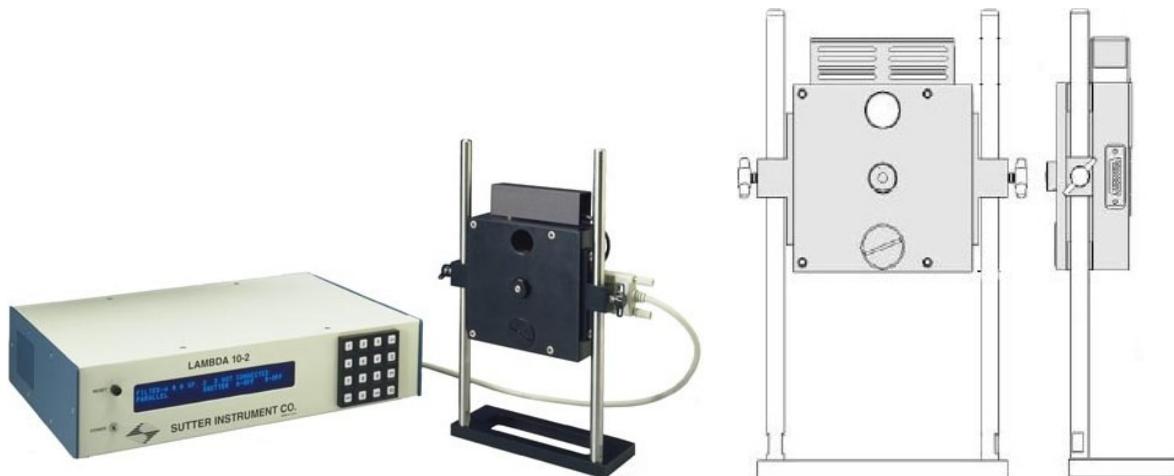
Petrijevko s kapsulo smo odnesli pod mikroskop (Axiovert S 100, Zeiss – slika 16). S pomočjo posebnega unikatnega podstavka smo namestili petrijevko pod fluorescentni mikroskop s kamero. S pomočjo mikromanipulatorja in posebno izdelane zanke iz s pomočjo gorilnika ukrivljene steklene mikropipete smo potisnili in imobilizirali kapsulo ob dno petrijevke.

Za opazovanje in meritve smo uporabili kombinacijo filtrov za fura-2, 40x objektiv (ekscitacija 340 oz. 380 nm, dikroik 490 nm in pa emisija 510 nm) in hlajeno CCD kamero visoke ločljivosti.



Slika 16: Mikroskop Axiovert S 100 (Zeiss, 2008).

Na računalniku smo poiskali sliko določenega odseka na kapsuli in s programom shranili slike poteka vsaki dve sekundi pri ekscitaciji z dvema valovnima dolžinama: 340 nm in 380 nm. Določili smo 700 ciklov po 2 x 1 sekundo menjavanja filtrov z menjalnikom filtrov (Sutter Lambda 10-2 – slika 17).



Slika 17: Menjalnik filtrov Sutter Lambda 10-2 (Sutter Instrument, 2008).

Začeli smo snemati poskus. Protokol poskusa je bil:

- pri 100. ciklu smo z injekcijo aplicirali 3 ml 100 μM ACh,
- pri 200. in 300. ciklu smo sprali ACh z 2 x 3 ml fiziološke raztopine s Ca^{2+} ,
- pri 400. ciklu smo dodali 3 ml 80 μM ionofora ionomicina v fiziološki raztopini brez Ca^{2+} in z EGTA,
- pri 550. ciklu smo spet dodali 80 μM ionomicin v 3 ml fiziološke raztopine s Ca^{2+} .

Ionomycin naj bi služil za umeritev fluorescence fure-2 pri najmanjši in največji $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Vendar se je izkazalo, da so bile spremembe $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oz. razmerja 340 nm / 380 nm zaradi aplikacije ionomicina v prisotnosti Ca^{2+} v fiziološki raztopini celo manjše kot ob aplikaciji ACh. Zato teh podatkov nismo uporabili za kalibracijo.

Tudi ionomicin se pripravlja v raztopini z DMSO, saj se v drugih raztopinah ne topi. Do koncentracije 10 mM smo osnovno raztopino mešali z DMSO, potem pa s fiziološko raztopino. Vsak poskus smo označili po datumu in zaporedni številki poskusa tistega dne.

3.2.3 Obdelava podatkov

Vsak poskus je tako vseboval 1400 slik s celicami. S programoma MetaFluor in WinFluor smo določili 17 do 25 polj na sliki, ki so približno ustrezala posameznim celicam (polja so bila določena tako, da je bilo v sredini vsakega od njih vidno jedro na sliki fluorescence pri ekscitaciji z 380 nm). Tako smo dobili splošno sliko sprememb fluorescence po celotnem preparatu. Intenziteto svetilnosti vsake točke vseh slik je računalnik ovrednotil, ter jih shranil kot tekstovno datoteko.

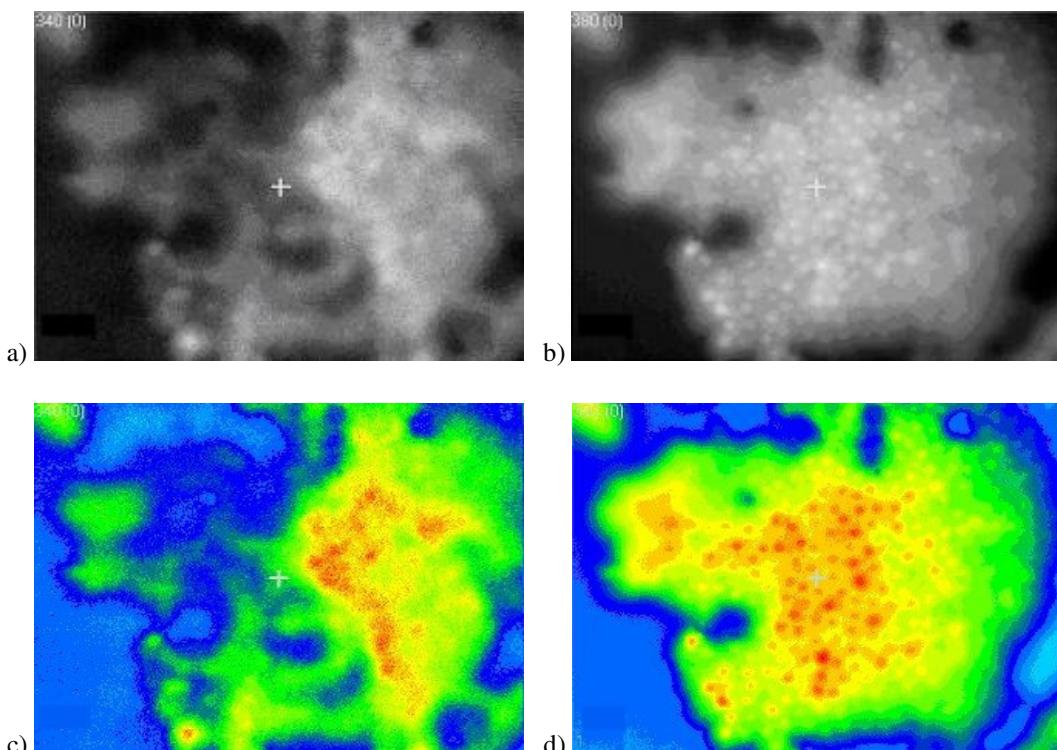
Podatke smo v Microsoft Excelu razvrstili v tabele. Vsem vrednostim obeh valovnih dolžin smo še odšteli fluorescenco ozadja in nato izračunali razmerje. Oblikovali smo različne grafikone in jih primerjali med seboj. S programom ImageJ smo zaporedne slike uredili v montaže slik in video datoteke za lažji prikaz.

Osredotočili smo se na prikaz rezultatov tako slikovno kot številčno. Izračunali smo povprečne vrednosti fluorescence in posplošili rezultate, da je lažje ovrednotiti dobljene odgovore, ter jih primerjati z rezultati v že opravljenih raziskavah.

4 REZULTATI

4.1 POSKUSI Z APLIKACIJO ACH IN IONOMICINA

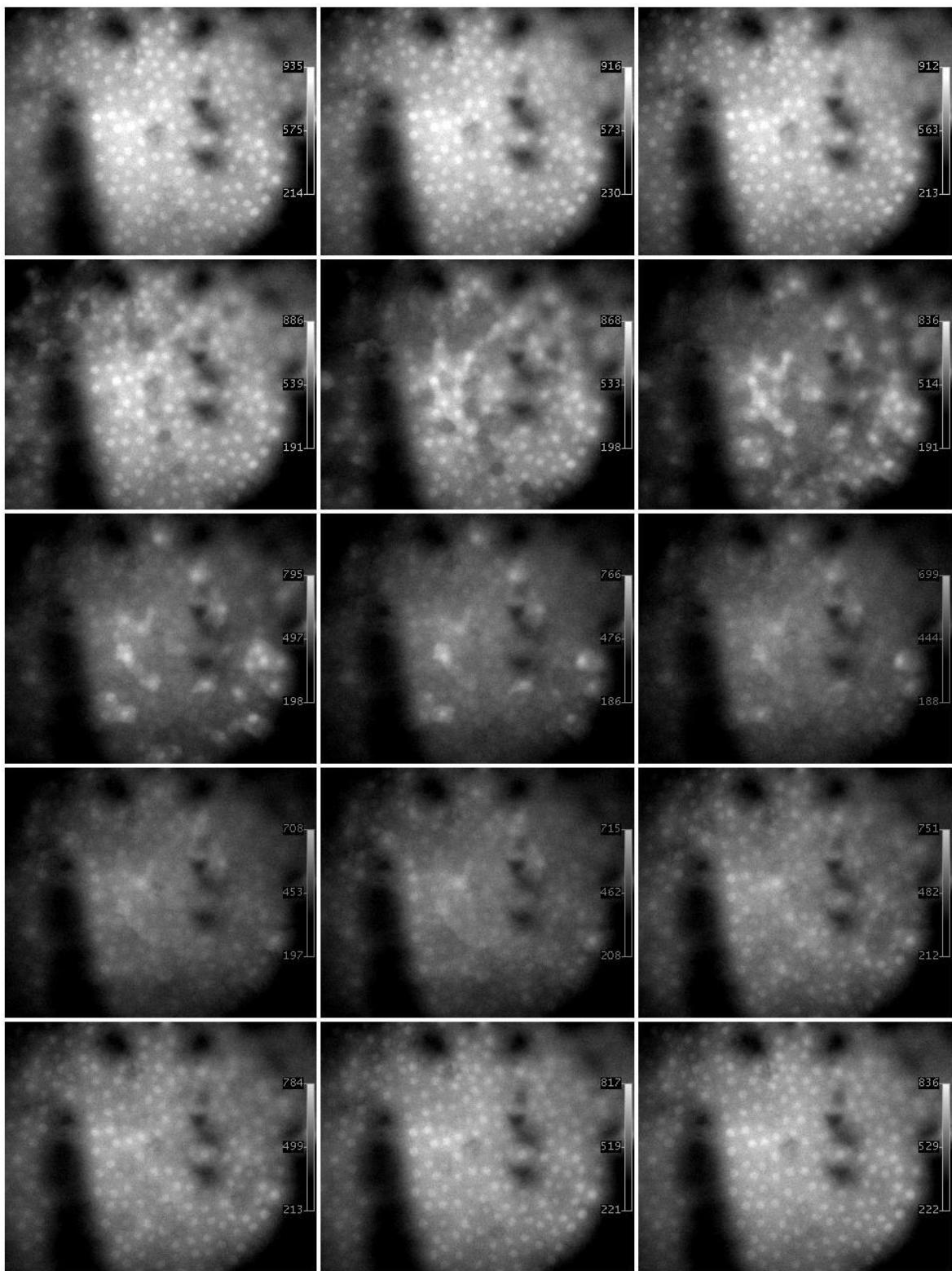
Pri izvedbi poskusov smo najprej posneli fotografije, ki so prikazovale fluorescirajoče celice. Ugotovili smo, da je tretiranje z barvilkom fura-2 uspelo, ter da v celicah najbolj sveti jedro. Verjetno se tam akumulira največ barvila. Fotografije pri 340 nm in 380 nm v sivini in v umetnih (računalniških) barvah so prikazane na sliki 18.



