

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

**Nikolina Bradarić**

**Diferencijacija ljudskih endocervikalnih stanica uzgojenih  
u 3D staničnoj kulturi**

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za histologiju i embriologiju i na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Marije Ćurlin. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Mariji Ćurlin što mi je pružila priliku da ovaj diplomski rad izradim pod njenim stručnim vodstvom.

Vječito ću biti zahvala na prilici koju mi je pružila, te prenesenom znanju s kojim započinjem svoj znanstveni put u području reproduktivne biologije.

Hvala na svom vremenu, trudu, ispravicima i slušanjsima mene i mojih ideja!

Hvala na svim preporukama i pomoći s kojima sam uspjela otići u Austriju i dobiti stipendiju koja mi otvara vrata znanosti!

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Romani Gračan koja je kao suvoditelj ovoga diplomskoga rada pripomogla u njegovoj realizaciji.

Veliko hvala mojoj obitelji, a posebno mojih roditeljima, Anki i Ranku, bez kojih moj studij nebi bio moguć! Hvala im što su popuštali mojim prohtjevima i dopustili da ostvarim svoje želje i ideje vezane uz moju budućnost. Hvala bratu Domagoju, sestri Andrei i njenom mužiću Damiru koji su stalno slušali moja jadikovanja i ludosti koja me uhvati s vremena na vrijeme.

Hvala mom tvoriću Lokiju, koji je uljepšao sve trenutke moga studiranja i uvijek popravio dan svojim zgodama i nezgodama.

Hvala svim prijateljima iz Osijeka, Zagreba i Beča koji su mi uvijek bili podrška i motivirali me da nastavim s radom, jer ipak trud se isplati!

Posebno se zahvaljujem svoj ekipi sa Save, prizemlju i prvom katu, što nikad nisu stvarno mislili kada su govorili "Brado, dosadna si", te me nastavili slušati :P

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### DIFERENCIJACIJA LJUDSKIH ENDOCERVICALNIH STANICA UZGOJENIH U 3D STANIČNOJ KULTURI

Nikolina Bradarić

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Endocervikalne kripte izlučuju cervikalnu sluz čija se biokemijska, biofizička i funkcionalna svojstva mijenjaju ovisno o fazi menstrualnog ciklusa, stoga je za istraživanje sekrecijske aktivnosti endocerviksa potrebno koristiti odgovarajući eksperimentalni model. Razvoj 3D kultura stanica omogućio je uzgoj visokodiferenciranih i funkcionalnih endocervikalnih stanica s jasno definiranom polarnošću, međustaničnim spojevima i sposobnošću izlučivanja mucina. Za postizanje uspješne 3D kulture, potrebno je optimizirati specifične uvjete. U dvije uzastopne kultivacije ispitivane su optimalne eksperimentalne postavke za uzgoj stanične linije humanih epitelnih endocervikalnih stanica End1/E6E7 u 3D kulturi primjenom *transwell* podloga koje omogućuju rast stanica na granici „medij - zrak“. Ispitivane su različite koncentracije i vrijeme izlaganja međustaničnoj tvari, različito vrijeme izlaganja  $\beta$ -estradiolu i vrijeme inkubacije u kojem stanice postižu potpunu diferencijaciju i funkcionalnost. Rast, diferencijacija i funkcionalnost stanica se procjenjivala citološkim, citokemijskim, imunocitokemijskim metodama i elektronskim mikroskopom. Ovim radom postignuti su optimalni uvjeti za rast, diferencijaciju i funkcionalizaciju endocervikalnih stanica u 3D kulturi. Prvi znakovi diferencijacije i funkcionalizacije pojavili su se šesti dan kultivacije, a potpuna funkcionalnost postignuta je do 18. dana. Ujednačenost proizvodnje mucina u stanicama omogućila je primjenu postignute 3D kulture u pokusu izlaganja stanica  $\beta$ -estradiolu. Izložene stanice pojačale su stvaranje nepropusnih i pričvrstnih spojeva, te smanjile količinu mucina unutar stanica.

(51 stranica, 16 slika, 6 tablica, 58 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: 3D kultura stanica, endocervikalne stanice, međustanična tvar, *transwell*, mucini, kladin 4, međustanični spojevi

Voditelj: izv. prof. dr. sc. Marija Ćurlin

Suvoditelj: doc. dr. sc. Romana Gračan

Ocjenitelji: doc. dr. sc. Romana Gračan

doc. dr. sc. Sunčica Bosak

doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Rad prihvaćen: 16. rujna 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation thesis

### DIFFERENTIATION OF HUMAN ENDOCERVICAL CELLS GROWN IN 3D CELL CULTURE

Nikolina Bradarić

Roosveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Endocervical crypts secrete cervical mucus whose biochemical, biophysical and functional properties change depending on the phase of the menstrual cycle, so it is required to use an appropriate experimental model to investigate the secretory activity of the endocervix. The development of 3D cell cultures has enabled the cultivation of highly differentiated and functional endocervical cells with clearly defined polarity, intercellular junctions, and mucin secretion ability. To achieve a successful 3D culture, it is necessary to optimize specific conditions. In two consecutive cultivations, the optimal experimental settings for culturing the human epithelial endocervical cell line End1 / E6E7 in 3D culture were examined using *transwell* insert that allows cells growth at the "medium - air" interface. Different concentrations and times of exposure to extracellular matrix were examined, as well as different exposure time to  $\beta$ -estradiol and incubation time at which cells achieve complete differentiation and functionality. Cell growth, differentiation and functionality were assessed by cytological, cytochemical, immunocytochemical methods and electron microscopy. With this thesis optimal conditions for growth, differentiation and functionalization of endocervical cells in 3D culture were established. The first signs of differentiation and functionalization appeared on the sixth day of cultivation, and full functionality was achieved by the 18th day. The uniformity of mucin production in the cells enabled the application of the established 3D culture in the experiment of cell exposure to  $\beta$ -estradiol. Exposed cells improved the formation of tight and adherent junctions and reduced the amount of mucin within the cells.

(51 pages, 16 figures, 6 tables, 58 references; original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: 3D cell culture, endocervical cells, extracellular matrix, transwell, mucins, claudin 4, intercellular junctions

Supervisor: Dr. Marija Ćurlin, Assoc. Prof.

Cosupervisor: Dr. Romana Gračan, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Romana Gračan, Asst. Prof.

Dr. Sunčica Bosak, Asst. Prof.

Dr. Sofia Ana Blažević, Asst. Prof.

Thesis accepted: September 16<sup>th</sup> 2020

## Sadržaj

1.2. Cervikalna sluz .....	2
1.2.1 Uloga cervikalne sluzi .....	2
1.2.2. Građa i svojstva cervikalne sluzi .....	3
1.2.3. Cikličke promjene svojstava sluzi .....	4
1.2.4. Imunologija cervikalne sluzi .....	5
1.3. Istraživanje žljezdane aktivnosti endocerviksa.....	7
1.3.1. Istraživanje na animalnim modelima .....	7
1.3.2. Istraživanje na humanim modelima.....	8
1.3.3. Istraživanje u staničnoj kulturi.....	8
1.4. Kultura stanica koje izlučuju sluz.....	9
1.4.1. Primarna kultura .....	9
1.4.2. Kultura staničnih linija .....	9
1.4.3. Trodimenzionalna kultura stanica (3D) .....	10
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	17
3. MATERIJALI I METODE .....	18
3.1. Priprema 3D kulture endocervikalnih stanica End1/E6E7 .....	18
3.1.1. Postavljanje 2D stanične kulture iz smrznutih stanica .....	18
3.1.2. Presađivanje stanica .....	18
3.1.3. Priprema podloge za 3D kulturu.....	19
3.1.4. Nasađivanje stanica i održavanje 3D kulture .....	20
3.1.5. Dodavanje $\beta$ -estradiola u 3D kulturu stanica .....	21
3.1.6. Praćenje rasta stanica u kulturi.....	21
3.2. Citologija, citokemija i imunocitokemija .....	22
3.2.1. Fiksacija, uklapanje u parafin i rezanje stanica .....	22
3.2.2. Bojanje hemalaunom i eozinom .....	22
3.2.3. Bojanje alcijanskim modrilom .....	23
3.2.4. Imunocitokemijsko prikazivanje prisutnosti kladina 4 .....	23
3.3. Elektronska mikroskopija.....	24
3.4. Obrada i analiza rezultata.....	25

4. REZULTATI .....	26
4.1 Prva kultivacija (3D1) – određivanje optimalne koncentracije i vremena izlaganja međustaničnoj tvari.....	26
4.1.1. Stanice rastu jednako i postižu jednaku morfologiju bez obzira na koncentraciju i vrijeme izlaganja međustaničnoj tvari.....	26
4.1.2. U uvjetima prve kultivacije stanice pokazuju jednake znakove diferencijacije i funkcionalizacije .....	28
4.2. Druga kultivacija (3D2) – određivanje optimalnog vremena uzgoja stanica u 3D kulturi .....	29
4.2.1. Rast i razvoj morfologije stanica .....	29
4.2.2. Diferencijacija stanica .....	32
4.2.3. Funkcionalizacija stanica .....	36
4.2.4. Procjena stupnja diferencijacije i funkcionalizacije stanica .....	38
4.2.5. Statistička analiza.....	39
5. RASPRAVA .....	41
6. ZAKLJUČCI .....	45
7. LITERATURA.....	46

Popis kratica:

3D1	prva kultivacija
3D2	druga kultivacija
A2EN	stanična linija ljudskih endocervikalnih stanica
Ab	alcijansko modrilo, prema eng. <i>Alcian Blue</i>
APC	predočne stanice, prema eng. <i>antigen presenting cells</i>
BPE	ekstrakt goveđe hipofize, prema eng. <i>Bovine pituitary extract</i>
CaSki	stanična linija ljudskih endocervikalnih stanica
CD3+	T limfocit
CD66b+	granulocit
CTL	citotoksični limfociti T
DMEM	Dulbeccov modificirani Eaglov medij za uzgoj stanica, prema eng. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
E2	$\beta$ -estradiol
ECM	međustanična tvar, prema eng. <i>Extracellular Matrix</i>
Ect1/E6E7	stanična linija humanih endocervikalnih stanica
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina, prema eng. <i>Ethylendiamine tetraacetic acid</i>
EGF	ljudski rekombinantni epidermalni faktor rasta, prema eng. <i>Epidermal Growth Factor</i>
End1/E6E7	stanična linija humanih epitelnih endocervikalnih stanica
FBS	fetalni teleći serum, prema eng. <i>Fetal bovine serum</i>
HE	hemalaun-eozin
HeLa	stanična linija ljudskih endocervikalnih stanica
HIV	virus humane imunodeficijencije, prema eng. <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPV	humani papiloma virusa, prema eng. <i>Human papillomavirus</i>
IFN- $\gamma$	interferon gama, prema eng. <i>Interferon <math>\gamma</math></i>
IgA	imunoglobulin IgA
IgG	imunoglobulin IgG

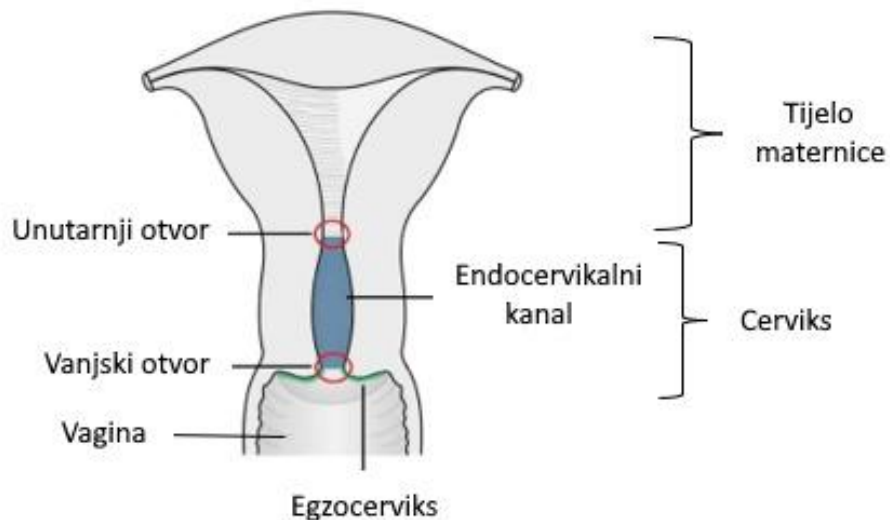


IL-8	interleukin 8, prema eng. <i>Interleukin 8</i>
KSFM	medij za stanice bez seruma, prema eng. <i>Keratinocyte serum-free medium</i>
LC	Langerhansove stanice
MUC1	transmembranski mucin
MUC16	transmembranski mucin
MUC4	transmembranski mucin
MUC5AC	gel formirajući mucin
MUC5B	gel formirajući mucin
MUC6	gel formirajući mucin
NFR	boja za jezgre, prema eng. <i>Nuclear Fast Red</i>
NK stanice	prirodnoubilačke stanice, prema eng. <i>Natural killer</i>
NLRs	NOD-like receptori, prema eng. <i>NOD-like receptors</i>
P4	progesteron
PAMP	patogenima pridruženih molekularnih sljedova, prema eng. <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PAS	Schiffova reakcija perjodnom kiselinom, prema eng. <i>Periodic Acid Schiff</i>
PBS	fostatni pufer, prema eng. <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PRR	evolucijski očuvani receptorski proteini, prema eng. <i>Pattern recognition receptors</i>
qPCR	kvantitativna lančana reakcija polimerazom, prema eng. <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RLRs	RIG-I-like receptori, prema eng. <i>RIG-I-like receptors</i>
RT-PCR	lančana reakcija polimeraze s reverznom transkripcijom, prema eng. <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SiHa	stanična linija humanih endocervikalnih stanica
TEER	transepitelni električni otpor, prema eng. <i>Transepithelial endothelial electrical resistance</i>
TLR7	Toll-like receptor 7
TLRs	Toll-like receptori, prema eng. <i>Toll-like receptors</i>
TNF- $\alpha$	faktor nekroze tumora alfa, prema eng. <i>Tumor necrosis factor</i>