Slika 18: Fotografije poskusa 11 pri 340 nm in 380 nm (v sivini a) in b) ter v umetnih barvah c) in d)) pred aplikacijo ACh.

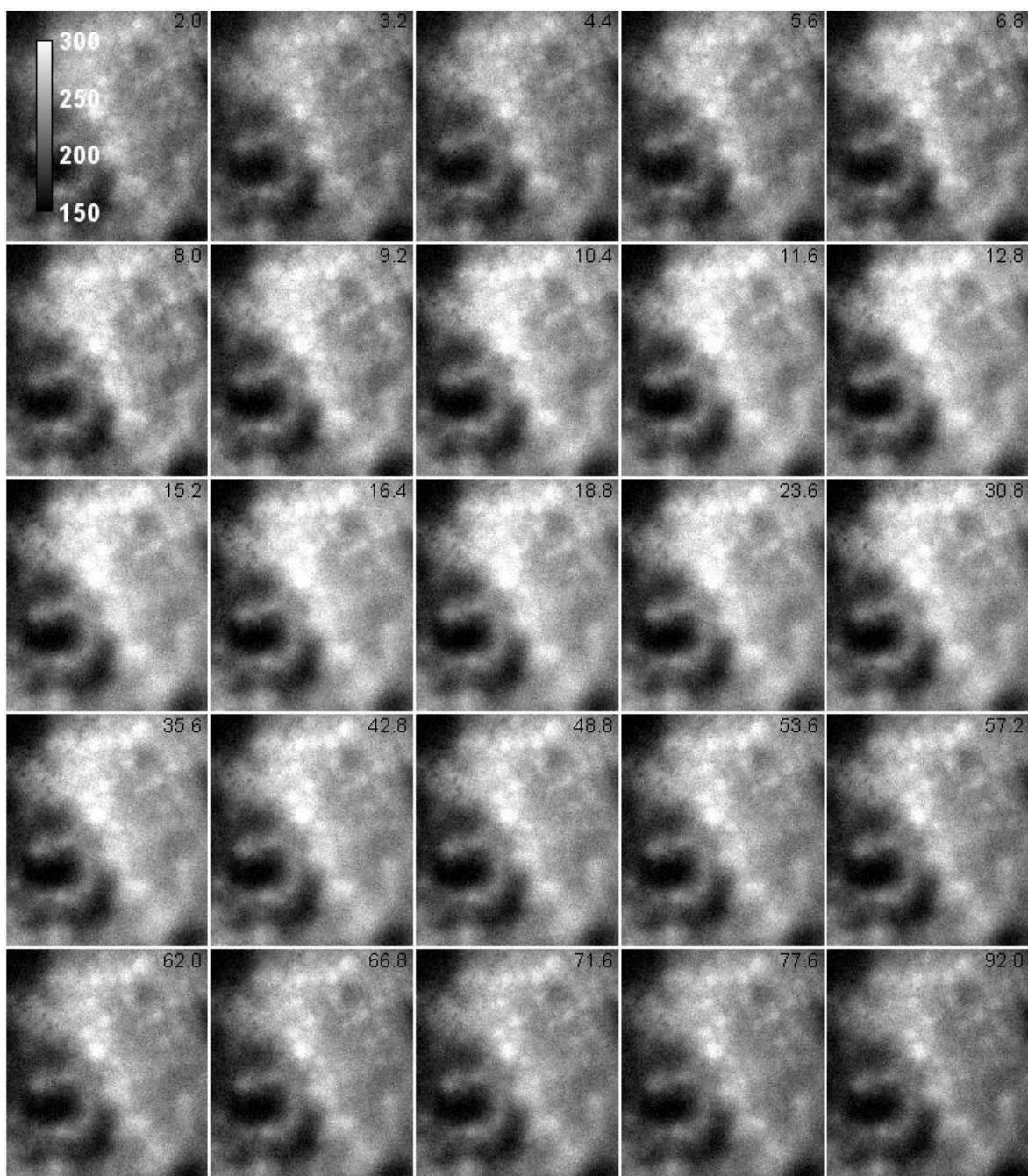
Nato smo izvajali poskuse z dodajanjem agonista ACh. Vsak poskus posebej smo tudi umerili z dodatkom ionomicina, ki bi moral brez Ca^{2+} v zunajcelični raztopini pokazati najmanjšo možno vrednost $[\text{Ca}^{2+}]_i$, pri dodatku Ca^{2+} pa največjo možno $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Iz neznanih razlogov ionomicin v nobenem poskusu ni izzval želene reakcije, saj je bil odziv mnogo prešibek, celo veliko manjši kot odziv na aplikacijo ACh. Zato smo se odločili, da končnih vrednosti ne bomo pretvarjali v dejansko $[\text{Ca}^{2+}]_i$, saj tako nimamo dovolj podatkov za uporabo enačbe (2).

Postopna sprememba fluorescence je bila najbolje razvidna na fotografijah pri 380 nm. Pri tej valovni dolžini se fluorescanca zmanjšuje pri povečanju $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Prikazujemo dva poskusa. Čas 0 s ustreza trenutku aplikacije ACh.



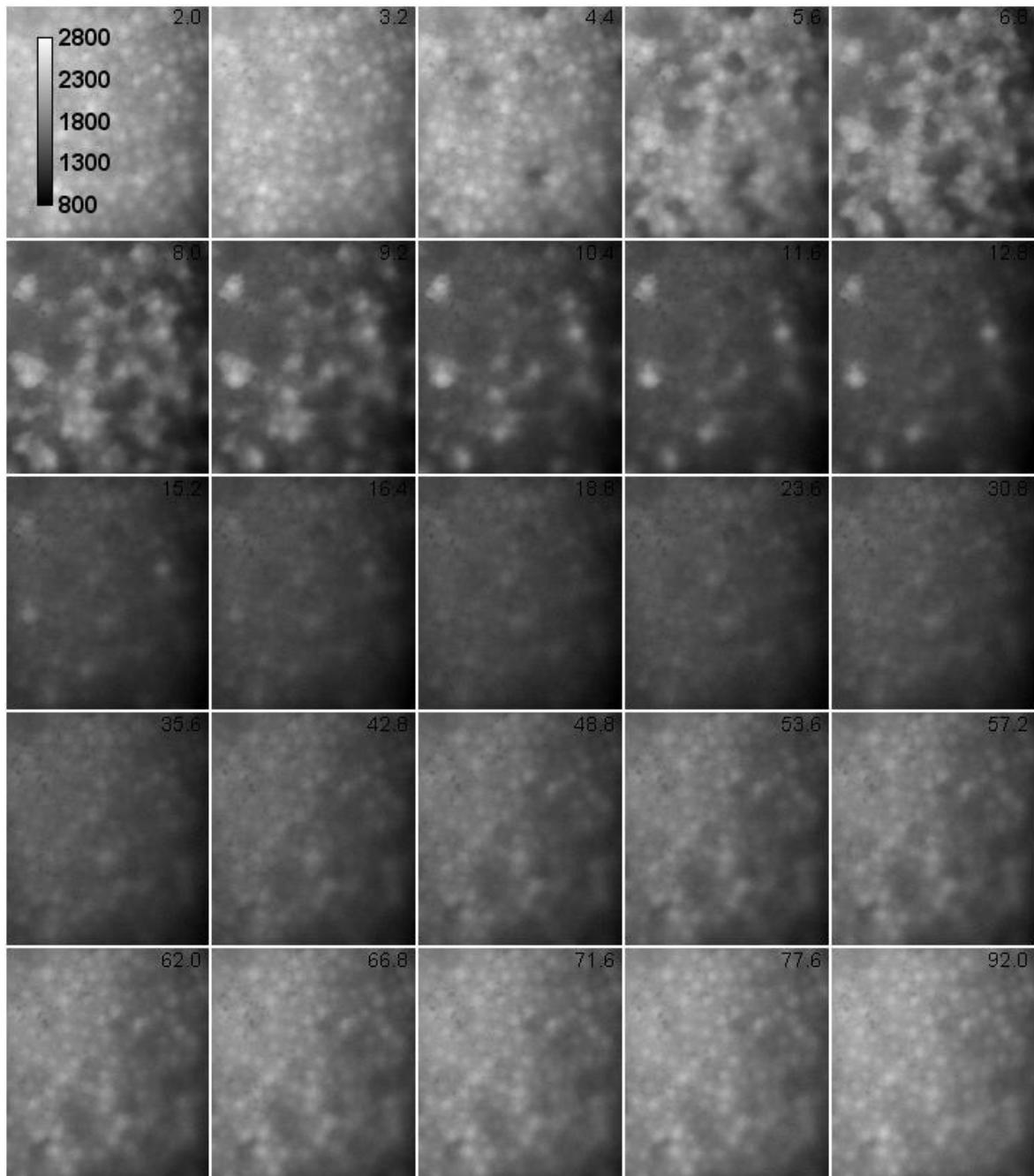
Slika 19: Fotografije poskusa 3 pri 380 nm med aplikacijo ACh. 1) pred aplikacijo; 2) pri 17,5 s; 3) pri 29,2 s; 4) pri 40,3 s; 5) pri 43,3 s; 6) pri 46,3 s; 7) pri 49,3 s; 8) pri 52,3 s; 9) pri 55,3 s; 10) pri 66,9 s; 11) pri 75,6 s; 12) pri 96,5 s; 13) pri 105,1 s; 14) pri 132,1 s; 15) pri 159,6 s. Slike si sledijo vodoravno.