# 1. UVOD

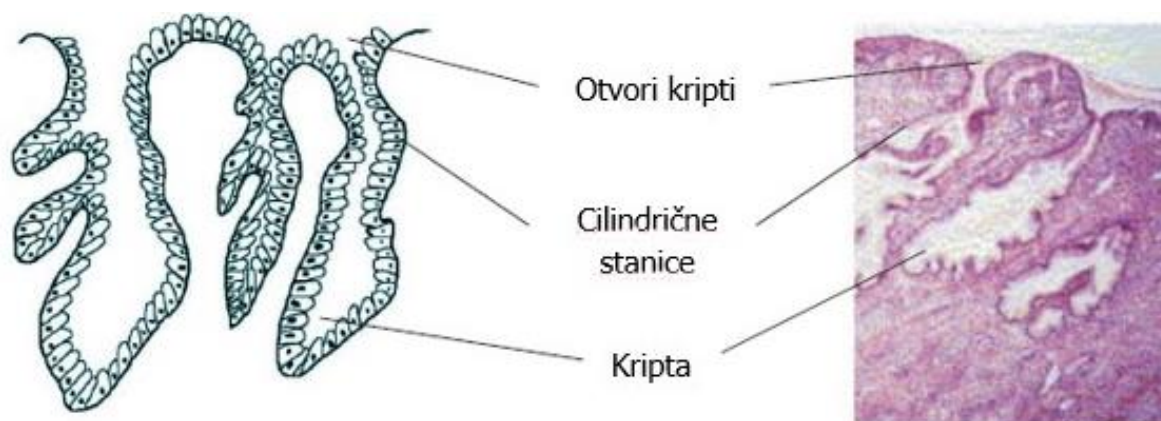
## 1.1 Vrat maternice

Vrat maternice (lat. *cervix uteri*) distalni je dio maternice, (lat. *uterus*) šupljeg neparnog organa ženskog reproduktivnog sustava smještenog u maloj zdjelici između mokraćnog mjehura i rektuma. Cerviks je cilindrične strukture, prosječne dužine 3-4 cm te promjera 2 cm. Povezuje šupljinu maternice s rodnicom tvoreći kanal podijeljen u dva dijela: egzocerviks, (lat. *portio supravaginalis cervicis*), te endocerviks, (lat. *portio vaginalis cervicis*). Kod cerviksa razlikujemo dva otvora: vanjski, (lat. *os externa*), te unutarnji, (lat. *os interna*) (Slika 1). Vanjski otvor je otvor egzocerviksa u rodnicu, a unutarnji otvor je iz endocerviksa prema šupljini maternice. Prolaz između vanjskog otvora i šupljine maternice definiran je kao endocervikalni kanal koji završava unutarnjim otvorom (Martyn i sur., 2014). Endocervikalni kanal prekriven je jednoslojnim cilindričnim (žljezdanim) epitelom te se nastavlja na epitel endometrija maternice, dok je egzocerviks prekriven neuroženim mnogoslojnim pločastim epitelom koji se nastavlja na epitel rodnice. Mjesto dodira pločastog epitela sa cilindričnim (žljezdanim) naziva se skvamokolumnarna granica.



**Slika 1.** Anatomski prikaz cerviksa (Preuzeto i prilagođeno s <https://teachmeanatomy.info/pelvis/female-reproductive-tract/cervix/>)

Cerviks ima mehaničko-potpornu ulogu zbog čvrste strome koja je građena od mišićno-vezivnog tkiva, te ulogu proizvodnje sluzi u jednoslojnom cilindričnom epitelu endocerviksa. Cervikalni kanal ne sadrži tipične žlijezde koje proizvode sluz, nego longitudinalne udubine ili pukotine zvane kripte (Slika 2) koje samo podsjećaju na žlijezde (Nakano i sur., 2015.). U samim kriptama između žljezdanih stanica nalaze se i cilijarne cilindrične stanice s ulogom tjeranja cervikalne sluzi prema endocervikalnom kanalu (Davajan, Nakamura, 1973). Dnevna proizvodnja sluzi varira s obzirom na fazu menstrualnog ciklusa. Sredinom ciklusa cerviks proizvodi cca. 600 mg, dok tijekom ostalih faza ciklusa 20-60 mg (Nakano i sur., 2015).



**Slika 2.** Endocervikalne kripte prekrivene cilindričnim stanicama (Preuzeto i prilagođeno s [https://publications.iarc.fr/\\_publications/media/download/4556/f0e203eba3c15419c810bde8409c5fa12b7dfae2.pf](https://publications.iarc.fr/_publications/media/download/4556/f0e203eba3c15419c810bde8409c5fa12b7dfae2.pf))

## 1.2. Cervikalna sluz

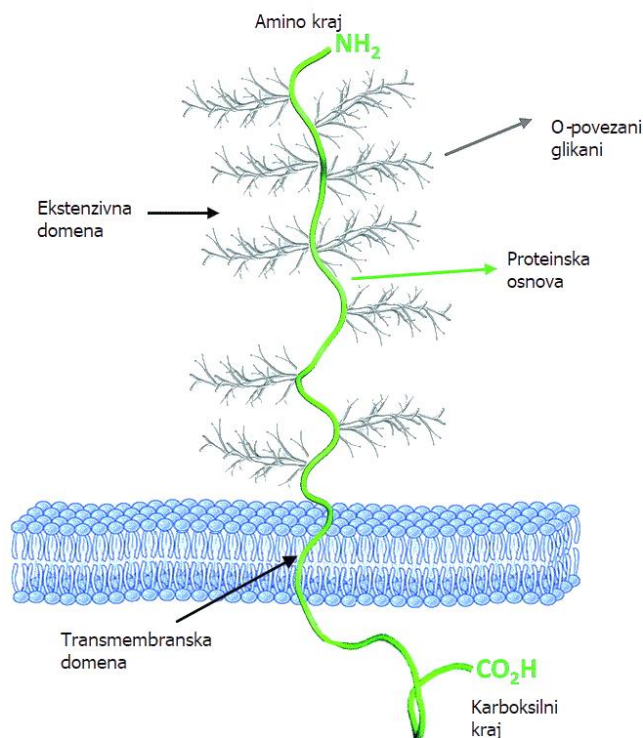
### 1.2.1 Uloga cervikalne sluzi

Cervikalna sluz (lat. *mucus*) ima važnu ulogu u plodnosti jer štiti spermije od neprijateljskog okoliša rodnice i fagocitoze vaginalnim leukocitima, filtrira morfološki normalne spermije i služi očuvanju velikog broja spermija unutar kripta cerviksa kako bi u periovulacijskom razdoblju olakšala njihov prolazak prema maternici (Insler, Lunenfeld 1978; Kase i sur., 2005). U drugim dijelovima ciklusa, cervikalna sluz sprječava pristup spermijima, različitim mikroorganizmima i mehaničkim česticama gornjem dijelu ženskog reproduktivnog sustava i peritonealnoj šupljini, istovremeno štiteći od infekcije koja može nastati njihovim prodorom.

### 1.2.2. Građa i svojstva cervikalne sluzi

Cervikalna sluz je hidrogel koji je sastavljen od niskomolekularne komponente i komponente visoke molekularne težine. Nisku molekularnu komponentu čini cervikalna plazma koja uglavnom sadrži elektrolite, organske komponente niske molekulske mase poput aminokiselina, kolesterola, lipida, glukoze, askorbinske kiseline i polisaharida (Gibbons i sur., 1973), dok visokomolekularnu komponentu čini gel faza sačinjena od enzima, baktericidnih proteina, proteina plazme te mreže mucina. Viskoznost cervikalne sluzi ovisi o mucinima, te o udjelu vode u sluzi (Schumacher i sur., 1977). Općenito, njena biokemijska i biofizička svojstva razlikuju se ovisno o fazi menstruacijskog ciklusa (Andersch- Björkman i sur. 2007), stoga u određenim fazama ciklusa cervikalna sluz ima funkciju prepreke ili medija za transport spermija (Katz i sur., 1997).

Mucini, glavni strukturni proteini sluzi, veliki su kompleksni glikoproteini koji se međusobno povezuju uspostavljanjem disulfidnih mostova. Mucine karakterizira ekstenzivna domena s puno kratkih glikanskih lanaca koji su *O*-glikozidnom vezom vezani za proteinsku osnovu (Slika 3). Nadalje, mucini se međusobno razlikuju s obzirom na veličinu, prirodu polimeriziranja te heterogenu glikozilaciju (Argueso i sur., 2002). U cerviksu su pronađeni gel formirajući mucini (eng. *gel-forming mucin*) MUC5B, MUC5AC, MUC6, te transmembranski mucini (eng. *membrane-spanning mucin*) MUC1, MUC4, MUC16. Od svih navedenih mucina, najviše se ističe MUC5B svojom visokom ekspresijom u sredini menstrualnog ciklusa (Gipson i sur., 1997, 2001, 2005; Flori i sur., 2007).



**Slika 3.** Prikaz transmembranskog mucina (Preuzeto i prilagođeno iz Martínez-Sáezi sur.,2017)

### 1.2.3. Cikličke promjene svojstava sluzi

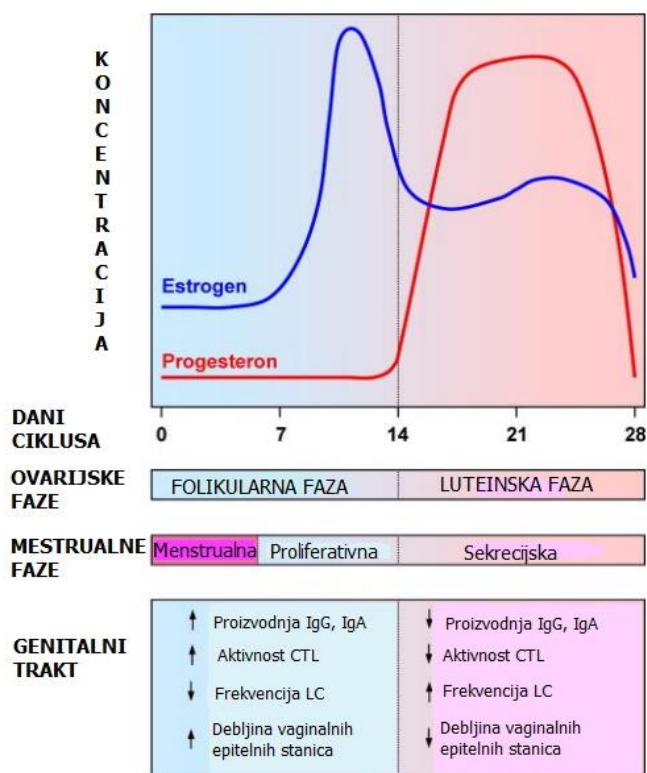
Cervikalna sluz se ciklički mijenja tijekom menstrualnog ciklusa zbog utjecaja hormona estrogena i progesterona. Različita svojstva sluzi objasnio je Odeblad još 1969. godine, te ih je opisao kao tip E (estrogenski) i tip G (progesteronski) (Odeblad, 1969). Tip E je prozirna, rijetka i vodenasta (98% vode) sluz pod utjecajem estrogena dok je tip G gusta i ljepljiva sluz pod utjecajem progesterona. U sredini ciklusa, kada su razine estrogena na vrhuncu, cervikalna sluz je obilna i rijetke konzistencije zbog povećanog sadržaja vode (Davajan, Nakamura, 1973) te sadrži 97% udjela sluzi tipa E i 3% udjela sluzi tipa G. Kada razine estrogena padnu, dolazi do povećanja razine progesterona te stvaranja sluzi visoke viskoznosti s manjim udjelom vode zbog prevladavanja udjela sluzi tipa G (Odeblad, 1968). Nadalje, postoje i 3 podtipa estrogenske sluzi s obzirom na uzorak kristalizacije: S, L i P podtip. Osim toga, podtipovi se razlikuju s obzirom na svoju funkciju tako da je S podtip odgovoran za transport spermija, dok L podtip sprječava prodor abnormalnih spermija (Vigil i sur., 2009).

#### 1.2.4. Imunologija cervikalne sluzi

Imunološko djelovanje cervikalne sluzi služi zaštititi genitalnog trakta od raznih patogena uz toleranciju alogenih spermija te zaštititi fetusa kao prirodnog alotransplantata. U toj obrani sudjeluju urođena i stečena imunost koje svojim protupatogenim mehanizmima ne ugrožavaju preživljavanje fetusa. Stečeni imuni odgovor koristi predočne stanice (APC, prema eng. *antigen presenting cells*) koje predočuju antigene peptide limfocitima T inducirajući njihovu aktivaciju koja uključuje proizvodnju citokina, citotoksičnost te sintezu antitijela. Prva linija obrane protiv patogena je urođeni imunološki sustav koji pomoću evolucijski očuvanih receptorskih proteina (PRR, prema eng. *pattern recognition receptors*) prepoznaje patogenima pridružene molekularne sljedove (PAMP, prema eng. *pathogen-associated molecular patterns*). Ti receptori (PRRs) uključuju Toll-like receptore (TLRs, prema eng. *Toll-like receptors*), RIG-I-like receptore (RLRs, prema eng. *RIG-I like receptors*) i NOD-like receptore (NLRs, prema eng. *NOD-like receptors*) koji danas imaju utvrđenu ulogu u prepoznavanju i dokazivanju prisutnosti raznih patogena. Primjer takvog prepoznavanja je ekspresija TLR7 i RIG-I kod osobe zaražene virusom humane imunodeficijencije (HIV, prema eng. *Human Immunodeficiency Virus*) (Berg i sur., 2012). Osim PRR, urođeni imunološki sustav uključuje i druge stanice koje sudjeluju u obrani od patogena: makrofage, dendritičke stanice, neutrofile, prirodno ubilačke stanice (NK stanice prema eng. *natural killer*) te epitelne stanice koje luče citokine, kemokine i antimikrobne molekule.