Poskus 11 smo obdelali tako, da smo dobili zaporedja fotografij pri 340 nm in pri 380 nm v sivinah ter razmerja valovnih dolžin 340 nm / 380 nm v umetnih barvah, da je zvečanje razmerja (osvetlitev) po aplikaciji ACh bolj očitna. Čas v sekundah [s] je označen desno zgoraj na sličicah, čas 0 s ustreza trenutku aplikacije ACh. Kalibracijska skala levo zgoraj prikazuje umeritev fotografije glede na fluorescenco preparata.

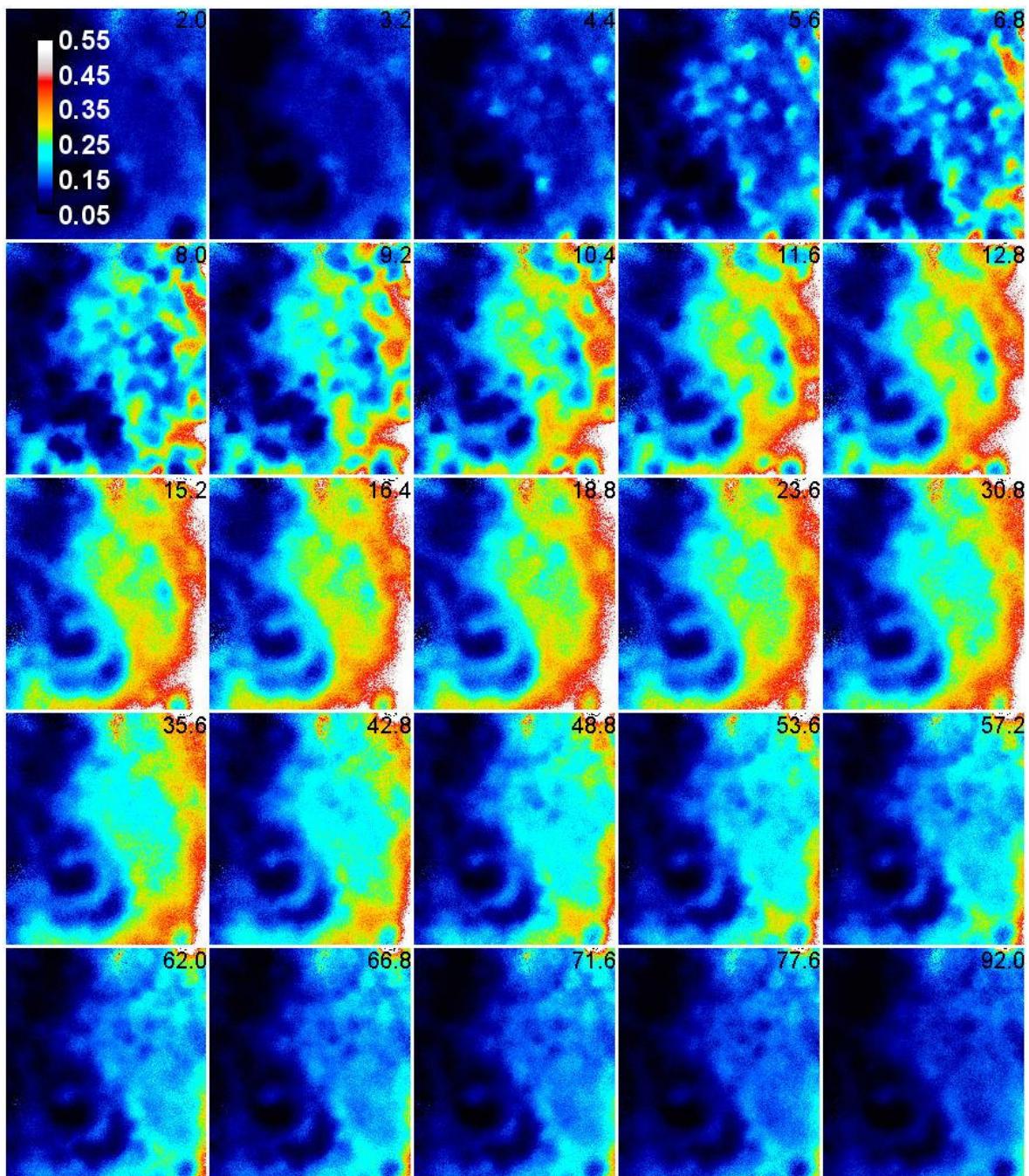


Slika 20: Fotografije poskusa 11 pri 340 nm med aplikacijo ACh. Čas je označen desno zgoraj v sekundah po aplikaciji ACh.

Pri seriji fotografij ekscitacije s 380 nm (slika 21) se dobro vidi zmanjšanje fluorescence fure-2 zaradi povečanja $[Ca^{2+}]_i$ po aplikaciji ACh.

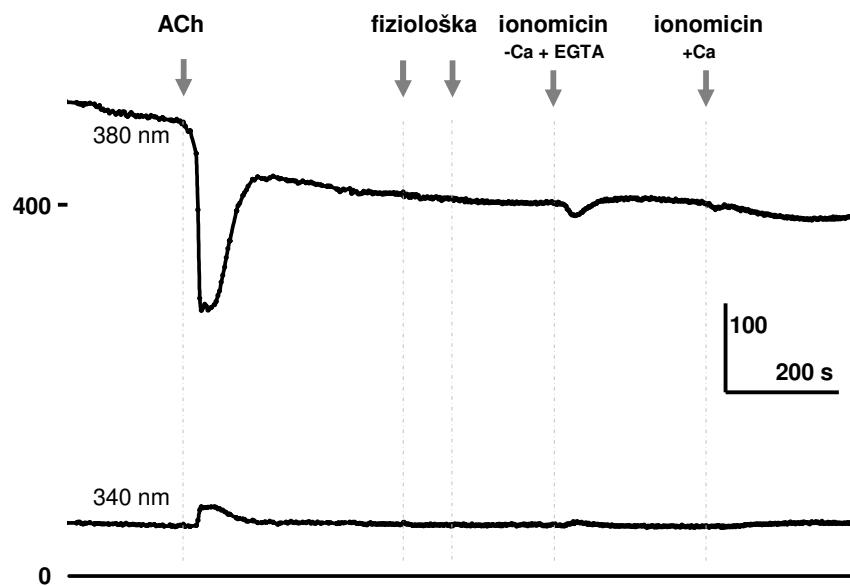


Slika 21: Fotografije poskusa 11 pri 380 nm med aplikacijo ACh. Čas je označen desno zgoraj v sekundah po aplikaciji ACh.



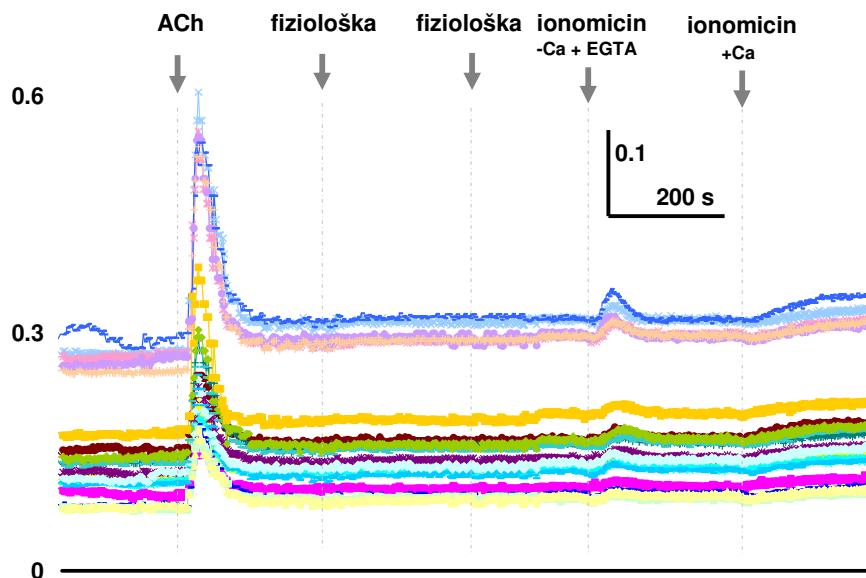
Slika 22: Fotografije razmerja valovnih dolžin 340 nm / 380 nm poskusa 11 med aplikacijo ACh. Čas je označen desno zgoraj v sekundah po aplikaciji ACh.

Niz podatkov smo s pomočjo programa Microsoft Excel preuredili v grafikone. Dobili smo podatke o fluorescenci preparata med poskusom. Vrednosti za eno točko pri 340 nm in 380 nm poskusa 3 so prikazane na sliki 23.



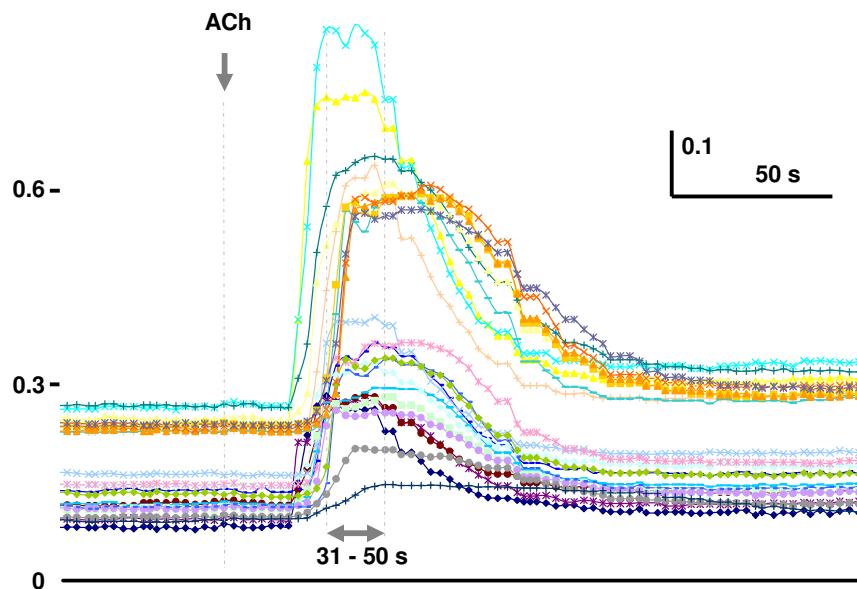
Slika 23: Fluorescencija preparata ob ekscitaciji s 340 nm in 380 nm v eni točki preparata.

V enem poskusu smo zajeli 17 do 25 točk, v katerih je računalnik odčital vrednosti in jih izpisal. Ker pa nas je zaradi nedelovanja ionomicina bolj zanimalo razmerje fluorescenc, smo izračunavali vrednost 340 nm / 380 nm. Grafikon razmerij v več točkah preparata je prikazan na sliki 24. Odgovor celic na ionomicin je mnogo premajhen glede na odgovor na ACh.



Slika 24: Razmerje fluorescenc pri poskusu 6 v več točkah na preparatu. Viden je vrh po dodatku ACh in spremembe po dodatku ionomicina.

Po dodatku ACh so celice na preparatu odgovorile zaporedoma in ne vse naenkrat. Za boljše razumevanje dogodkov smo izbrali točke na preparatu, katerih odgovor je malo zamknjen pri različnih celicah. Časovno različni odgovori so prikazani na sliki 25.



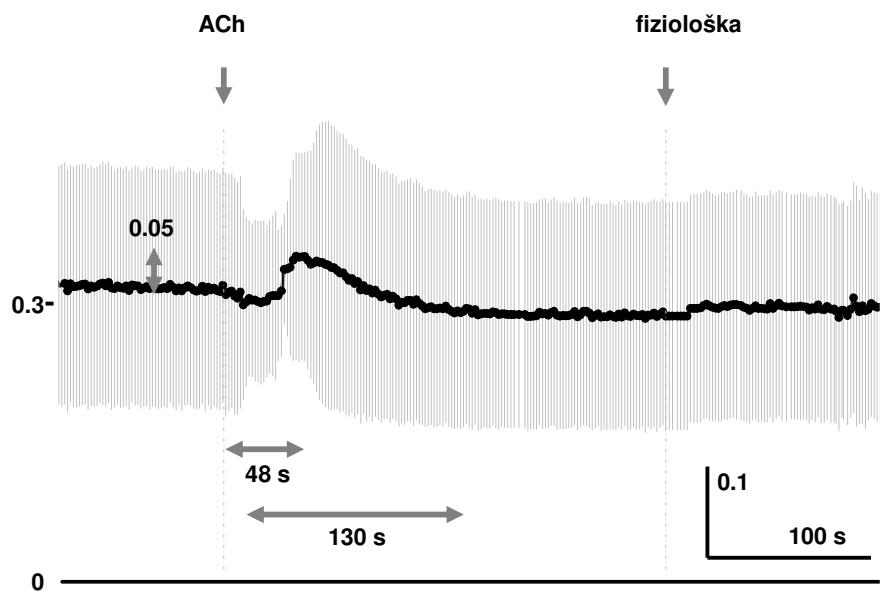
Slika 25: Odgovori celic na aplikacijo ACh v različnih točkah poskusa 3. Različne celice odgovorijo z različnim zamikom po aplikaciji.

Za lažjo predstavitev rezultatov smo izračunali povprečje fluorescenc izbranih točk na preparatu in njihovo standardno deviacijo SD. Izmerili smo tudi čas do največjega odgovora, višino odgovora in trajanje odgovora na aplikacijo. Ker umeritev z ionomicinom ni delovala, smo zadnji del podatkov izpustili, da se bolje vidi pomembnejši del z odgovorom na ACh. Grafikoni vseh izbranih poskusov so predstavljeni na slikah 26 - 35.

Vrh odgovorov (največji odgovor) je nadalje prav tako povprečen, saj iz slike 25 vidimo, da se gibljejo največji odgovori celic po 31 do 50 s, povprečje vseh točk pa je 47 s (opisano v nadaljevanju). Zato nas vrednosti v nadaljevanju ne smejo zavesti.

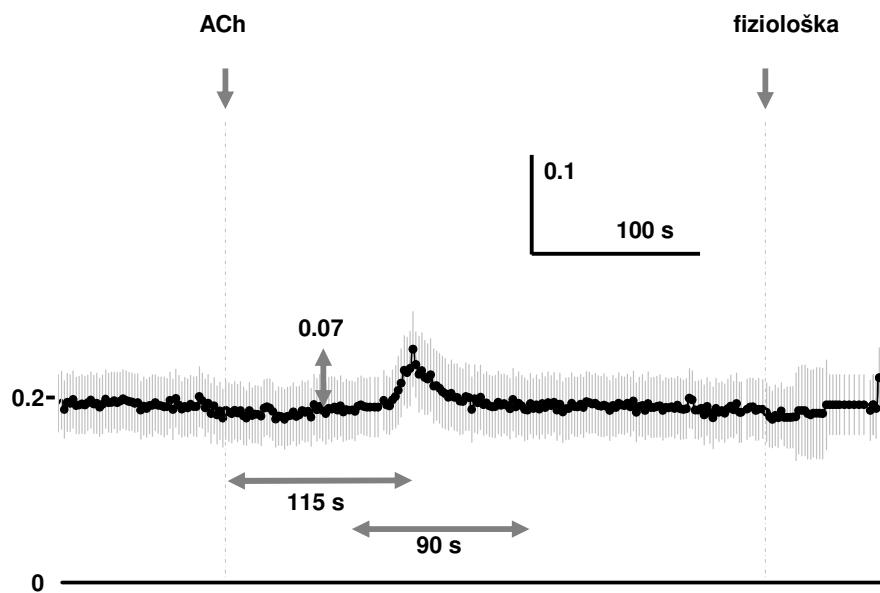
Na grafikonih so razmerja fluorescenc razporejena glede na časovno os in ne glede na številko cikla, saj se čas med cikli pri poskusih razlikuje zaradi nenatančnosti in zastarelosti strojne in programske opreme, s katero so bili poskusi vodenti in posneti. Zato se čas spiranja s fiziološko raztopino spreminja. Včasih zaradi večjih tehničnih težav nismo mogli izvesti spiranja po protokolu, ampak zamknjeno. To smo tudi označili sproti.

Poskus 1 (slika 26) je bil posnet med prvimi. Odgovor je slab, vendar razviden. Spiranje s fiziološko raztopino je bilo pri tem poskusu narejeno pri 250. in 300. ciklu, ker so bile težave s snemalno aparaturo.



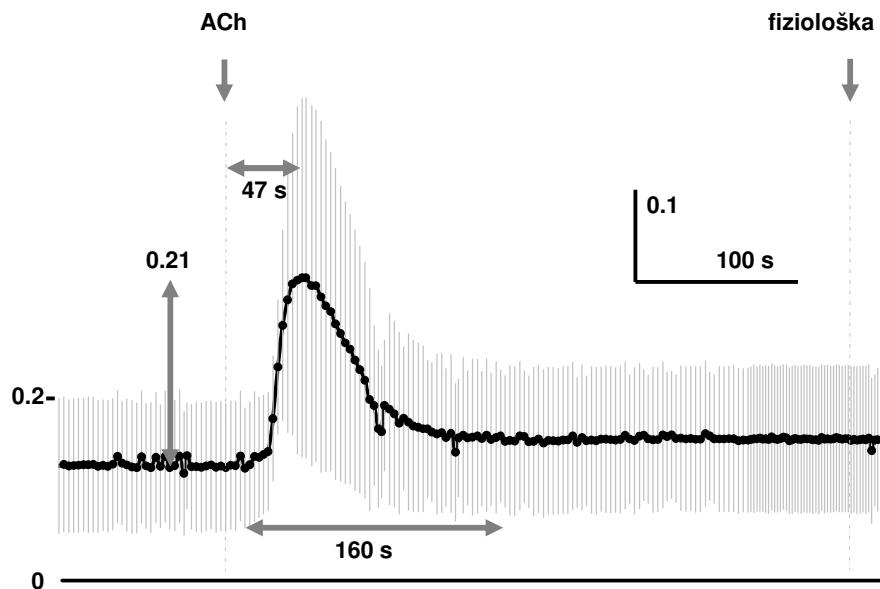
Slika 26: Povprečno razmerje fluorescenc, SD in izračunane vrednosti poskusa 1.

Odgovor pri poskusu 2 (slika 27) je precej zamaknjen od aplikacije ACh. Med imobilizacijo je potrebno kapsulo leče pravilno obrniti z epitelom navzgor, tu pa je verjetno prišlo do napake in je ACh zato dlje potoval do celic. Najverjetneje je bila kapsula tako poškodovana, da se ni dalo točno določiti, katera stran je prava. Spiranje je bilo pri 280. in 350. ciklu. Ta poskus zato v statistično obdelavo podatkov nismo vključili.



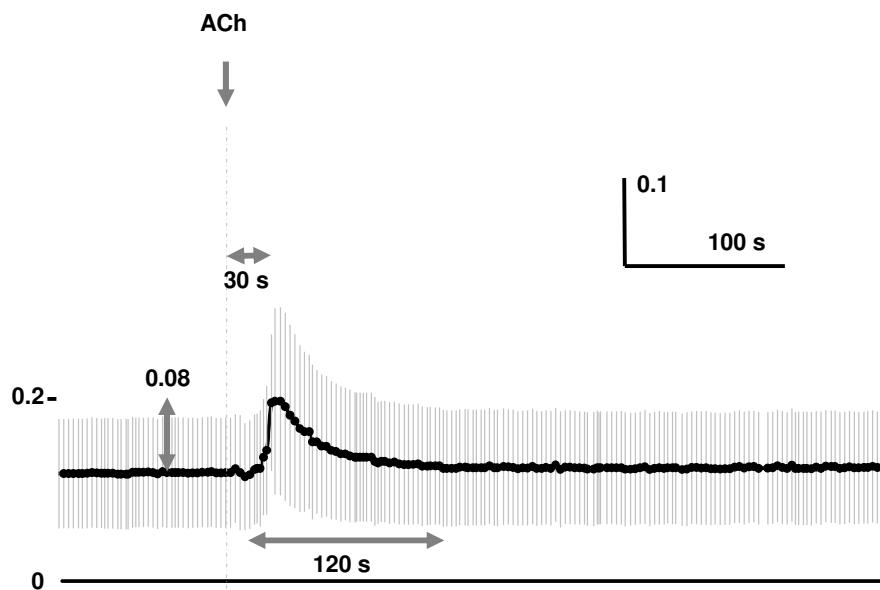
Slika 27: Povprečno razmerje fluorescenc, SD in izračunane vrednosti poskusa 2.

Najlepši in najvišji odgovor smo posneli pri poskusu 3 (slika 28), kljub temu, da so bile težave z računalnikom. Visok (celo najvišji) in najdaljši val povišane $[Ca^{2+}]_i$ v celicah je rezultat svežih in dobro oskrbovanih leč.