Nadalje, važno je napomenuti da je imunološki sustav cervikalne sluzi karakterističan po tome što je pod jakom hormonskom kontrolom koja regulira transport imunoglobulina, razine citokina, distribuciju različitih staničnih populacija i predočavanje antigena (Slika 4). Hormonskom kontrolom dolazi i do selektivnog prilagođavanja samog sustava kod fizioloških promjena kao što su oplodnja, implantacija, trudnoća te sam porod.  $\beta$ -estradiol (E2; vrsta estrogena) i progesteron (P4) utječu na imunološke sposobnosti epitelnih stanica, stromalnih fibroblasta te leukocita. U normalnom cerviksu prevladavaju limfociti T (McKenzie i sur., 1991), za razliku od B stanica koje su rijetko identificirane. Zanimljivo je kako je populacija stromalnih leukocita dinamična, te je njihova prisutnost u gornjem reproduktivnom traktu veća u odnosu na donji (Givan i sur., 1997). Primjerice, CD3+ T stanice imaju veću zastupljenost u gornjem

traktu, dok su granulociti CD66b+ i NK stanice zastupljenije u donjem traktu. S obzirom na proizvodnju imunoglobulina, u ženskom genitalnom traktu prevladava IgG izotip za razliku od klasično dominantnog IgA izotipa, dok je proizvodnju citokina teško izmjeriti zbog ometanja u standardizaciji mjerenja. Za to su zaslužni razni endogeni i egzogeni čimbenici kao što su: dob, hormonske promjene, infekcije, pušenje, izloženost sjemenu tijekom spolnog odnosa (Kyongo i sur., 2012). Tako se razina IL-8 (prema eng. *Interleukin 8*) povećava nakon spolnog odnosa kao odgovor na sjemenu plazmu (Thompson i sur., 1992), dok su neka istraživanja pokazala da su koncentracije TNF- $\alpha$  (prema eng. *Tumor necrosis factor  $\alpha$* ) i IFN- $\gamma$  (prema eng. *Interferon  $\gamma$* ) povećane u sluzi neplodnih žena u usporedbi s plodnim kontrolama (Naz i sur., 1995).



**Slika 4.** Utjecaj hormona tijekom menstrualnog ciklusa na debljinu vaginalnog epitela i različitih komponenti imunološkog sustava (IgA, IgG-immunoglobulini; CTL-Citotoksični limfociti T; LC- Langerhansove stanice (vrsta dendritičkih stanica) (Preuzeto i prilagođeno iz Hel i sur., 2010)

### **1.3. Istraživanje žljezdane aktivnosti endocerviksa**

#### **1.3.1. Istraživanje na animalnim modelima**

Aktivnost endocerviksa istražuje se na raznim animalnim modelima od kojih su najpopularniji mali glodavci (miš, štakor) i veći sisavci (krava, svinja). Općenito i od malih glodovaca, miš je najpopularniji eksperimentalni model zbog dobro proučenog genoma te njegove biologije. Kao modelni organizam ima brojne prednosti u odnosu na druge jer je to mala, jeftina životinja koje se dobro prilagodila laboratorijskim uvjetima te u kratkom vremenu daje velik broj potomaka. Reproductivni ciklus miša se sastoji od 4 faze: proestrus, estrus, metaestrus i diestrus te traje 4-5 dana. U proestrusu dolazi do rasta folikula te zadebljanja vaginalnog epitela. U estrusu se događa ovulacija te oticanje vaginalnog otvora. U meteaestrusu se pojavljuju žuta tijela i manji folikuli, te dolazi do ljuštenja vaginalnog epitela, dok su u diestrusu prisutna velika žuta tijela i mali folikula, a vaginalni epitel je stanjen. Faze ciklusa mogu se jednostavno pratiti svakodnevnim uzimanjem uzoraka stanica iz rodnice što je svakako plus u odabiru eksperimentalnog modela. No, modeli malih glodavaca su problematični zbog različite histološke i anatomske građe cerviksa čovjeka i glodavaca te ne mogu poslužiti kao odgovarajući model za proučavanje funkcije sekrecijskog epitela ljudskog endocerviksa (Hodges i sur., 2008; Ismail i sur., 2015). S obzirom na dužinu menstrualnog ciklusa (18-24 dana) i 2 faze (folikularne i luteinske faze), pogodniji model za istraživanje je svinja. Kao i kod žena, svinjski ciklus je pod hormonskom kontrolom te do ovulacije dolazi spontano. Kod svinja ciklus započinje i završava ovulacijom, čime se razlikuje od ženinog gdje se ovulacija odvija sredinom ciklusa. Nadalje, postoji i histološka sličnost jer i kod svinja nalazimo jednoslojni cilindrični epitel koji luči sluz. Količina izlučene sluzi ovisi o stadiju ciklusa te je povećana u vrijeme ovulacije (Lorenzen i sur., 2015), što je još jedna prednost u istraživanju aktivnosti endocerviksa. Treći značajan animalni model je krava, čiji ciklus traje 18-21 dana te se sastoji od proestrusa, estrusa, metaestrusa i diestrusa. Kravlji endocerviks sadrži kripte s epitelom koji je kubičan u diestrusu, dok u estrusu raste do cilindričnog. Ciklus je pod hormonskom kontrolom te je u vrijeme ovulacije sluz najobilnija, bistra i smanjene viskoznosti (El-Banna i sur., 1972).



### **1.3.2. Istraživanje na humanim modelima**

Endocervikalni uzorci ljudskog tkiva dobar su eksperimentalni model za ispitivanje ekspresije proteina i gena, promjena u građi cerviksa u različitim fazama menstrualnog ciklusa i trudnoći, te i za razna imunološka i mikrobiološka ispitivanja. No, različite fiziološke i dinamičke procese je teže proučavati. Naime, životinjama se mogu davati različiti agonisti, antagonisti i tvari kojima istraživač može prilagoditi uvjete organizma, dok kod ljudi to nije slučaj zbog prepreka etičke i praktične naravi. Humani model može se primijeniti tek za preliminarna istraživanja ili za konačnu provjeru onih hipoteza koje su već potvrđene na drugim modelima. Humani materijal kojim se barata je najčešće postoperativni (benigne i maligne promjene) te on kao takav nije idealan model za istraživanje.

### **1.3.3. Istraživanje u staničnoj kulturi**

Težeći prema prikladnijem modelu za istraživanje endocerviksa, te razvojem znanstvene metodologije, već 70-tih godina prošlog stoljeća razvijena je prva imortalizirana kultura ljudskih endocervikalnih stanica. Stanična kultura je vrlo dobra i korisna metoda za proučavanje specifičnih funkcija pojedinih stanica, te upravo zbog izoliranosti određenog biološkog procesa može biti dobar model istraživanja. No, kao i svaki eksperimentalni model, stanična kultura ima svoje nedostatke. Stanična kultura ne odražava stvarnu ukupnost fizioloških ili patoloških interakcija kao što je vidljivo kod animalnih modela. Uzimajući u obzir sve prednosti i nedostatke pojedinih eksperimentalnih modela, potrebno je izabrati model prilagođen fazi istraživanja.

## **1.4. Kultura stanica koje izlučuju sluz**

### **1.4.1. Primarna kultura**

Primarna kultura stanica je kultura uspostavljena iz organa, tkiva ili stanica dobivenih direktno iz organizma. Primjenom različitih mehaničkih, kemijskih ili enzimatskih postupaka razdvajanja, iz odabranog materijala dobivaju se raspršene ("dispergirane") stanice koje se nakon izolacije inkubiraju u hranjivom mediju. S vremenom, stanice se u tankom sloju prihvate za plastičnu podlogu, te su nakon postignute konfluentnosti spremne za daljnja presađivanja. Stanice primarne kulture su nemodificirane i pokazuju normalnu fiziologiju te se stoga upotrebljavaju kao učestao model za istraživanje fiziologije i biokemije stanica te za toksikološka istraživanja. Pored već spomenutih prepreka etičke i praktične naravi te upotrebe postoperativnog materijala, tkivo koje se koristi za izolaciju stanica može biti inficirano te kao takvo otvara mogućnost širenja infekcija kao što su hepatitis, HIV i tuberkuloza (Freshney, 2016). Primarna stanična kultura nakon većeg broja presađivanja postaje neprikladna za istraživanja jer postoji velika mogućnost funkcionalne i morfološke promjene stanica. Također, dob i genska podloga donora također igraju ulogu u različitom ponašanju stanica. Kontaminacija, spor rast, stanična smrt, ograničen životni vijek te mnoge druge poteškoće mogu utjecati na uspostavu primarne kulture te ona postaje izazov.

### **1.4.2. Kultura staničnih linija**

Stanična linija je definirana homogena populacija stanica dobivena iz primarne kulture, prilagođena rastu u kulturi. Pesađivanjem stanica nastaju konačne i kontinuirane stanične linije. Konačna stanična linija ima ograničen broj dioba te se formira nakon prvog presađivanja, dok kontinuirane stanične linije nastaju iz konačnih staničnih linija spontanom transformacijom ili transformacijom koja je potaknuta viralnim ili kemijskim putem. Kontinuirana stanična linija je imortalizirana te ima svojstvo "neograničenih" dioba (<https://userpages.umbc.edu/~jwolf/method5.htm>). Broj dioba razlikuje se među staničnim linijama, te ovisi o vrsti i različitosti staničnih linija. Za svaku pojedinu vrstu stanične linije koja je uzgajana pri jednakim uvjetima, broj dioba stanica je stalan (Freshney, 2005). Postoji i podjela s obzirom na način rasta, gdje

razlikujemo adherentne i suspenzijske stanične linije. Adherentne stanične linije rastu u jednom sloju na umjetnoj podlozi, dok one koje slobodno plutaju u mediju nazivamo suspenzijskim. Za razliku od primarnih kultura, stanične linije su okarakterizirane te se s njima može lako i dugo raditi - manipulirati i presađivati ih (Kaur, Dufour 2012). No, i kod njih može doći do fizioloških i morfoloških promjena zbog djelomične sličnosti s izvornom primarnom kulturom. Stanične linije su dobar model za preliminarna istraživanja, nakon kojih bi slijedila istraživanja na primarnim kulturama radi interpretacije i legitimnosti rezultata. Naime, staničnim linijama nedostaju ključna morfološka i funkcionalna obilježja koja primarne kulture imaju radi sličnosti s izvornim tkivom. HeLa je najstarija i najpoznatija stanična linija izolirana iz raka cerviksa, te je u širokoj upotrebi još i danas. Uz nju, danas se koriste i druge cervikalne stanične linije za proučavanje raznih bolesti i stanja koja zahvaćaju ženski reproduktivni sustav. Takav primjer je upotreba cervikalnih staničnih linija Ect1/E6E7 i SiHa u istraživanjima raka (Roy, Mukherjee 2014), CaSki kod humanog papiloma virusa (HPV, prema eng. *Human papillomavirus*) (Magaldi i sur., 2012) te A2EN kod proučavanja profila imunomedijatora (Buckner i sur., 2011).

### **1.4.3. Trodimenzionalna kultura stanica (3D)**

Trodimenzionalna kultura stanica, skraćeno 3D kultura (prema eng. *Tree dimensional*) je kultura stanica koja poboljšava uvjete rasta stanica u staničnoj kulturi na način da im omogućuje interakciju s međustaničnom tvari u trodimenzionalnom prostornom odnosu s njom. Na taj način dolazi do poboljšavanja staničnih interakcija ("cell - to cell") te unutarstanične signalizacije (Abbott, 2003). 3D kultura teži uspostavi što realnijih uvjeta iz organizma, čime se stanicama omogućuje diferencijacija u složenije strukture.

#### **1.4.3.1. Podjela 3D kulture**

Prema Freshney-u razlikujemo dva glavna pristupa 3D kulturi stanica te s obzirom na njih 3 glavna tipa 3D kulture stanica (Freshney, 2016):

Pristupi 3D kulturi stanica:

- 1) Pristup u kojemu se uzima u obzir da u tkivu postoji više vrsta stanica te se one zajedno izoliraju i nasade u kulturu koja se dalje održava kao kultura organa.
- 2) Pristup u kojemu se pojedini tipovi stanica zasebno izoliraju, pročišćavaju i umnožavaju, prouče u zasebnim kulturama i tek potom udruže kako bi se proučile njihove međusobne interakcije.

Glavni tipovi 3D kulture stanica:

- 1) kulture organa (eng. *organ culture*) – tip kulture u kojoj se cijeli organi, ili najbitniji dijelovi, održavaju kao mali fragmenti u kulturi, gdje zadržavaju svoj brojčani i prostorni raspored.
- 2) histotipična (histotipska) kultura (eng. *histotypic culture*) – tip kulture u kojoj se jedna linija stanica uzgaja do velike gustoće na trodimenzionalnoj podlozi ili im se omogući da u staničnoj suspenziji formiraju trodimenzionalne agregate stanica.
- 3) organotipična (organotipska) kultura (eng. *organotypic culture*) – tip kulture u kojoj se stanice različitih linija rekombiniraju u eksperimentalno određenim omjerima i prostornom rasporedu kako bi se oponašala građa proučavanog organa.

Osim podjele 3D kulture stanica na tri glavna tipa, postoji i podjela s obzirom na korištenu tehnologiju, odnosno primjenu trodimenzionalnih matrica (eng. *scaffold*) (Freshney, 2016). Te matrice predstavljaju skelu namijenjenu uzgoju stanica i oblikovanju novog tkiva. Matrica je napravljena od prirodnih ili sintetičkih materijala te je najčešće porozna s međusobno povezanim porama.