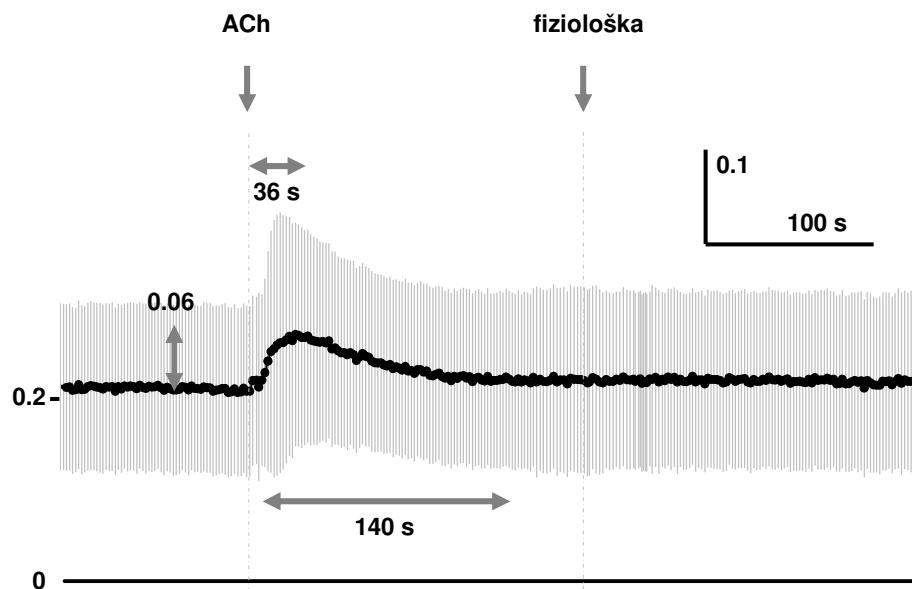


Slika 28: Povprečno razmerje fluorescenc, SD in izračunane vrednosti poskusa 3.

Odgovora poskusov 4 in 8 (sliki 29 in 30) sta malo slabša, vendar sta hitreje nastopila, trajala pa sta nekoliko manj časa.

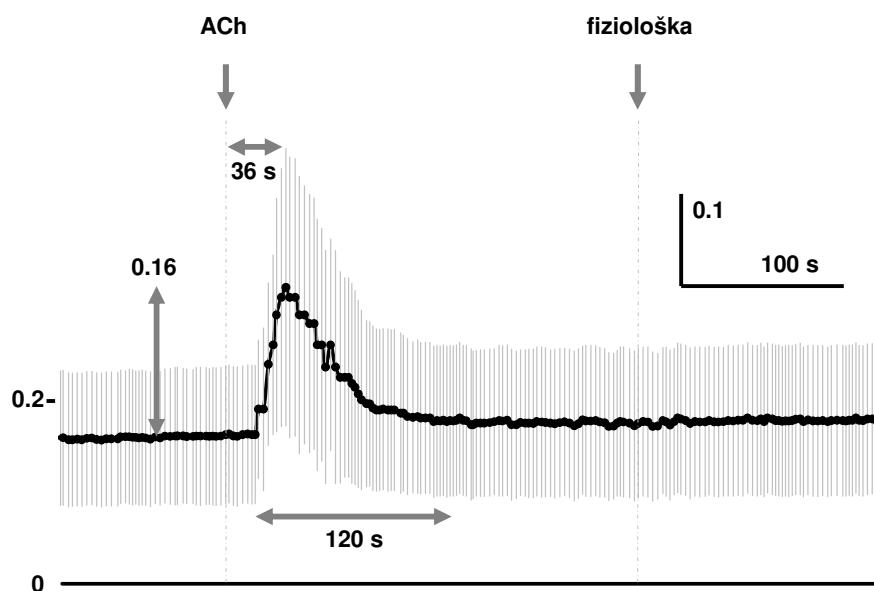


Slika 29: Povprečno razmerje fluorescenc, SD in izračunane vrednosti poskusa 4.



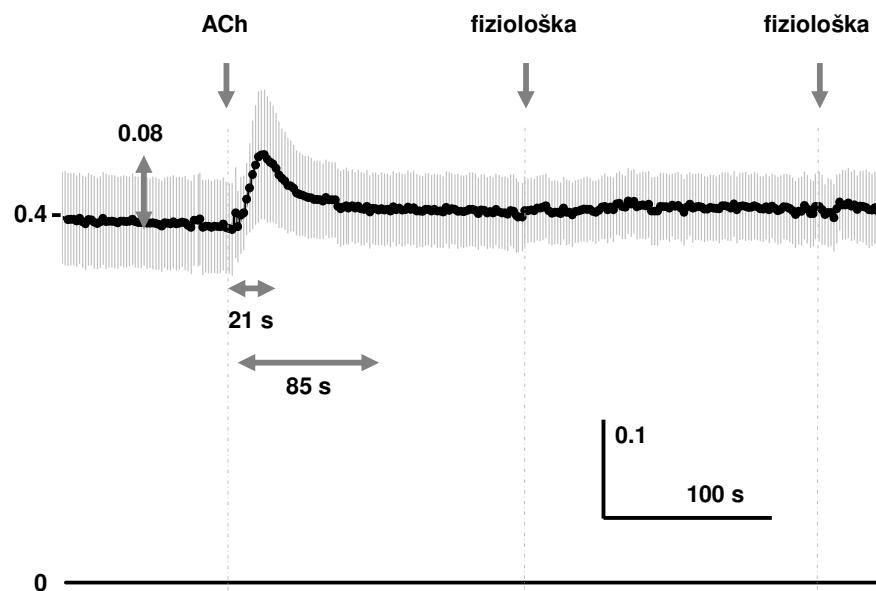
Slika 30: Povprečno razmerje fluorescenc, SD in izračunane vrednosti poskusa 8.

Poskus 9 (slika 31) je potekal podobno kot prejšnja dva, tudi hitrost in trajanje odgovora sta podobna, vendar je velik in dobro prepoznavne oblike. Stopničast izgled je posledica tehničnih težav z zamikom snemanja fotografij.

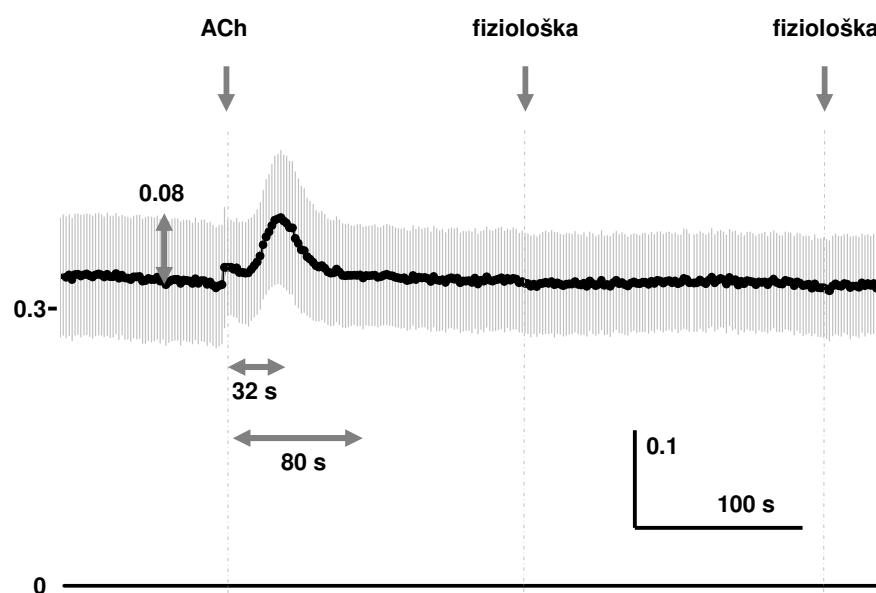


Slika 31: Povprečno razmerje fluorescenc, SD in izračunane vrednosti poskusa 9.

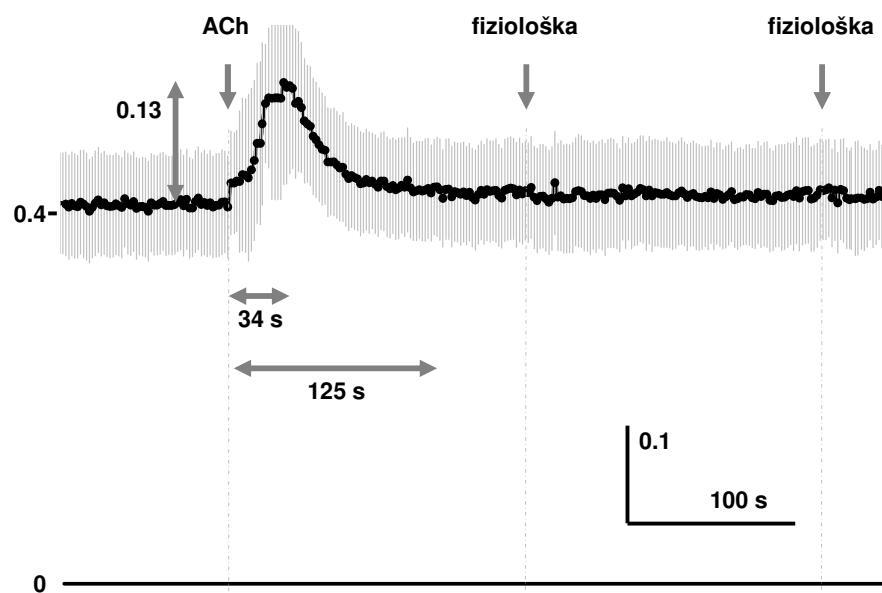
Razmerja fluorescenc obeh valovnih dolžin so bila pri preparatih 5, 6, 7 in 10 (slike 32 - 35) nekoliko višja kot pri ostalih poskusih, odgovori pa zelo hitri, majhni in kratki (razen poskus 7, kjer je odgovor velik in dolg).



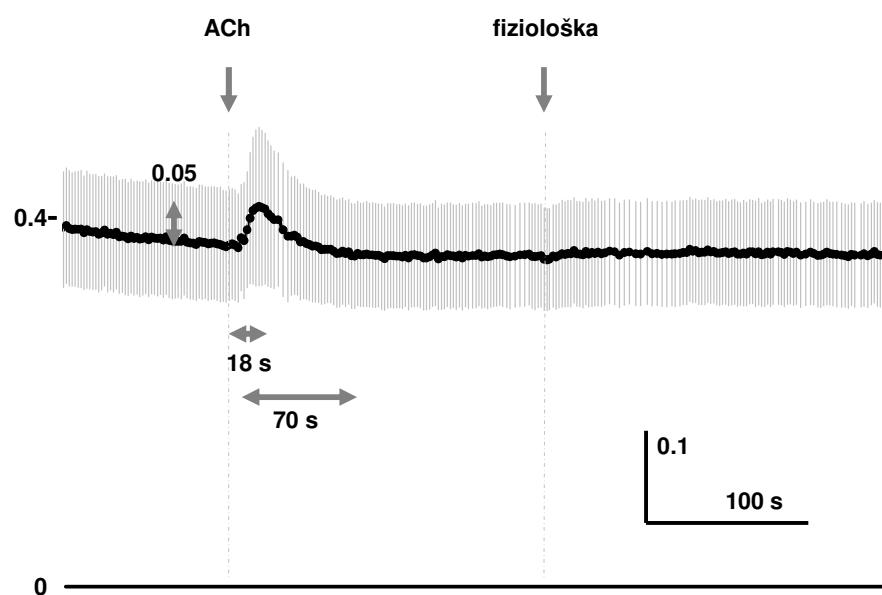
Slika 32: Povprečno razmerje fluorescenc, SD in izračunane vrednosti poskusa 5.



Slika 33: Povprečno razmerje fluorescenc, SD in izračunane vrednosti poskusa 6.



Slika 34: Povprečno razmerje fluorescenc, SD in izračunane vrednosti poskusa 7.



Slika 35: Povprečno razmerje fluorescenc, SD in izračunane vrednosti poskusa 10.

Vsi poskusi so bili posneti z objektivom Zeiss Neofluar s 40x povečavo brez imerzije, z ekspozicijskim časom 100 - 500 ms in brez sivih filtrov.

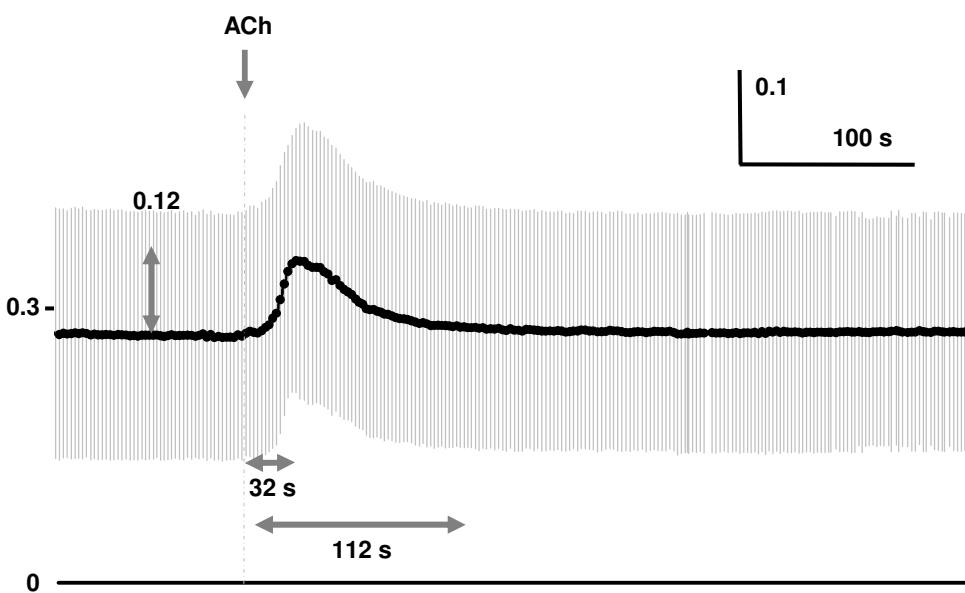
4.2 POSPLOŠITEV REZULTATOV

Nazadnje smo izračunali še povprečje (m) vseh izbranih točk vseh preparatov in povprečje izračunanih vrednosti (višine odgovora, časa do največjega odgovora in čas celotnega odgovora), da smo dobili končen rezultat naših poskusov.

Preglednica 3: Povprečne vrednosti vseh točk vseh preparatov: najmanjše in največje razmerje fluorescenc, višina odgovora, čas do največjega odgovora in čas celotnega odgovora.

| št. preparata | min. razmerje | max. razmerje | višina odgovora | t max. odgovora | t odgovora |
|----------------|---------------|---------------|-----------------|-----------------|--------------|
| 1 (070425-01) | 0,303 | 0,352 | 0,049 | 48 s | 130 s |
| 3 (070515-02) | 0,122 | 0,328 | 0,206 | 47 s | 160 s |
| 4 (070515-04) | 0,113 | 0,195 | 0,082 | 30 s | 120 s |
| 5 (070619-01) | 0,382 | 0,463 | 0,081 | 21 s | 85 s |
| 6 (070619-02) | 0,323 | 0,399 | 0,076 | 32 s | 80 s |
| 7 (070718-02) | 0,408 | 0,542 | 0,134 | 34 s | 125 s |
| 8 (070904-01) | 0,205 | 0,268 | 0,063 | 36 s | 140 s |
| 9 (071023-02) | 0,159 | 0,321 | 0,162 | 36 s | 120 s |
| 10 (071023-01) | 0,366 | 0,411 | 0,045 | 18 s | 70 s |
| 11 (080617-04) | 0,1 | 0,4 | 0,3 | 16 s | 85 s |
| m ± SD | 0,248 ± 0,121 | 0,368 ± 0,107 | 0,120 ± 0,082 | 32 s ± 11 s | 112 s ± 30 s |

Prikaz splošnega rezultata poskusov našega dela je prikazan na sliki 36, kamor so vnesene tudi povprečne vrednosti parametrov vseh poskusov.



Slika 36: Prikaz povprečja (m) vseh izbranih točk in izmerjenih vrednosti vseh poskusov.

Aplikacija ACH je torej povprečno dvignila razmerje fluorescenc s $0,248 \pm 0,121$ na $0,368 \pm 0,107$. Ionomycin je razmerje zvišal mnogo manj.

Preglednica 4: Povprečne vrednosti vseh točk vseh preparatov: najmanjše in največje razmerje fluorescenc ter fluorescanca celic kot odgovor na ionomicin.

| št. preparata | min. razmerje | max. razmerje | max. ionomicin |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1 (070425-01) | 0,303 | 0,352 | 0,322 |
| 3 (070515-02) | 0,122 | 0,328 | 0,179 |
| 4 (070515-04) | 0,113 | 0,195 | 0,144 |
| 5 (070619-01) | 0,382 | 0,463 | 0,398 |
| 6 (070619-02) | 0,323 | 0,399 | 0,333 |
| 7 (070718-02) | 0,408 | 0,542 | 0,422 |
| 8 (070904-01) | 0,205 | 0,268 | 0,225 |
| 9 (071023-02) | 0,159 | 0,321 | 0,186 |
| 10 (071023-04) | 0,366 | 0,411 | 0,367 |
| m ± SD | $0,248 \pm 0,121$ | $0,368 \pm 0,107$ | $0,286 \pm 0,104$ |

Zaradi prenizkega odgovora celic na ionomicin (le $0,286 \pm 0,104$), sklepamo, da kalibracija ni delovala. Zato nismo preračunali razmerja fluorescenc v dejansko $[Ca^{2+}]_i$.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Priprava protokola primerrega preparata za opazovanje $[Ca^{2+}]_i$ je potekala na izkušnjah med poskusi in po upoštevanju priprave preparatov v že mnogih izvedenih raziskavah. Zaradi preprostosti smo se odločili za svež preparat lečnih epitelnih celic.

Sveže kapsule, odvzete na operacijah sive mrene na Očesni kliniki Kliničnega centra v Ljubljani, smo uporabili takoj po izolaciji iz očesa. Odstranitev kapsule od celotne leče je rutinski in zanesljiv postopek. Ker smo kapsule ves čas hranili na 37 °C, so ohranile vse lastnosti lečnega epitela in pravilno odgovarjale. Tako smo se odločili, da za vse poskuse uporabimo celice, ki so še naravno pripete na svojo bazalno membrano, celični stiki pa ohranjajo naravno povezanost in sodelovanje med celicami.

Po določitvi primerrega preparata za poskuse smo se odločili, da izvedemo najprej aplikacijo ACh med snemanjem poskusa s CCD kamero. Kot so že pokazale raziskave, so tudi pri naših poskusih celice odgovorile na dodatek agonista s porastom $[Ca^{2+}]_i$.

Koncentracije ne omenjamo zato, ker v primeru meritev $[Ca^{2+}]_i$ v citoplazmi le te ni tako preprosto določiti. Ca^{2+} je v celici namreč vezan na molekule v citosolu in shranjen v različnih celičnih organelih. Glavna sta endoplazemski retikel in celično jedro. Ker je Ca^{2+} v citosolu sekundarna sporočevalna molekula, so njegove proste količine skrbno nadzorovane s prečrpavanjem v shranjevalne organele. Tako je Ca^{2+} v celici v prosti obliki zelo malo časa.

Po vezavi ACh na muskarinske receptorje na celični membrani preko G-proteinske kaskade in sporočevalnih molekul začne Ca^{2+} vdirati iz okoljnega medija, endoplazemskega retikla in celičnega jedra v celični citosol. Mitochondriji pri tem opravljajo vlogo »pufra« za Ca^{2+} , saj ga med porastom v citosolu nekaj sprejmejo in s tem zmanjšajo količino prostega Ca^{2+} . $[Ca^{2+}]_i$ se zaradi poplave Ca^{2+} v citosolu zelo poveča, kar lahko zaznamo s pomočjo fluorescentnega barvila fura-2, ki reagira na te spremembe s povečano fluorescenco. Po končanem stimulusu se Ca^{2+} spet prečrpa nazaj v zaloge.

Ionomycin se veže v membrane celice in poruši gradient Ca^{2+} med zunanjostjo in notranjostjo citosola, saj v svojo hidrofilno mesto sprejme Ca^{2+} ion in ga zaradi globularne hidrofobnosti ionomicina prenese na drugo stran. To poteka do izenačitve koncentracij Ca^{2+} na obeh straneh membrane. Ker je membrana po vgraditvi ionofora irreverzibilno okvarjena, smo umeritev vedno izvedli na koncu poskusa. Najprej smo ionomicin dodajali v fiziološki raztopini brez Ca^{2+} in dodatkom EGTA, da je gradient "povlekel" Ca^{2+} iz zalog

in iz okolja, da se je vezal na EGTA. Nato pa smo dodali še ionomicin v fiziološki raztopini z visokim Ca^{2+} , da se je Ca^{2+} vrnil v citosol in je bila njegova aktivnost največja.

Iz nam neznanih razlogov ta način umeritve ni deloval. Možni razlogi so, da je že na začetku poskusov prišlo do napačne priprave osnovne raztopine, ki je bila pripravljena še preden sem sama pričela z delom, ali pa v teh celicah ionomicin enostavno ni dovolj učinkovit ionofor. Lahko bi bil vzrok tudi zastaranje ali okvara raztopine ionomicina, saj smo ga večkrat zamrznili in odtajali. Posledica premajhne koncentracije ionomicina ne pride v poštev, saj je 80 μM koncentracija ionofora tako ali tako že visoka v primerjavi z drugimi raziskavami.