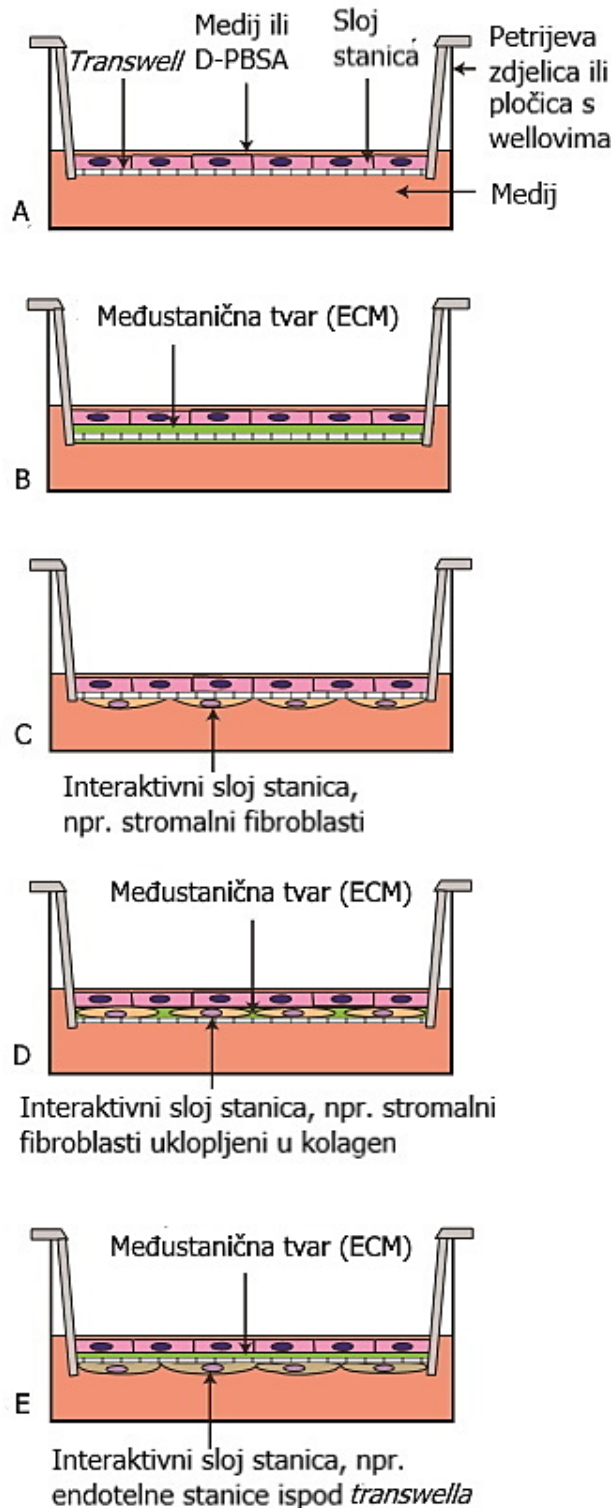
Podjela 3D kultura stanica prema korištenoj tehnologiji:

- 1) 3D kultura bez matrice (eng. *scaffold-free*)
- 2) 3D kultura s matricom (eng. *scaffold-based*)

Važno je napomenuti da se zbog mnogih prednosti 3D kultura, tehnologija 3D kulture brzo razvija i da danas već postoji puno različitih tehnologija i vrsta koje nisu spomenute u ovom diplomskom radu.

#### **1.4.3.2. Histotipična 3D kultura endocervikalnih stanica uspostavljena upotrebom međustanične tvari i *transwell* podloge**

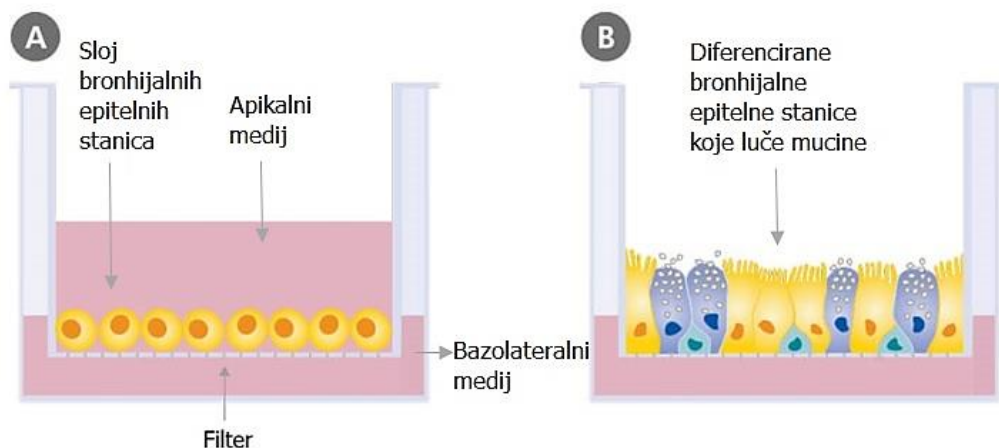
Histotipična 3D kultura stanica može se uspostaviti upotrebom tehnologije koja primjenjuje tzv. *transwell* podloge i bjelančevine međustanične tvari (ECM, eng. *extracellular matrix*). *Transwell* podloge su komercijalno dostupne *matrice* koji se umeću u jažice pločice za stanice ili Petrijeve zdjelice kao umetak. Takve podloge izgledaju kao filter izrađen od različitih transparentnih materijala. Filter može imati različite veličine pora te može biti obložen međustaničnom tvari ili neobložen. Pore filtera omogućuju izmjenu plinova i medija koje doprinose rastu stanica nasadenih na *transwell* podlogu. Stanice se mogu nasaditi i s donje strane podloge, strane koja gleda prema dnu jažice dok je gornja strana podloge obložena međustaničnom tvari (Slika 5). Uporabom *transwell* podloga, stanice rastu do visoke gustoće te takva kultura podsjeća na tkivo. Uporabom *transwell* podloge postignuta je i diferencijacija epitelnih stanica (Handler i sur., 1984) te uspostava električnog potencijala bazalnih i apikalnih membrana (Cereijido i sur., 1978). Osim uporabe *transwell* podloge, poboljšanju uvjeta 3D kulture stanica pridonosi primjena bjelančevina međustanične tvari. U tu svrhu najčešće se upotrebljava kolagen ili hidrogel koji unutar vodenog medija sadrži umrežene prirodne materijale (laminin, kolagen IV, heparan sulfat proteoglikani). Korištenjem bjelančevina međustanične tvari dolazi do oponašanja *in vivo* staničnog okruženja, te poboljšavanja prijanjanja i diferencijacije stanica (<https://www.corning.com/worldwide/en/products/life-sciences/products/surfaces/matrigel-matrix.html>). Kako se stanice prilagođavaju supstratu na kojem rastu, korištenjem hidrogela u 3D kulturi rješava se problem nastanka spljoštene stanične morfologije koja nastaje zbog primjene umjetnog supstrata u 2D (dvodimenzionalno, prema eng. *Two dimensional*) kulturama stanica.



**Slika 5.** Prikaz različitih prereza podloge *transwell*. **A** Jedan sloj stanica na podlozi koja nije obložena međustaničnom tvari. **B** Jedan sloj stanica na podlozi obloženoj međustaničnom tvari. **C** Dodani interaktivni sloj stanica ispod podloge. **D** Interaktivni sloj stanica uklopljen u međustaničnu tvar. **E** Interaktivni sloj stanica dodan na donju stranu podloge koja je s gornje strane obložena međustaničnom tvari (Preuzeto i prilagođeno iz Freshney, 2016)

### 1.4.3.3. Prednosti primjene 3D kulture stanica u istraživanju izlučivanja sluzi

Mnoga istraživanja su pokazala da epitelne stanice sa svojstvom izlučivanja sluzi u 2D kulturi ne postižu potpunu polarizaciju kao u 3D kulturi stanica. Primjenom tehnologija koje se koriste za uspostavu 3D kulture dolazi do poboljšanja uvjeta kultiviranja stanica. U tim uvjetima stanice rastu u prirodnijem okruženju te time dolazi do smanjenja stresa i negativnog odgovora na umjetni supstrat 2D kulture. Ključan preduvjet za uspostavu takve kulture je uzgoj stanica na granici "medij - zrak", na podlozi koja sadrži bjelančevine međustanične tvari (Slika 6). U takvim uvjetima dolazi do potpune polarizacije i nastanka međustaničnih spojeva. Daljnjim kultiviranjem stanica postiže se slojeviti fenotip s potpunim ili mjestimičnim višeslojnim rastom stanica koje luče mucine. Buckner je pokazao da polarizirane stanice luče mucin MUC5B za razliku od nepolariziranih čije je lučenje bilo ispod razine detekcije ili ga nije bilo (Buckner i sur., 2011). Također je pokazano da granica "medij - zrak" doprinosi rastu stanica u više slojeva u odnosu na konvencionalni rast. Polarizirane stanice nakon presađivanja na 2D podlogu gube stečenu polarnost te tada rastu u jednom sloju kao i prije same polarizacije (Miessen i sur., 2012). Upravo zbog nemogućnosti polarizacije stanica u 2D kulturi, 3D kulture stanica su sve učestaliji modeli za postizanje polarizacije i funkcije lučenja koja je slična izvornom tkivu.



#### 1.4.3.4. Izazovi u uspostavljanju 3D kulture

Dobro uspostavljena 3D kultura stanica je preduvjet uspješnosti samoga pokusa. Pokazano je da epitelne stanice luče sluz samo kada su polarizirane te je tek tada moguća detekcija raznih mucina, kao što je gel formirajući mucin MUC5B (Buckner i sur., 2011). Važno je naglasiti da i odabir biomaterijala od kojeg je sastavljena matrica može utjecati na diferencijaciju stanica neovisno o uvjetima stanične kulture (Ravindran i sur., 2011). Nadalje, uspješnost stanične kulture sa svojstvom izlučivanja sluzi bitno je provjeravati tijekom i pri završetku eksperimenta. Epitelne stanice koje rastu na *transwell* podlozi, nakon nekoliko dana kultiviranja stvaraju čvrste spojeve (nepropusni spojevi, *tight junction*, *zonula occludens*) na čiju brzinu stvaranja utječe međustanična tvar (Freshney, 2016). Čvrsti spojevi sastoje se od transmembranskih i perifernih membrana koje međusobnim djelovanjem stvaraju složenu adhezijsku mrežu (Matter i sur., 2005; Shin i sur., 2006). Epitelne stanice stvaraju elektrokemijski gradijent između apikalne i bazalne površine što je pokazatelj djelotvornosti barijere čvrstih spojeva (Planchon i sur., 1999). Dolazi do ograničavanja transepitelne propusnosti u fiziološki reguliranom transportu kroz stanice, a pericelularni transport gotovo pada na nulu. Proces se može pratiti na više načina: gledanjem boje (npr. fluorescentna boja *Lucifer Yellow*) ili praćenjem povećanja transepitelnog električnog otpora (TEER, prema eng. *Transepithelial/endothelial electrical resistance*), odnosno mjerenjem integriteta stanične barijere (Tsukita i sur., 2001). Ta se mjerenja obavljaju svaki dan, te se smatra da su stanice polarizirane i diferencirane kada je njihov TEER > 1000  $\Omega/\text{cm}^2$  (Fahey i sur., 2005). Nadalje, nastanak međustaničnih spojeva se može detektirati vizualizacijom proteina kladina, koji je uz okcludin važna komponenta čvrstih spojeva. Kladini i okcludini sudjeluju u polarizaciji epitela koji tvori zaštitnu barijeru i regulira kretanje različitih molekula. U ženskom reproduktivnom sustavu E2 regulira ekspresiju kladina i okcludina, te dolazi do otpuštanja čvrstih spojeva i većeg protoka molekula kroz epitel (Al-Harhi i sur., 2001; Zeng i sur., 2004). Na taj način fiziološke koncentracije E2 značajno smanjuju TEER epitelnih stanica maternice čovjeka (Wira i sur., 2010). Kladin se može detektirati pomoću imunohistokemije (npr. Buckner i sur., 2011), elektronske mikroskopije, *Western blot* metode itd. Za bojanje i lako razlikovanje staničnih komponenti koristi se klasično histološko bojanje hemalaun-eozin (HE). Diferencijacija epitelnih stanica u 3D kulturi može se detektirati i bojanjem mucina. Oni se mogu obojati ili se njihova ekspresija može izmjeriti pomoću reverzne transkripcije-lančane reakcije polimerazom (RT-



PCR, prema eng. *Reverse transcription polymerase chain reaction*) (npr. Buckner i sur., 2011; Arslan i sur. 2015). Boje koje se najčešće koriste su PAS (prema eng. *Periodic Acid Schiff*) i alcijansko modrilo (Ab, prema eng. *Alcian Blue*) koji bojaju mukopolisaharide. Alcijansko modrilo u plavo boja kisele mukopolisaharide, dok PAS boja neutralne mukopolisaharide u grimizno-crvenu boju. Kako je izlučivanje mucina pod hormonskom kontrolom, za provjeru kulture se mogu dodavati spolni hormoni (npr. Arslan i sur., 2015). Također, može se mjeriti izražaj hormonskih receptora pomoću kvantitativne lančane reakcije polimerazom (qPCR, prema eng. *quantitative polymerase chain reaction*). Osim navedenog mogu se mjeriti i drugi proteini koje proizvode ove stanice, npr. TLR, antimikrobni peptidi, citokini, kemokini (Buckner i sur., 2011).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj ovog diplomskog rada je ispitati i odabrati optimalne eksperimentalne uvjete za uzgoj endocervikalnih stanica u 3D kulturi kojima se postiže najviši stupanj diferencijacije i funkcionalnosti tih stanica u uvjetima laboratorija za kulturu stanica u kojem će se izraditi ovaj rad.

Specifični ciljevi su:

1. Kultivirati endocervikalne stanice u nekoliko eksperimentalnih postavki kombinirajući različite koncentracije i vrijeme izlaganja međustaničnoj tvari, vrijeme inkubacije stanica u kulturi te različito vrijeme izlaganja  $\beta$ -estradiolu.
2. Testirati pokazatelje diferencijacije i funkcionalnosti za svaku eksperimentalnu postavku citološkim, citokemijskim i imunocitokemijskim postupcima, te potvrditi nalaze primjenom elektronske mikroskopije.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Priprema 3D kulture endocervikalnih stanica End1/E6E7**

##### **3.1.1. Postavljanje 2D stanične kulture iz smrznutih stanica**

U ovom diplomskom radu korištena je stanična linija humanih epitelnih endocervikalnih stanica End1/E6E7 (ATCC® CRL2615™; ATTC). Stanice u zatvorenoj bočici su polako odmrzavane u vodenoj kupelji pri 37°C do potpunog otapanja. Zatvorena bočica sa stanicama je prije otvaranja dezinficirana 70%-tnim etanolom. Stanice su prebačene u flasku u koju je zatim polako dodavan prethodno ugrijan medij za stanice bez seruma (KSFM, prema eng. *Keratinocyte-SFM (1x) serum Free medium*; Gibco, Life Technologies, SAD) s dodatkom ekstrakta goveđe hipofize (BPE, prema eng. *Bovine pituitary extract*, ATCC), ljudskog rekombinantnog epidermalnog faktora rasta (EGF, prema eng. *Epidermal Growth Factor*, Gibco Life Technologies, SAD) i reagensa za uklanjanje mikoplazmi (MycoZap 500X, Lonza) , u daljnjem tekstu KSFM+BEM. Stanice su uzgajane na 37°C s 5% CO<sub>2</sub>.

##### **3.1.2. Presađivanje stanica**

Stanice su presađivane u laminaru pri sterilnim uvjetima te su sve korištene kemikalije prethodno zagrijane na 37°C. Presađivanje stanica započinje uklanjanjem starog medija iz flaske te dodavanjem 3 mL 0,25% Tripsina (Sigma, Njemačka u kombinaciji s 0.03% Etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA, od eng. *Ethylenediamine tetraacetic acid*, Sigma) pri sobnoj temperaturi 5-15 minuta. Odljepljivanje stanica praćeno je pod invertnim mikroskopom te kada se približno 90% stanica odlijepilo, odljepljene stanice su prebačene u epruvetu *Falcon* od 50 mL. Flaska je isprana s još 6-8 ml Dulbeccovog modificiranog Eaglovog medija za uzgoj stanica (DMEM, prema eng. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco, SAD) kombinaciji s 10% fetalnog telećeg serum (FBS, prema eng. *Fetal bovine serum*, Gibco, SAD) te je ostatak stanica dodan u epruvetu *Falcon* sa stanicama. Epruveta sa stanicama je centrifugirana na 130x g 10 minuta, dobiveni supernatant je uklonjen, a talog resuspendiran s 30 ml svježeg i ugrijanog KSFM+BEM-a. Resuspendirane stanice su nasadene u novu flasku u koju je dodano 20 ml istoga medija. Stanice su uzgajane na 37°C s 5% CO<sub>2</sub> do sljedećeg presađivanja ili promjene medija svaka 2-3 dana. Za prvu kultivaciju korištene su stanice koje

su nakon odmrzavanja presađene jednom, dok su za drugu kultivaciju korištene stanice koje su tri puta presađivane prije nasađivanja na podlogu za uzgoj 3D kultura.

### 3.1.3. Priprema podloge za 3D kulturu

Podloga za uzgoj stanica u 3D kulturi sastojala se od tzv. *transwell* podloge (Polyester transwell inserts 6.5 mm/ 0.4  $\mu\text{m}$  pore-size; Corning) prethodno obložene međustaničnom tvari Corning® Extracellular Matrix dobivene iz ljudske posteljice (Corning). Međustanična tvar se proizvodi i dostavlja u obliku praha, te se razrjeđuje u mediju KFSM+BE. U prvom eksperimentu (prva kultivacija) koncentracija međustanične tvari u mediju bila je  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  za kulture 1 - 6, a  $3,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  za kulture 7 -12 (Tablica 1). U drugoj kultivaciji, na sve *transwell* podloge stavljena je međustanična tvar u koncentraciji  $3,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Na svaku *transwell* podlogu promjera 6,5 mm nanoseno je po 100  $\mu\text{l}$  tako razrijeđene međustanične tvari. Nakon 2 ili 4 sata isisavanjem je uklonjen ostatak međustanične tvari, a površina *transwell* podloge isprane fosfatnim puferom (PBS, prema eng. *Phosphate-Buffered Saline*, Sigma). Ovako pripremljena podloga bila je spremna za nasađivanje stanica.

**Tablica 1.** Dizajn prve kultivacije u kojem su vidljive koncentracije i vrijeme izlaganja međustaničnoj tvari.

Redni broj kulture	Koncentracija međustanične tvari ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Vrijeme izlaganja podloge međustaničnoj tvari (h)
1, 2, 3	10	2
4, 5, 6	10	4
7, 8, 9	3,3	2
10, 11, 12	3,3	4

### 3.1.4. Nasađivanje stanica i održavanje 3D kulture

Kad stanice postignu konfluentnost 80 – 90%, spremne su za nasađivanje na prethodno pripremljene *transwell* podloge. Prije nasađivanja, stanice su izbrojane na način da je nakon tripsinizacije i dodavanja minimalnog volumena medija KSFM+BEM, 10  $\mu$ l suspenzije stanica pomiješano s 90  $\mu$ l otopine tripanskog modrila (Gibco) te od toga 10  $\mu$ l nanese na Neubauerovu komoricu za brojanje stanica. Broj stanica dobiven brojanjem na komorici pomnožen je sa 100 000 i tako je dobivena koncentracija stanica u suspenziji. Stanice u suspenziji su potom razrijeđene do gustoće od  $2,5 \times 10^4$  stanica u 100  $\mu$ l medija. 100  $\mu$ l tako pripremljenih stanica je nasađeno na pripremljene *transwell* podloge. 600  $\mu$ l medija (KSFM+BEM i dodano je u jažicu ispod podloge, kroz otvor na bočnoj plohi nosača *transwell* podloge). Medij se na taj način nalazio ispod i oko same podloge, pa se stoga naziva i bazolateralni medij. Nakon 24-h površinski medij je uklonjen, a bazolateralni medij iz jažica zamijenjen novim medijem iste formulacije uz dodatak 0,4 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (Sigma). Dodatak kalcija potiče diferencijaciju epitelnih stanica, pa se stoga naziva i medij za diferencijaciju. Nasađene stanice su rasle u inkubatoru na 37°C s 5%  $\text{CO}_2$ . Medij se mijenjao svaka 2-3 dana.

Stanične kulture održavane su u prvoj kultivaciji 12 dana, nakon čega su proslijeđene na citološku, citokemijsku i imunocitokemijsku analizu. Dizajn druge kultivacije uključivao je uzgoj kultura u različitim vremenskim razdobljima, što je prikazano u Tablici 2. Od 18. do 24. dana od početka uzgoja u mediju za diferencijaciju, svaka dva dana su po dvije stanične kulture (netretirana i tretirana  $\beta$ -estradiolom) proslijeđene na citološku, citokemijsku i imunocitokemijsku analizu. Kontrolni uzorak uzgajan je samo 6 dana od dana nasađivanja.

**Tablica 2.** Dizajn druge kultivacije humanih endocervikalnih stanica uzgojenih u 3D staničnoj kulturi. Kulture kojima je dodan  $\beta$ -estradiol označene su oznakom E2+, dok ostale kulture imaju oznaku E2-.

Oznaka kulture	Broj dana inkubacije u mediju za diferencijaciju	Broj dana tretmana estrogenom
3D2/d6	6	/
3D2/d18/E2-	18	/
3D2/d18/E2+	18	2
3D2/d20/E2-	20	/
3D2/d20/E2+	20	4
3D2/d22/E2-	22	/
3D2/d22/E2+	22	6
3D2/d24/E2-	24	/
3D2/d24/E2+	24	8

### 3.1.5. Dodavanje $\beta$ -estradiola u 3D kulturu stanica

Šesnaesti dan uzgoja, polovici staničnih kultura druge kultivacije je u medij za diferencijaciju (KSFM+BEM + 0,4 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) dodan  $\beta$ -estradiol  $\geq 98\%$  (E8875-250MG, Sigma-Aldrich) u konačnoj koncentraciji od 1 nM. Medij s dodanim  $\beta$ -estradiolom mijenjao se jednakim ritmom kao i medij za diferencijaciju u netretiranim kulturama.

### 3.1.6. Praćenje rasta stanica u kulturi

U svrhu praćenja napretka 3D kulture, stanice su prilikom svake izmjene medija promatrane i fotografirane automatskim višekanalnim fluorescentnim mikroskopskim sustavom EVOS® FL *Auto Imaging System* (ThermoFisher, SAD) pri povećanju 2x i 10x.

## **3.2. Citologija, citokemija i imunocitokemija**

### **3.2.1. Fiksacija, uklanjanje u parafin i rezanje stanica**

3D kulture stanica su nakon zadanog razdoblja isprane 0,1 M fosfatnim puferom (PBS), fiksirane otopinom 4% formalina u PBS-u 30 minuta te potom ispirane PBS-om 3 x 5 minuta i destiliranom vodom 2 x 5 minuta. Slijedila je dehidracija u uzlaznom nizu etanola (25%, 50%, 70%, 96%, 99%, 100%) u svakoj koncentraciji alkohola po 5 minuta. *Transwell* podloge s fiksiranim stanicama su izrezane iz nosača te uronjene u otopinu Histoclear (Biognost, Hrvatska) 2 x 5 minuta te u mješavini Histocleara i parafina Biowax (Biognost, Hrvatska) (1:1) u kojoj su 5 minuta stajale na 58 – 60 °C. Pri istoj temperaturi, uzorci su uronjeni u 100% parafin Biowax (Biognost) 3 x 15 minuta te su pomoću kalupa uklopljeni u parafinske blokove kao da se radi o uzorku tkiva. Parafinski blokovi s *transwell* podlogama su rezani pomoću mikrotoma (Leitz 1512) na rezove debljine 8 µm te su postavljeni na pozitivno nabijena predmetna stakalca Superfrost™ Plus Gold Slides (ThermoScientific). Parafinski rezovi su korišteni za citološka, citokemijska te imunocitokemijska bojanja. Stakla s uzorcima omekšana su u termostatu na 60°C 30 minuta. Nakon vađenja iz termostata, stakalca su ohlađena 10 minuta na sobnoj temperaturi. Prije bojanja parafinski rezovi su deparafinirani i rehidrirani uranjanjem u Histoclear (Biognost) 2 x 5 minuta, silazni niz alkohola (100%, 96%, 70%) 2 x 5 minuta i destiliranu vodu po 5 minuta.

### **3.2.2. Bojanje hemalaunom i eozinom**

Citološko bojanje hemalaunom i eozinom koristilo se radi prikazivanja građe stanica. Otopina hemalauna (Biognost) pripravljena je ukuhavanjem 1 g hematoskilina (C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>) s 0,2 g natrij jodata (NaIO<sub>3</sub>), 50 g kalij alauna (KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·12H<sub>2</sub>O), 50 g klorahidrata (CCl<sub>3</sub>CH(OH)<sub>2</sub>) u 1 litri destilirane vode. U takvu profiltriranu i ohlađenu otopinu, pripremljeni deparafinirani i rehidrirani uzorci su uronjeni 10 minuta. Uzorci su potom isprani destiliranom vodom 2 x 3 minute te vodovodnom vodom 3 minute. Nakon toga, uzorci su uronjeni u 1% otopinu eozina (Kemika) 3 minute te isprani destiliranom vodom 2 x 3 minute i dehidrirani uzlaznim nizom alkohola (70%, 96%, 100%) po 5 minuta. Slijedilo je uranjanje u mješavinu

Histocleara (Biognost) i alkohola (1:1) 5 minuta, u Histoclear (Biognost) 2 x 5 minuta te poklapanje sredstvom za poklapanje Biomount (Biognost). Obojeni citološki rezovi analizirani su svjetlosnim mikroskopom Axioskop Optonte (Zeiss, Njemačka) i dokumentirani priključenom kamerom Canon EOS400D.

### **3.2.3. Bojanje alcijanskim modrilom**

Citokemijskom reakcijom alcijanskim modrilom (Ab, prema eng. *Alcian blue*) prikazani su kiseli mukopolisaharidi u unutarstaničnim sekrecijskim mjehurićima kao znak sintetske aktivnosti diferenciranih stanica. Ranije deparafinizirani i rehidrirani uzorci su uronjeni 1 sat u 1% otopinu alcijanskog modrila (Biognost) u 3% octenoj kiselini (Kemika), pH=2,5. Uzorci su ispirani destiliranom vodom 2 x 3 minute te vodovodnom vodom 3 minute. Nakon ispiranja vodom, radi dodatnog prikazivanja jezgre korišteno je kontra bojanje Nuclear Fast Red (NFR, f Merck). 0,5% NFR u 5% vodenoj otopini aluminij sulfata  $Al_2(SO_4)_3$  se prvo prokuha, ohladi, filtrira te koristi za bojanje dijela uzoraka u trajanju od 10 minuta. Uzorci su ispirani destiliranom vodom 2 x 3 minute i dehidrirani uzlaznim nizom alkohola (70%, 96%, 100%) 1 x 5 minuta. Slijedilo je uranjanje u mješavinu Histoclear-a (Biognost) i alkohola (1:1) 5 minuta, u Histoclear (Biognost) 2 x 5 minuta te poklapanje sredstvom za poklapanje Biomount (Biognost). Obojeni citokemijski rezovi analizirani su svjetlosnim mikroskopom Axioskop Opton te dokumentirani priključenom kamerom Canon EOS400D.