Očitno sta imela Collison in Duncan (2001) isti problem z ionomicinom kot mi, zato sta depolarizirala membrano (KCl - povišan $[\text{K}^+]_0$), obrnila $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiport (150 mM KCl), blokirala SR Ca^{2+} ATP-azo (thapsigargin) ter membransko Ca^{2+} ATP-azo (W7). Šele potem sta s spremenjanjem zunajcelične koncentracije kalcija lahko vplivala v zadostni meri na $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Vendar posebej takšnih težav nista navedla, opomnila sta le, da je kalibracija po takšnem postopku uspela le v sprednjih centralnih epitelnih celicah, kjer je bil odgovor celic na ACh veliko večji kot v ekvatorialni regiji.

To bi lahko pomenilo, da imajo epitelne celice leče izredno sposobnost uravnavanja $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tudi v zelo izjemnih pogojih – v prisotnosti ionomicina. Kar pa spet pomeni, da igrajo pri njih mitohondriji še bolj izjemno vlogo, kot bi na prvi pogled mislili.

Tako smo se osredotočili le na opazovanje odgovora celic na aplikacijo ACh. Za analizo smo uporabili le pribl. 20% izvedenih poskusov, kjer ni bilo zadržkov za njihovo analizo, ker celice niso vedno odgovorile (predvidoma so bile že mrtve, fura-2 pa je še vedno bila v jedru) ali pa se je celotna kapsula premaknila po aplikaciji. Za imobilizacijo kapsule smo najprej uporabljali injekcijsko iglo, ki pa zaradi točkastega stika ni služila svojemu namenu. Kasneje smo se odločili za v laboratoriju ročno narejeno zanko iz steklene pipete, ki je ploskovno pritisnila na kapsulo okrog vidnega polja. Ker pa zanka ni pritisnila kapsulo vedno točno vzporedno s podlago, se je večkrat izmuznila med perfuzijo.

Izmenično fotografiranje preparata pri ekscitacijah s 340 nm in 380 nm je dalo niz fotografij poskusa. Barvilo fura-2 na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v citosolu odgovori s povečano fluorescenco pri 340 nm in zmanjšano fluorescenco pri 380 nm. V skladu s tem se je fluorescensa celic na fotografijah pri 340 nm povečala po aplikaciji ACh, pri 380 nm pa zmanjšala.

Zaradi vedno prisotne svetilnosti ozadja preparata (predvidoma to ni svetilnost kapsule), je bilo potrebno od surovih podatkov posamezne točke odšteti še fluorescenco ozadja, ki je bila ena od točk na sliki, kjer ni bilo celic. Na žalost ozadje ni imelo homogene svetilnosti

(avtofluorescence itd.). Zato je sisanje vrednosti razmerja 340 nm / 380 nm relativno veliko in nekoliko napačno reprezentira vatriabilnost vrednosti $[Ca^{2+}]_i$ v lečnih epitelnih celicah.

Razmerje obeh valovnih dolžin (340 nm / 380 nm) najbolje prikaže odgovor celic, saj prikrije bledenje barvila (ki je vedno prisotno) med poskusom in ostale motnje, ki lahko vplivajo na svetilnost. Odgovor je tako viden kot strmo naraščanje razmerja (1/3 do 1/4 časa odgovora) do največjega odgovora in počasnejše padanje (2/3 do 3/4 časa odgovora) nazaj na prvotno raven.

Poskuse smo izvajali po določenem protokolu zaradi večje primerljivosti med rezultati. Posnetke smo analizirali in ovrednotili. Rezultati so pozitivni, saj ACh značilno aktivira celične receptorje.

Začetek vidnega odgovora celic je bil nekaj sekund po aplikaciji ACh. To je bil potreben čas, da je agonist pripravil po fiziološki raztopini do celičnih receptorjev na membrani in da so sporočevalne molekule (npr. IP_3) odprle kanale v organelih. Ker so bile nekatere celice prej v stiku z ACh, so tudi prej odgovorile. Po navadi smo dodajali snovi v petrijevko z desne smeri, zato so desne celice na fotografiji navado odgovorile prej. Dobro je to vidno na sliki 22, kjer se val Ca^{2+} opazi najprej na desni strani preparata, nato pa potuje proti levi.

Do največjega odgovora preparata, ko so maksimalno odgovorile vse žive celice, je povprečno preteklo pol minute. Val Ca^{2+} je v celicah trajal povprečno dve minuti, dokler se ni spet v celoti prečrpal iz citosola. To bi lahko enačili s časom celotne kaskade in sporočanja v celici.

Dejanskih številk aktivnosti nismo izračunavali, ker umeritev najmanjšega in največjega odgovora ni delovala, se pa zagotovo gibljejo v velikostnem razredu 100 nM, med odgovorom pa naj bi se dvignile do 600 nM (Churchill in sod., 1998). In takšen porast Ca^{2+} v celicah je lahko vzrok za nastanek sive mrene. ACh v mediju okoli leče torej lahko poviša tveganje za obolenje za katarakto.

Odgovori so primerljivi z ostalimi že narejenimi objavljenimi raziskavami, kljub temu, da smo protokol sestavili skupaj od vsake objave po malo. Edino končnih rezultatov $[Ca^{2+}]_i$ ne moremo primerjati z ostalimi, ker jih nimamo. Preparat svežih epitelnih celic človeške leče torej je primeren objekt za tovrstne raziskave.

5.2 SKLEPI

Kot rezultat mojega diplomskega dela lahko povzamem naslednje sklepe:

Sveže izolirane kapsule ohranijo vse lastnosti lečnega epitela. Celice odgovarjajo s tipičnimi odgovori, saj so še naravno pripete na svojo bazalno membrano. Celični stiki med njimi pa ohranjajo naravno povezanost in sodelovanje med celicami. Zato so primeren vir materiala za tovrstne meritve $[Ca^{2+}]_i$.

Ca^{2+} je v celici vezan na molekule v citosolu in shranjen v endoplazemskem retiklu ter mitohondriih. Vse te zaloge delujejo kot različno močni gibljivi in negibljivi pufri za Ca^{2+} . Tako je Ca^{2+} v celici v prosti obliki zelo malo časa in zato je aktivnost kalcija boljši izraz kot koncentracija.

Spremembo $[Ca^{2+}]_i$ lahko zaznamo s pomočjo ekscitiranja fluorescentnega barvila fura-2, ki reagira na te spremembe s spremembami spektralnih lastnosti in od teh odvisnimi spremembami fluorescence.

Ionomicin se veže v membrane celice in poruši gradient Ca^{2+} med zunanjostjo in notranjostjo citosola, kar se splošno uporablja kot umeritev $[Ca^{2+}]_i$, saj lahko dobimo najmanjši in največji odgovor celic na Ca^{2+} . Iz neznanih razlogov ta način umeritve ni deloval. Najverjetnejša razloga sta napačna priprava osnovne (»stock«) raztopine ionomicina in zastaranje ali okvara raztopine ionomicina, saj smo ga večkrat zamrznili in odtajali. Možno pa je tudi, da v teh celicah ionomicin sam ne deluje najbolje.

Injekcijska iglo ali zanka iz steklene pipete nista optimalni način imobilizacije kapsule na podlago, saj se je kapsula večkrat izmuznila med aplikacijo agonista oz. spiranjem preparata s kopeljo med poskusom.

Barvilo fura-2 na povečanje $[Ca^{2+}]_i$ odgovori s povečano fluorescenco pri 340 nm in zmanjšano fluorescenco pri 380 nm. Zaradi vedno prisotne svetilnosti ozadja preparata, je potrebno od surovih podatkov posamezne točke odštetiti še ozadje.

Razmerje obeh valovnih dolžin (340 nm / 380 nm) najbolje prikaže odgovor celic, saj prikrije bledenje preparata med poskusom in ostale motnje, ki lahko vplivajo na svetilnost.

Po aplikaciji ACh je potrebno nekaj sekund, da agonist pripotuje do celičnih receptorjev na membrani. Največji odgovor preparata povprečno nastopi v pol minute. Val Ca^{2+} je v celicah trajal povprečno dve minuti, kar lahko enačimo s časom celotne kaskade in sporočanja v celici.

Dejanskih številk $[Ca^{2+}]_i$ nismo izračunavali, ker umeritev najmanjšega in največjega odgovora ni delovala, se pa najverjetneje giblje v velikostnem razredu 100 nM.

Ker je nastanek katarakte tesno povezan z nepravilnostmi v uravnavanju $[Ca^{2+}]_i$, je porast aktivnosti zaradi prisotnosti ACh lahko kritična za obolevanje za sivo mreno.

5.3 PREDLOGI ZA NADALJNJE RAZISKAVE

Za nadaljevanje poskusov diplomskega dela priporočam:

Usposobitev kalibracije z ionomicinom ali kakšnim drugim ionoforom, saj bi se le tako dalo $[Ca^{2+}]_i$ tudi dejansko izraziti v številkah.

Izdelava težke »harfe« iz platine in najlonskih nitk, ki bi učinkovitejše pritrdirila kapsulo na podlogo, pa tudi mikromanipulatorja se ne bi potrebovalo več.

Uporabo aplikacijskega sistema, ki bi omogočal lokalizirano aplikacijo agonistov, kar bi preprečilo premike preparata ob »bolus« aplikaciji.

Za opazovanje bi se lahko uporabil objektiv z veliko numerično aperturo ter imerzijsko olje. Tako bi se v celicah dalo morda bolje videti bazene Ca^{2+} .

Ločitev epitelnih celic glede na regijo, kje ležijo na kapsuli (centralna cona, stranska cona, ekvatorialna cona...).

Preizkusiti na celicah očesnega epitela tudi druge agoniste, npr. IP₃, ATP, adrenalin ipd. ter primerjati odgovore med seboj.

Priprava celične kulture lečnega epitela po protokolih že objavljenih raziskav ter primerjavo odgovorov med celicami v kulti in sveže izoliranimi celicami.

Uporaba mitohondrijskih razklopnikov (npr. CCCP) in tako primerjava odgovorov celic na aplikacijo ACh v primeru nizkega ter visokega kisika, ATP-ja...

Vodenje evidence starosti donorjev celic in vrste katarakte pri njih, ter ugotavljanje povezanosti odgovorov epitela glede na starost in okvaro.

Primerjava odgovorov človeškega lečnega epitela z epitelnimi celicami drugih živali (npr. podgana, govedo, ovca, ipd.).

6 POVZETEK

Namen diplomskega dela je bil izdelati protokol za pripravo primernega preparata epitela človeške leče in izvesti meritve $[Ca^{2+}]_i$ s pomočjo sistema za dinamično slikanje Ca^{2+} in fluorescentnega barvila fura-2.

Uporabili smo sveže kapsule, ker so na njih epitelne celice pritrjene kot v očesu, pa tudi celični stiki ostanejo isti. Celice so dobro delovale, vendar le pri takojšnji uporabi; naslednji dan so celice pretežno že propadle.