### **3.2.4. Imunocitokemijsko prikazivanje prisutnosti kladina 4**

Imunocitokemijskim postupkom se pomoću primarnog protutijela anti-claudin-4 (Invitrogen) te sekundarnih protutijela (AlexaFluor 488 i AlexaFluor 546, ThermoFischer Scientific) prikazala prisutnost bjelančevine kladin-4 u nepropusnim međustaničnim spojevima na dodiru membrana susjednih diferenciranih epitelnih stanica. Deparafinizirani i rehidrirani uzorci su demaskirani uranjanjem u svježe pripremljen citratni pufer (20mM natrij citrata, 0.05% Tween 20 (Sigma), pH 6) te zagrijavani u mikrovalnoj pećnici do vrenja puferske otopine tijekom 10 minuta. Nakon hlađenja uzoraka u citratnom puferu do sobne temperature, uzorci



su isprani otopinom fosfatnog pufera (PBS, pH = 7,4) 2 x 5 minuta, te 30 minuta inkubirani otopinom za blokiranje (5% kozjeg seruma u PBS-u s 0,25% Triton X-100; Sigma) radi sprječavanja nespecifičnog vezanja sekundarnog protutijela. Nadalje, uzorci su inkubirani primarnim protutijelom anti-claudin-4 (Invitrogen) koje je razrijeđeno 1:100 u otopini za blokiranje (5% kozjem serum u PBS-u s 0,25% Triton X-100; Sigma). Na negativne kontrole je nanjena samo otopina za blokiranje. Nakon inkubacije preko noći na +4°C, svi uzorci su isprani PBS-om 3 x 5 minuta. Uzorci su potom 2h inkubirani u otopini protu-mišjeg sekundarnog protutijela AlexaFlour488 proizvedenom u kozi (ThermoFischer Scientific) i protu-mišjeg sekundarnog protutijela AlexaFlour488 proizvedenom u magarcu (Thermo Fischer Scientific) razrijeđenog PBS-om u omjeru 1:500. Slijedilo je ispiranje PBS-om, obilježavanje jezgara fluorescentnom bojom 40,6-diamidin-20-fenilindoldihidroklorid (DAPI; Roche Diagnostic) razrijeđene 1:8000 u PBS-u na 10 minuta pri sobnoj temperaturi te poklapanje obojanih uzoraka sredstvom za poklapanje Fluoromount (DAKO). Nakon sušenja, dobiveni uzorci analizirani su konfokalnim mikroskopom Olympus FV3000.

### **3.3. Elektronska mikroskopija**

Dijelovi *transwell* podloge veličine 1,5 x 1,5 mm su zajedno s diferenciranim stanicama izrezani, uronjeni preko noći u fiksativ (4% paraformaldehid, 1% glutaraldehid u 0,1M fosfatnog pufera), isprani u 0,1 M fosfatnog pufera, te postfiksirani 1 sat u 1%-tnoj otopini osmij-tetroksida (OsO<sub>4</sub>). Nakon ispiranja u 0,1 M PBS-om, uzorci su dehidrirani u uzlaznom nizu etanola, te primjenom acetona kao intermedija uklopljeni u smolu Durcupan (Fluka Sigma-Aldrich). Polutanki i ultratanki rezovi rezani su ultramikrotomom PowerTome XL Ultramicrotome (RMC Products). Polutanki rezovi debljine 1 µm, obojeni bojom toluidinsko modri (0,1% toluidin, 1% Na-tetraborat u vodi), poslužili su za odabir odgovarajućih ultratankih rezova na svjetlosnom mikroskopu. Ultratanki rezovi debljine 70 nm kontrastirani su 2%-tnom otopinom uranil acetata u vodi i otopinom olovnog citrata po Reynoldsu. Rezovi su analizirani transmisijskim elektronskim mikroskopom JEM1010 (Jeol) i snimljeni kamerom CCD kamera MegaView (Olympus)

### **3.4. Obrada i analiza rezultata**

Fotografije citološki, citokemijski i imunocitokemijski obojanih uzoraka staničnih kultura obrađene su programima Paint.NET-a i ImageJ, radi prilagodbe veličine i kvalitete slike te postavljanja crte mjerila. Morfologija i brojnost stanica, te prisutnost i zastupljenost međustaničnih spojeva analizirani su i prikazani opisno, a jačina fluorescentnog signala imunocitokemijske reakcije analizirana je semikvantitativno i prikazana tablično uz primjenu simbola „+“ i „-“. Podatci semikvantitativne analize obradit će se statistički primjenom neparametrijskih statističkih testova (Spearmanov test korelacije i Mann-Whitney U test).

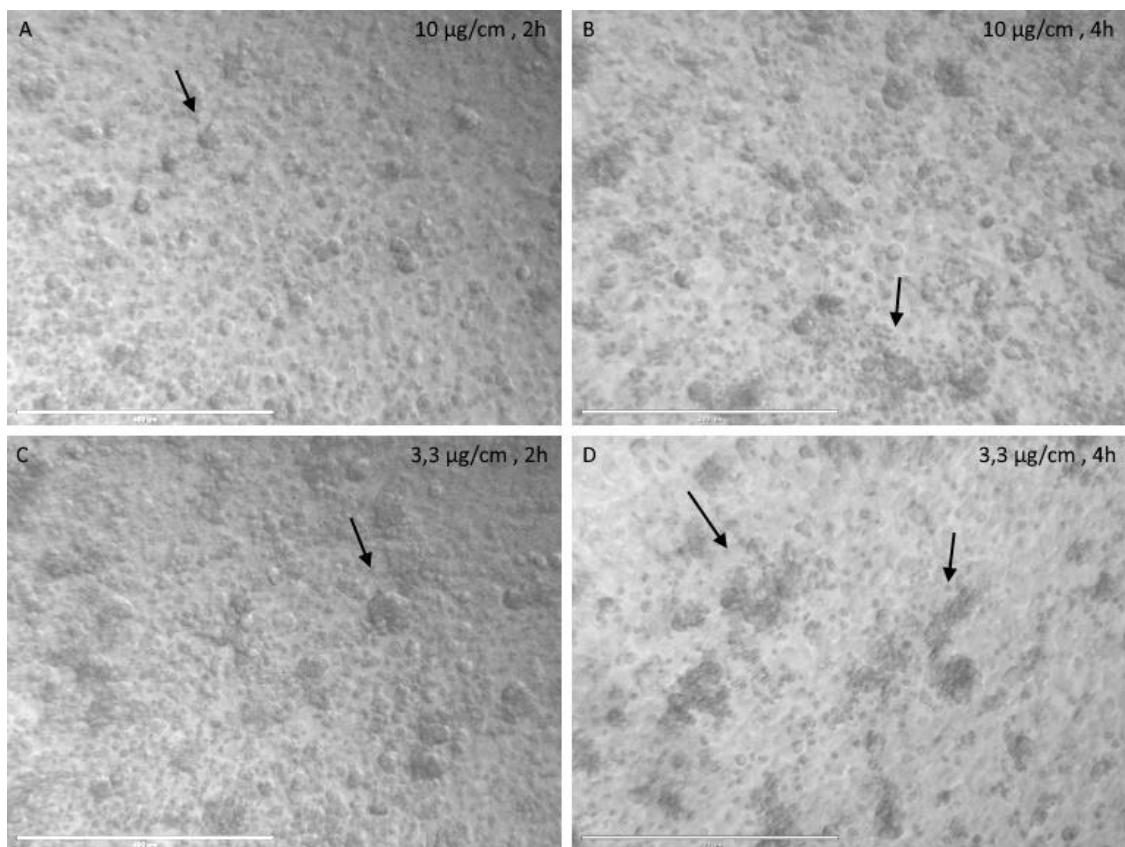
## **4. REZULTATI**

### **4.1 Prva kultivacija (3D1) – određivanje optimalne koncentracije i vremena izlaganja međustaničnoj tvari**

Prvi eksperiment proveden je u svrhu utvrđivanja optimalne koncentracije međustanične tvari kojom se prije nasađivanja stanica oblaže *transwell* podloga, te optimalnog vremena izlaganja podloge otopini međustanične tvari. Stanice su uzgajane na podlozi izloženoj dvjema različitim koncentracijama međustanične tvari ( $3,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ili  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) tijekom dva vremena (2h i 4h). Sve su *transwell* podloge prekrivene suspenzijom stanica u jednakoj koncentraciji, a stanice na njima uzgajane u mediju za diferencijaciju 12 dana (Tablica 1).

#### **4.1.1. Stanice rastu jednako i postižu jednaku morfologiju bez obzira na koncentraciju i vrijeme izlaganja međustaničnoj tvari**

Procjena rasta stanica na temelju promatranja fotografija kultura snimljenih sustavom EVOS® FL *Auto Imaging System* 12 dana nakon nasađivanja na *transwell* podlogu pokazala je da stanice rastu jednako bez obzira na koncentraciju i vrijeme izlaganja međustaničnoj tvari (Tablica 1, Slika 7). Tamnija područja na fotografijama predstavljaju područja s većim brojem slojeva stanica (Slika 7).



**Slika 7.** Stanične kulture prve kultivacije (3D1) snimljene automatskim višekanalnim fluorescentnim mikroskopskim sustavom EVOS® *FL Auto Imaging System* (ThermoFisher) na 12. dan uzgoja. Uvjeti izlaganja podloge međustaničnoj tvari: **A** 10 µg/cm<sup>2</sup>, 2h; **B** 10 µg/cm<sup>2</sup>, 4h; **C** 3,3 µg/cm<sup>2</sup>, 2h; **D** 3,3 µg/cm<sup>2</sup>, 4h. Strelice pokazuju područja s većim brojem slojeva stanica. Mjerna skala 400 µm.

Citološka analiza uzoraka staničnih kultura obojanih hemalaunom i eozinom (HE) pokazala je da stanice uzgojene na podlogama izloženima međustaničnoj tvari pod različitim uvjetima, sve postižu istu morfologiju: rastu u jednom do tri sloja, bazalnom površinom dodiruju podlogu, uglavnom su kubičnog oblika i rijetko postižu cilindrični oblik (Slika 8).

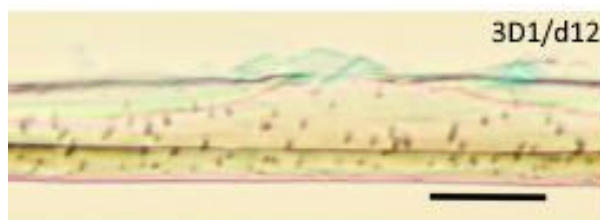


**Slika 8.** Citološko HE bojanje prve kultivacije (3D1) 12. dana inkubacije u mediju za diferencijaciju (d12). Hemalaun boji jezgre plavo, dok eozin boji citoplazmu u ružičasto. Mjerna skala 0,2 mm.

#### 4.1.2. U uvjetima prve kultivacije stanice pokazuju jednake znakove diferencijacije i funkcionalizacije

Imunocitokemijska reakcija s protutijelom anti-klaudin 4 dala je slabi fluorescentni signal u stanicama uzgojenim u prvoj kultivaciji (3D) 12 dana nakon nasađivanja (Slika 14A), što pokazuje da su 12 dana nakon nasađivanja na *transwell* podlogu stanice već stvorile prve međustanične spojeve.

Citokemijska analiza uzoraka staničnih kultura obojanih alcijanskim modrilom (Ab), pokazala je da u svim uzorcima postoji proizvodnja sluzi što znači da različiti uvjeti izlaganja podloge međustaničnoj tvari ne utječu na sekrecijsku aktivnost stanica, odnosno na njihovu sposobnost da proizvode sluz (Slika 9).



**Slika 9.** Citokemijska reakcija alcijanskim modrilom (Ab) prve kultivacije (3D1) 12. dan inkubacije u mediju za diferencijaciju (d12). Mjerna skala 0,2 mm.

## **4.2. Druga kultivacija (3D2) – određivanje optimalnog vremena uzgoja stanica u 3D kulturi**

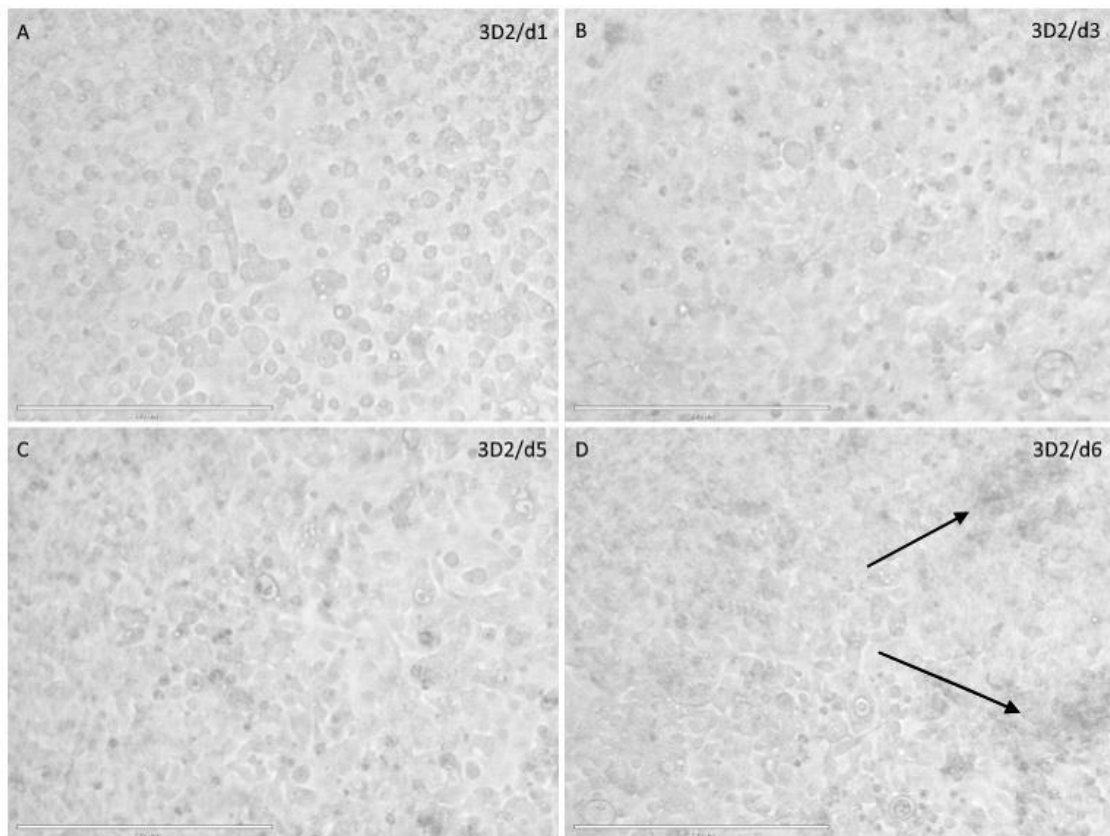
Drugi eksperiment proveden je u svrhu utvrđivanja optimalnog vremena uzgoja stanica u 3D kulturi potrebnog za postizanje potpune diferencijacije i funkcionalizacije stanica u kulturi. Budući da je u prvom eksperimentu pokazano da nakon 12 dana već postoje znakovi diferencijacije i funkcionalizacije stanica u 3D kulturi, cilj ovog eksperimenta je bio provjeriti stupanj diferencijacije i funkcionalnosti kod staničnih kultura uzgajanih kroz duže razdoblje. Funkcionalnost kulture dodatno je testirana izlaganjem  $\beta$ -estradiolu. Točno trajanje uzgoja i izlaganja  $\beta$ -estradiolu za svaku kulturu prikazano je u Tablici 2 u poglavlju Materijali i metode.

### **4.2.1. Rast i razvoj morfologije stanica**

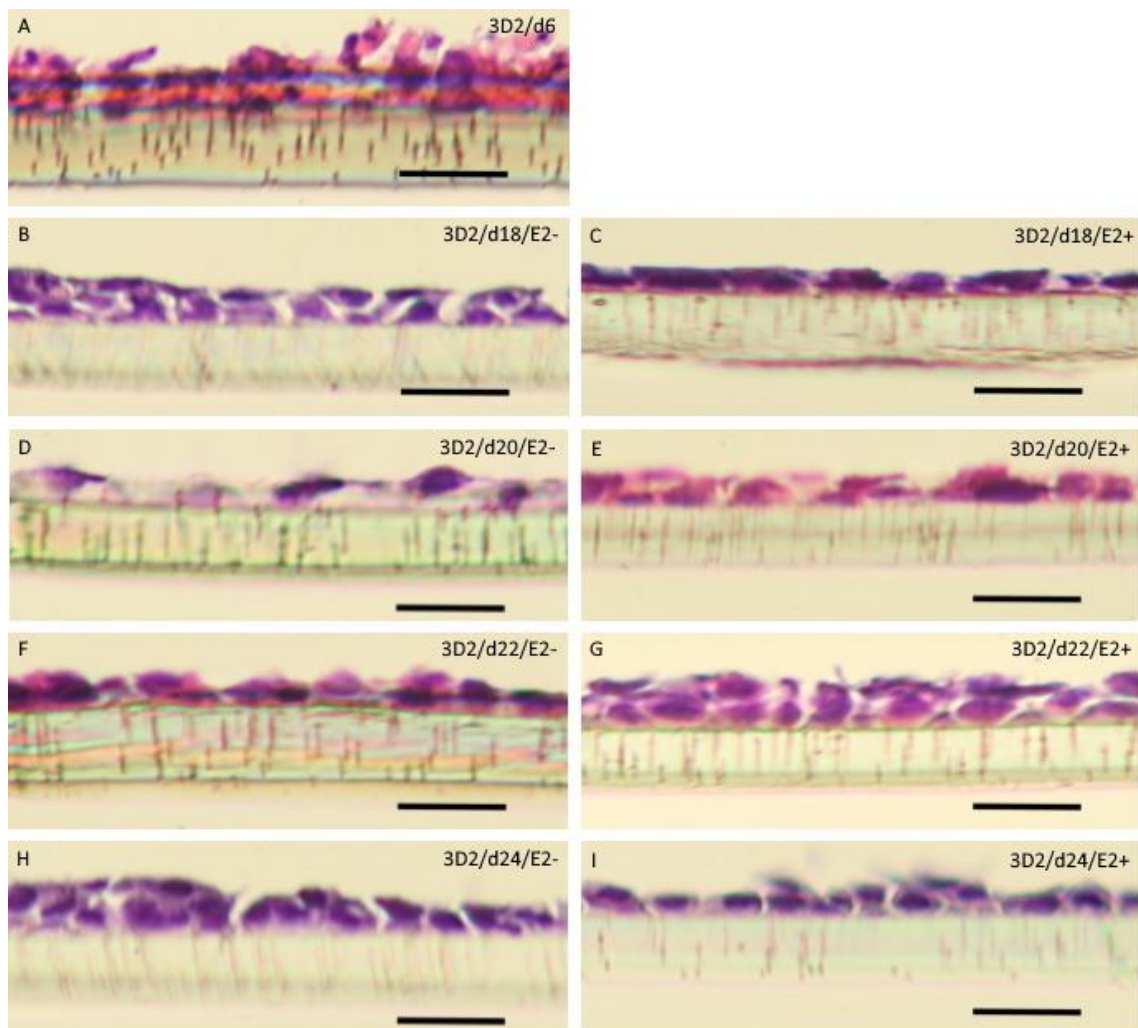
Analizom fotografija staničnih kultura snimanih svaki drugi dan sustavom EVOS® FL *Auto Imaging System* (ThermoFisher), vidljiv je napredak rasta staničnih kultura 3D2 do šestog dana inkubacije u mediju za diferencijaciju (Slika 10). Potpuna prekrivenost podloge stanicama šesti dan potvrđena je pojavom prvih nakupina stanica koje rastu u više slojeva (Slika 10D), te citološkom analizom preparata staničnih kultura obojanih hemalaunom i eozinom (Slika 11).

Citološka analiza preparata staničnih kultura izdvojenih od 18. do 24. dana uzgoja pokazuje da sve kulture rastu u jednom do tri sloja, bazalnom površinom dodiruju podlogu, uglavnom su kubičnog oblika i češće postižu cilindrični oblik nego 6. i 12. dana uzgoja (Slika 8 i 11).

Dodatkom  $\beta$ -estradiola, morfologija stanica nije se promijenila.



**Slika 10.** Stanične kulture druge kultivacije (3D2) snimljene automatskim višekanalnim fluorescentni mikroskopskim sustavom EVOS® *FL Auto Imaging System* (ThermoFisher) u periodu do 1. do 6. dana (**A, B, C, D**) i 24. dana (**E, F**) inkubacije u mediju za diferencijaciju. **A** 1. dan (d1) uzgoja u 3D kulturi. **B** 3. dan (d3) uzgoja u 3D kulturi. **C** 5. dan (d5) uzgoja u 3D kulturi. **D** 6. dan (d6) uzgoja u 3D kulturi. Strelice pokazuju područja s većim brojem slojeva stanica. Mjerna skala 400  $\mu\text{m}$ .



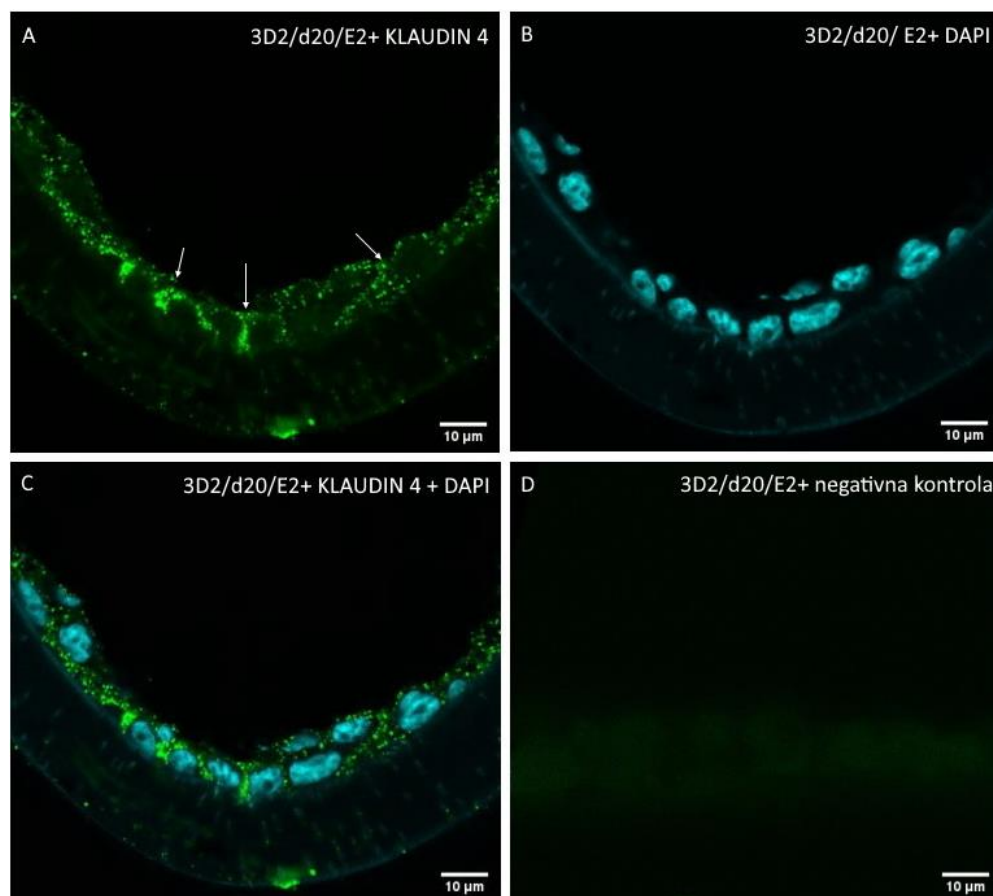
**Slika 11.** Citološko HE bojanje druge kultivacije (3D2) tretiranih estradiolom (E2+; **C,E,G,H,I**) i bez tretmana  $\beta$ -estradiolom (E2-; **A, B, C, D, F, H**) pri različitim danima inkubacije u mediju za diferencijaciju. Hemalun boji jezgre plavo, dok eozin boji citoplazmu u ružičasto. **A** 6. dan (d6) uzgoja u 3D kulturi. **B** 18. dan (d18) uzgoja u 3D kulturi bez tretmana  $\beta$ -estradiolom (E2-). **C** 18. dan (d18) uzgoja u 3D kulturi sa tretmanom  $\beta$ -estradiolom (E2+) u trajanju od 2 dana. **D** 20. dan (d20) uzgoja u 3D kulturi bez tretmana  $\beta$ -estradiolom (E2-). **E** 20. dan (d20) uzgoja u 3D kulturi sa tretmanom  $\beta$ -estradiolom (E2+) u trajanju od 4 dana. **F** 22. dan (d22) uzgoja u 3D kulturi bez tretmana  $\beta$ -estradiolom (E2-). **G** 22. dan (d22) uzgoja u 3D kulturi sa tretmanom  $\beta$ -estradiolom (E2+) u trajanju od 6 dana. **H** 24. dan (d24) uzgoja u 3D kulturi bez tretmana  $\beta$ -estradiolom (E2-). **I** 24. dan (d24) uzgoja u 3D kulturi sa tretmanom  $\beta$ -estradiolom (E2+) u trajanju od 8 dana. Mjerna skala 0,2 mm.



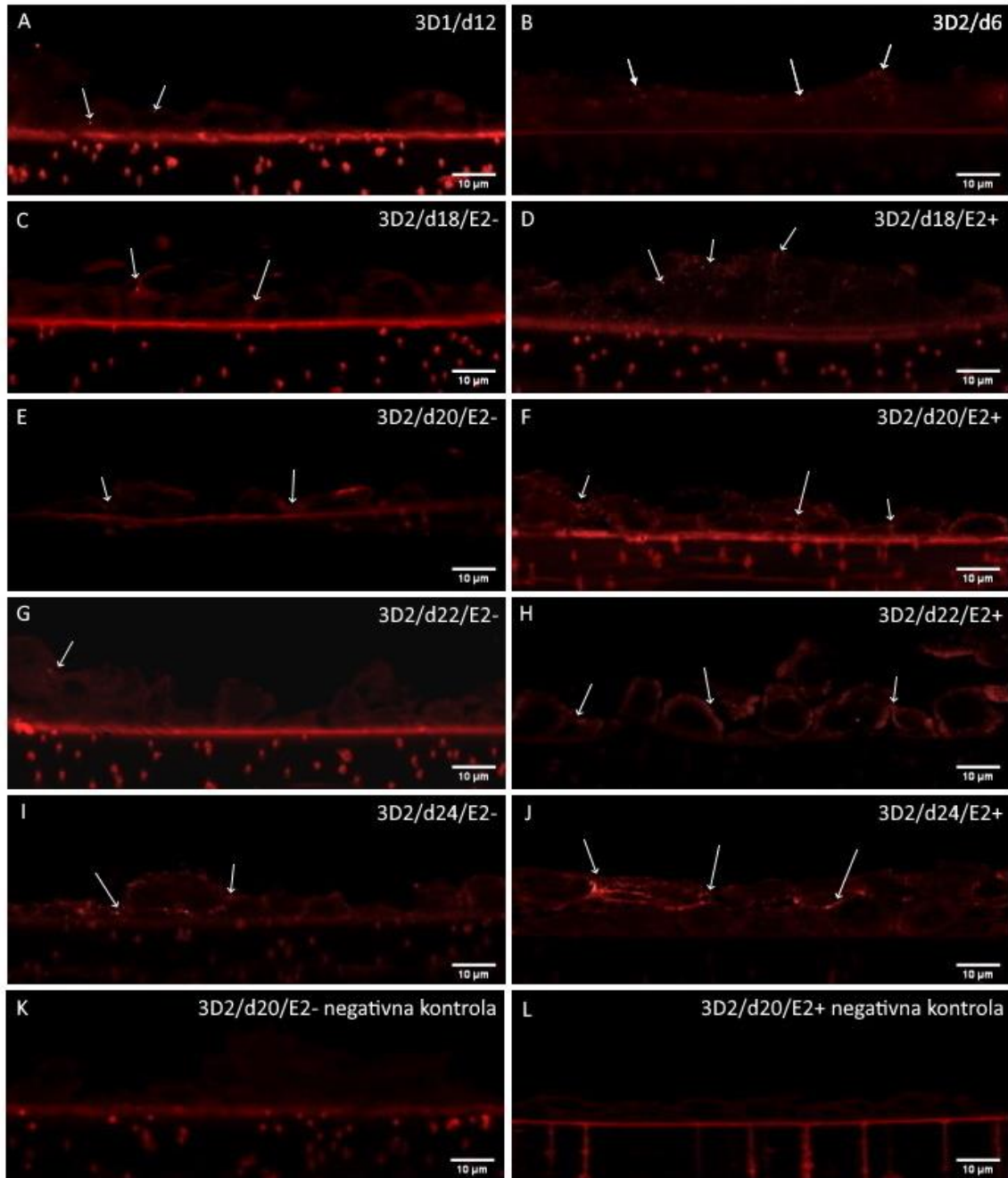
## 4.2.2. Diferencijacija stanica

### 4.2.2.1. Ekspresija markera nepropusnih spojeva kladina 4

Analizom imunocitokemijske reakcije s anti-kladinom 4, vidljivo je da sve kulture iz druge kultivacije pokazuju pozitivne imunocitokemijske signale za protein kladin 4 (Slik 12 i 13). Točkasti imunocitokemijski signali smješteni su na rubovima stanica u području gdje se nalaze stanične membrane (Slika 12A i Slika 12C). Uzorci izloženi  $\beta$ -estradiolu pokazuju trend pojačane imunocitokemijske reakcije u odnosu na uzorke bez tretmana te se intenzitet signala povećava dužom kultivacijom stanica i dužim izlaganjem  $\beta$ -estradiolu (Slika 13). Jačina fluorescentnih signala anti-kladina 4 je semikvantificirana uz primjenu simbola + i - u Tablici 3.