Ker je $[Ca^{2+}]_i$ v celici skrbno nadzorovana, je Ca^{2+} spravljen v endoplazemskemu retiklu in mitohondriih ter uravnavan z raznimi agonisti in receptorji zanke. Na celični membrani so muskarinski receptorji, ki odgovarjajo na ACh s kaskado sporočevalnih molekul in hitrim tokom Ca^{2+} iz vseh zalog, tudi iz zunanjosti celic, v citosol.

Te spremembe $[Ca^{2+}]_i$ v citosolu lahko opazujemo s fluoroforo fura-2, ki spreminja svoj spekter glede na količino Ca^{2+} , ki ga lahko veže. Če furo-2 ekscitiramo z valovnima dolžinama 340 nm in 380 nm, proces pa opazujemo pri 510 nm, lahko opazimo povečanje fluorescence pri 340 nm in zmanjšanje pri 380 nm, kot je to prikazano v standardnemu grafu za furo-2 (slika 12). Razmerje valovnih dolžin se ustreznodobiguje pri povišani $[Ca^{2+}]_i$.

Fiziološki raztopini s kapsulo smo za 25 min dodali 2 μl barvila fura-2 in inkubirali pri 37 °C in 5% CO₂. Nato smo dvakrat sprali z zamenjavo fiziološke raztopine. Poskus smo izvedli v 700 ciklih menjavanja ekscitacije s 340 nm in 380 nm. Po 100. ciklu smo dodali 3 ml 100 μM ACh, pri 200. in 300. ciklu smo to sprali z 2 x 3 ml fiziološke raztopine s Ca^{2+} . Pri 400. ciklu smo dodali 3 ml 80 μM ionofora ionomicina v fiziološki raztopini brez Ca^{2+} in z EGTA, pri 550. ciklu pa 80 μM ionomicin v 3 ml fiziološke raztopine s Ca^{2+} .

Med poskusi smo opazovali odgovore celic na ACh. Po nekaj sekundah so celice odgovorile z znatnim povišanjem $[Ca^{2+}]_i$, kar je doseglo vrh po povprečno 32 s ± 11 s. Po povprečno 80 s pa se je Ca^{2+} spet prečrpal v celične organele. Odgovor je tako trajal povprečno 112 s ± 30 s. Aplikacija ACh je povzročila povišanje razmerja od 0,248 ± 0,121 v mirovanju na 0,368 ± 0,107 (n=10).

Da bi izrazili $[Ca^{2+}]_i$ v dejanskih številkah (z enačbo (2)), bi potrebovali tudi najmanjšo in največjo možno $[Ca^{2+}]_i$. To smo poskušali z dodajanjem ionofora ionomicina, ki z vgraditvijo v membrano uniči membranski gradient Ca^{2+} . Ker pa ta umeritev ni delovala, smo rezultate pustili v obliki razmerja valovnih dolžin. Ob aplikaciji ionomicina v

prisotnosti zunajceličnega kalcija je bila sprememba namreč le $0,286 \pm 0,104$ (n=9), ne glede na njegovo koncentracijo.

Cilji naloge so bili delno doseženi, hipoteze so bile potrjene, čeprav nismo mogli izvesti vseh zastavljenih poskusov zaradi motenj strojne opreme.

Za nadaljevanje poskusov priporočam različne načine primerjalnih raziskav, ki bi odpravile pomanjkljivosti diplomskega dela in razjasnile nova odkritja na tako zanimivem preparatu kot je epitel človeške leče.

7 VIRI

- Bantseev, V., Cullen, A.P., Trevithick, J.R., Sivak, J.G. 2003. Optical function and mitochondrial metabolic properties in damage and recovery of bovine lens after in vitro carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone treatment. Mitochondria Research Society, 3: 1 - 11
- Bhat, S.P. 2001. The Ocular Lens Epithelium. Bioscience Reports, 21: 537 - 563
- Blakely, E.A., Bjornstad, K.A., Chang, P.Y., McNamara, M.P., Chang, E., Aragon, G., Lin, S.P., Lui, G., Polansky, J.R. 2000. Growth and Differentiation of Human Lens Epithelial Cells In Vitro on Matrix. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 41: 3898 - 3907
- Churchill, G.C., Atkinson, M.M., Louis C.F. 1996a. Mechanical stimulation initiates cell-to-cell calcium signaling in ovine lens epithelial cells. Journal of Cell Sciene, 109: 355 - 365
- Churchill, G.C., Louis, C.F. 1996b. Stimulation of P_{2U} Purinergic or α_{1A} Adrenergic Receptors Mobilizes Ca²⁺ in Lens Cells. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 38: 855 - 865
- Churchill, G.C., Louis, C.F. 1998. Roles of Ca²⁺, inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose in mediating intercellular Ca²⁺ signaling in sheep lens cells. Journal of Cell Science, 111: 1217 - 1225
- Churchill, G.C., Louis, C.F. 1999. Imaging of intracellular calcium stores in single permeabilized lens cells. The American Physiological Society, 276: 426 - 434
- Collison, D.J., Coleman, R.A., James, R.S., Carey, J., Duncan, G. 2000. Characterization of Muscarinic Receptors in Human Lens Cells by Pharmacologic and Molecular Techniques. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 41, 9: 2633 - 2641
- Collison, D.J., Duncan, G. 2001. Regional Differences in Functional Receptor Distribution and Calcium Mobilization in the Intact Human Lens. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 42, 10: 2355 - 2363
- Eckert, R., Donaldson, P., Goldie, K., Kistler, J. 1998. A Distinct Membrane Current in Rat Lens Fiber Cells Isolated under Calcium-Free Conditions. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 39, 7: 1280 - 1285

- Gilbert, S.F. 2003. Developmental biology. Swarthmore College, Sinauer Associates, Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts, 7. izdaja: 413 - 416
- Gong, X., Baldo, G.J., Kumar, N.M., Gilula, N.B., Mathias, R.T. 1998. Gap junctional coupling in lenses lacking α_3 connexin. The National Academy of Sciences, 95: 15303 - 15308
- Hogan, B., Weaverl, M. 2001. Powerful ideas driven by simple tools: Lessons from experimental embryology. Nature Cell Biology, 3: E165 - E167
- Invitrogen detection technologies. 2007. Molecular probes, The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies.
- Lust, J.R. Scanning Electron Microscope Eye Structure Analysis. University of Rochester, Institute of Optics.
- Mathias, R.T., Rae, J.L., Baldo, G.J. 1997. Physiological Properties of the Normal Lens. Physiological Rewiews, 77: 21-50
- McNulty, R., Bassnett, S. 2005. Oxygen and ocular lens. A key to understanding nuclear cataract? Physiology News, 60: 18 - 19
- McNulty, R., Wang., H, Mathias, R.T., Ortwerth, B.J., Truscott, R.J.W., Bassnett, S. 2004. Regulation of tissue oxygen levels in the mammalian lens. The Physiological Society, 559.3: 883 - 898
- Rae, J.L., Rae, J.S. 1992. Whole-Cell Currents from Noncultured Human Lens Epithelium. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 33: 2262 - 2268
- Rhodes, J.D., Collison, D.J., Duncan, G. 2003. Calcium activates SK channels in the intact human lens. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 44: 3927 - 3933
- Robinson, M.L., Lovicu, F.J. 2004. Development of the ocular lens. University of Sydney, Ohio State University
- Sanders, E.J., Parker, E. 2002. The role of mitochondria, cytochrome c and caspase-9 in embryonic lens fibre cell denucleation. Anatomical Society of Great Britain and Ireland, 201: 121 - 135
- Sutter Instrument. 2008. (<http://www.sutter.com/PDF/SutterCatalog.pdf>)

TenBroek, E.N., Johnson, R., Louis, C.F. 1994. Cell-to-Cell Communication in a Differentiating Ovine Lens Culture System. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 35: 215 - 228

Tucker, E.J., M.D., F.A.C.S., Carrizo, M.D. 1968. Haematoxylin Dissolved in Dimethylsulfoxide Used in Recurrent Neoplasms. *International Surgery*, 49, 6: 516

Uncouplers and Inhibitors. (<http://www.bmb.leeds.ac.uk/illingworth/oxphos/poisons.htm>)

Voet, D., Voet, J.G. 1996. Biochemistry. John Wiley & Sons, inc, New York, 2. izdaja: 50 - 52

Wang, L., Christensen, B.N., Bhatnagar, A, Sriastava, S.K. 2000. Role of calcium-dependent protease(s) in globulization of isolated rat lens cortical fiber cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42: 194 - 199

Wang, X., Simpkins, J.W., Dykens, J.A., Cammarata, P.R. 2003. Oxidative Damage to Human Lens Epithelial Cells in Culture: Estrogen Protection of Mitochondrial Potential, ATP, and Cell Viability. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44: 2067 - 2075

Willert, A. 1995. Spektroskopische Untersuchungen am ionenspezifischen Farbstoff Fura-2 zum Nachweis von Manganionen. Institut für Experimentalphysik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Wolska, B.M. 2001. Calcium imaging. Department of Medicine, Section of Cardiology & Department of Physiology & Biophysics, University of Illinois at Chicago

Zeiss. 2008. 3D Microscopy for Axiovert 100/135/135 M, Operating Manual.
([http://www.zeiss.com/4125681F004E2140/EmbedTitelIntern/3DMicroscopy_Axiovert100_135_135M/\\$File/B-40-022-43DMicroscopyAxiovert100135135M.pdf](http://www.zeiss.com/4125681F004E2140/EmbedTitelIntern/3DMicroscopy_Axiovert100_135_135M/$File/B-40-022-43DMicroscopyAxiovert100135135M.pdf))

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem svojemu mentorju, doc. dr. Gregorju Zupančiču, za vsestransko nesebično pomoč ter nasvete pri raziskovalnem delu in pisanju diplomske naloge, predvsem za spodbudo in trud.

Hvala tudi somentorju, prof. dr. Marku Hawlini za dovoljenje opravljanja vseh poskusov na Očesni kliniki ter skrbno pripravo materiala pri operacijah.

Hvala Darku Perovšku za spremljanje in pomoč pri uvajanju v poskuse in neizmerno potrpežljivost, ko sem iz tedna v teden »težila«, da bi prišla delat poskuse.

Zahvaljujem se recenzentu doc. dr. Petru Stušku in predsedniku komisije za zagovor prof. dr. Kazimirju Drašlarju za sodelovanje pri moji diplomi.

Posebna zahvala velja moji sestri Tini, ki me je spremljala in spodbujala na moji študijski poti od prvega dne dalje, me priganjala k delu in pripomogla k lažjemu oblikovanju te diplomske naloge.

Kaj bi brez podpore Helene, Nine, Tanje, Nataše... in Jerneja vsa ta študentska leta, ko sem se prebijala skozi izpite in spoznavala recepte za prihodnost mojega življenja...

Brez podpore staršev Zdenke in Toneta pa vse ostalo ne bi prineslo veliko!

HVALA!