**Slika 12.** Imunocitokemijsko bojanje druge kultivacije (3D2) s pozitivnim signalima za protein kladin 4 stanične kulture bez tretmana  $\beta$ -estradiolom (E2-), 20. dana inkubacije u mediju za diferencijaciju (d20). **A** Zeleni imunocitokemijski signali proteina kladina 4. **B** Prikaz jezgara obojenih plavom bojom (DAPI). **C** Zeleni imunocitokemijski signali proteina kladina s plavo obojenim jezgarama. **D** Negativna kontrola za protein kladin 4 bez prikazanih jezgara. Mjerna skala 10  $\mu$ m.



**Slika 13.** Imunocitokemijsko bojanje sa pozitivnim signalima za protein kladuin 4 prve (3D1) (**A**) i druge kultivacije (3D2) sa (E2+; **D, F, H, J, L**) i bez tretmana  $\beta$ -estradiolom (E2-; **B, C, E, G, I, K**) koja pri različitim danima inkubacije u mediju za diferencijaciju boja kisele plavo kisele mukopolisaharide. **A** 12.dan (d12) uzgoja u 3D kulturi. **B** 6.dan (d6) uzgoja u 3D kulturi. **C** 18. dan (d18) uzgoja u 3D kulturi bez tretmana  $\beta$ -estradiolom (E2-). **D** 18. dan (d18) uzgoja u 3D kulturi sa tretmanom  $\beta$ -estradiolom (E2+) u trajanju od 2 dana. **E** 20. dan (d20) uzgoja u 3D kulturi bez tretmana  $\beta$ -estradiolom (E2-). **F** 20. dan (d20) uzgoja u 3D kulturi sa tretmanom  $\beta$ -estradiolom (E2+) u trajanju od 4 dana. **G** 22. dan (d22) uzgoja u 3D kulturi bez tretmana  $\beta$ -estradiolom (E2-). **H** 22. dan (d22) uzgoja u 3D kulturi sa tretmanom  $\beta$ -estradiolom (E2+) u trajanju od 6 dana. **I** 24. dan (d24) uzgoja u 3D kulturi bez tretmana  $\beta$ -estradiolom (E2-). **J** 24. dan (d24) uzgoja u 3D kulturi sa tretmanom  $\beta$ -estradiolom (E2+) u trajanju od 8 dana. **K** Negativna kontrola 20. dana (d20) uzgoja u 3D kulturi bez tretmana  $\beta$ -estradiolom (E2-). **L** Negativna kontrola 20. dana (d20) uzgoja u 3D kulturi sa tretmanom  $\beta$ -estradiolom (E2+) u trajanju od 4 dana. Mjerna skala 10  $\mu$ m.

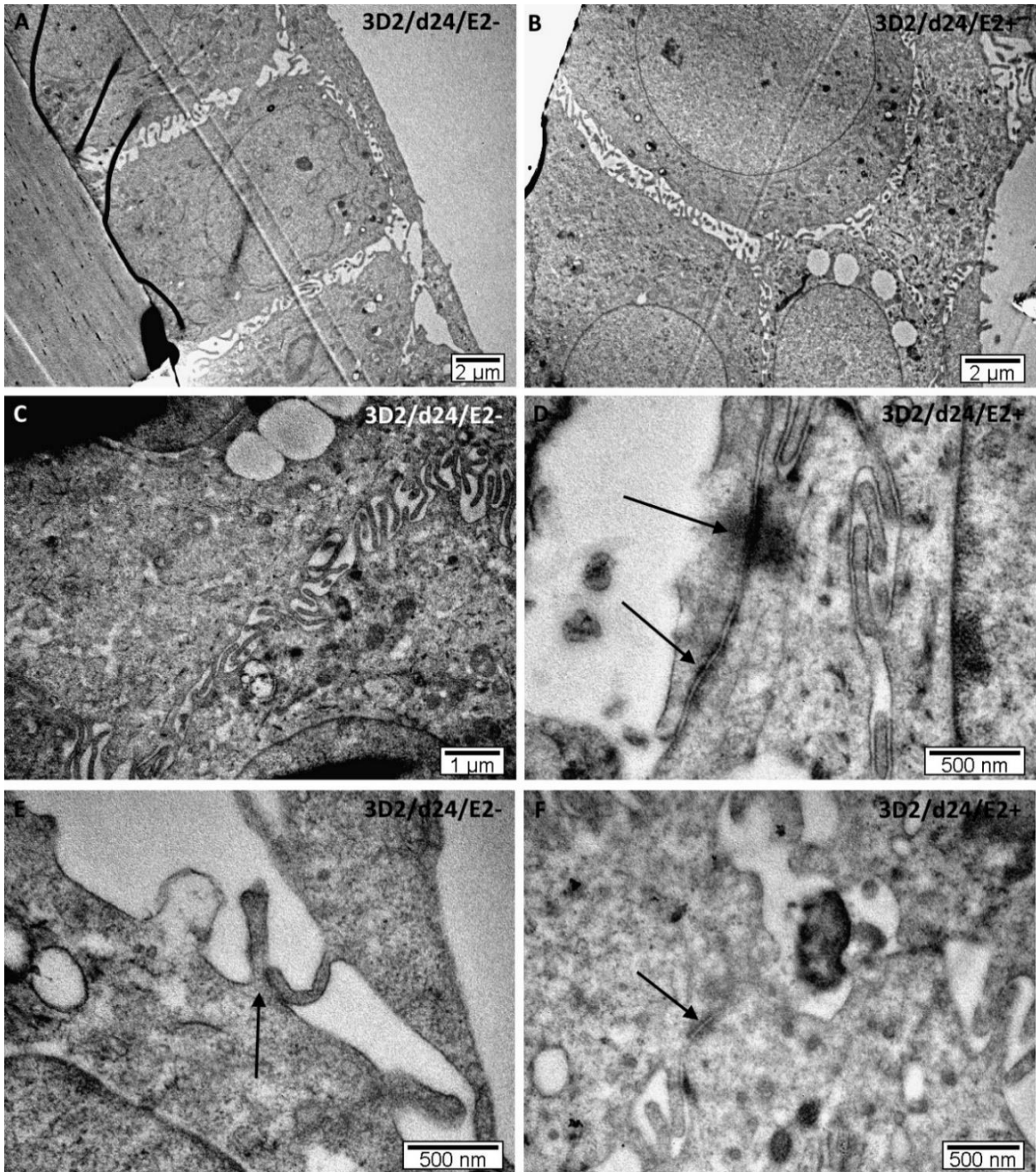
**Tablica 3.** Semikvantitativna analiza jačine fluorescentnog signala anti-klaudina 4 u humanim endocervikalnim stanicama uzgojenim u 3D staničnoj kulturi. Oznaka E2+ označava kulture tretirane s  $\beta$ -estradiolom.

Oznaka kulture	Broj dana inkubacije u mediju za diferencijaciju	Broj dana tretmana estrogenom	Jačina fluorescentnog signala anti-klaudina 4
3D1/d12	12	/	+ - -
3D2/d6	6	/	+ -
3D2/d18/E2-	18	/	+
3D2/d18/E2+	18	2	+ +
3D2/d20/E2-	20	/	+
3D2/d20/E2+	20	4	+ +
3D2/d22/E2-	22	/	+ -
3D2/d22/E2+	22	6	+ +
3D2/d24/E2-	24	/	+ +
3D2/d24/E2+	24	8	+ + +

#### 4.2.2.2. Stanična ultrastruktura i prisutnost međustaničnih spojeva

Fotografije rezultata elektronske mikroskopije pokazuju da su kultivirane stanice poprimile cilindrični oblik i polarnost. Bazalni dio stanice čvrsto pranja uz podlogu, a lateralne i apikalne membrane pružaju kratke, nepokretne stanične nastavke kojima komuniciraju s okolnim stanicama. Stanični nastavci tvore međustanične spojeve, češće pričvrzne spojeve (*desmosom*, *macula adherens*) (Slika 14), a u manjoj mjeri i čvrste spojeve (nepropusni spojevi, *tight junction*, *zonula occludens*). Prisutnost međustaničnih spojeva češće i lakše se uočava na stanicama tretiranim  $\beta$ -estradiolom. Pri vrhu stanica se nalaze sekretni mjehurići. Stanice mjestimično rastu u više slojeva, pri čemu su stanice u gornjim slojevima slabije polarizirane i pokazuju manje međustaničnih spojeva od onih koji rastu uz samu podlogu.

Do 14. dana kultivacije bazalni medij je još uvijek prodirao kroz *transwell* podlogu u područje iznad sloja stanica. Nakon 14 dana kultivacije bazalni medij više ne prodire kroz podlogu, te stanice u insertu rastu na granici "medij – zrak".

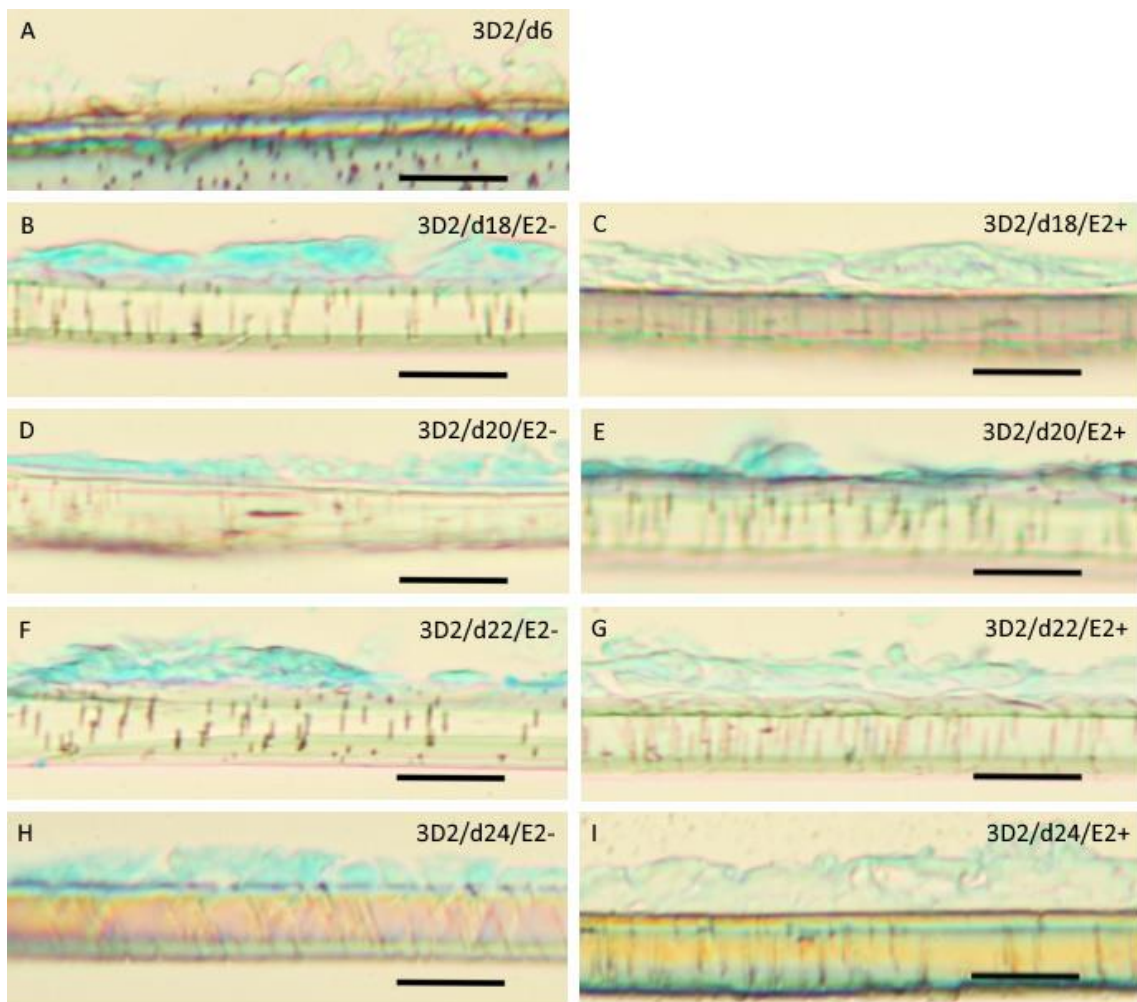


**Slika 14.** Elektronskomikroskopska snimka stanica iz druge kultivacije (3D2) bez tretmana (E2-; **A, C, E**) i s tretmanom  $\beta$ -estradiolom (E2+; **B, D, F**) tijekom 8 dana, 24. dana inkubacije u mediju za diferencijaciju (d24). **A i B** Stanice su popimile cilindrični oblik s bazalnim dijelom membrane čvrsto prionutim uz podlogu, te nepokretnim staničnim nastavcima lateralno i apikalno. **C, E** Stanice isprepliću svoje stanične nastavke s nastavcima drugih stanica smještenih lateralno i apikalno ali vrlo rijetko tvore međustanične spojeve koji nalikuju čvrstim slojevima (crna strelica). **D, F** Stanice češće tvore međustanične spojeve sa susjednim stanicama. Morfologija pričvrstnih spojeva jasnije je izražena (crne strelice). Mjerna skala: **A,B**- 2  $\mu$ m; **C**- 1  $\mu$ m; **D,E,F**- 500 nm

### **4.2.3. Funkcionalizacija stanica**

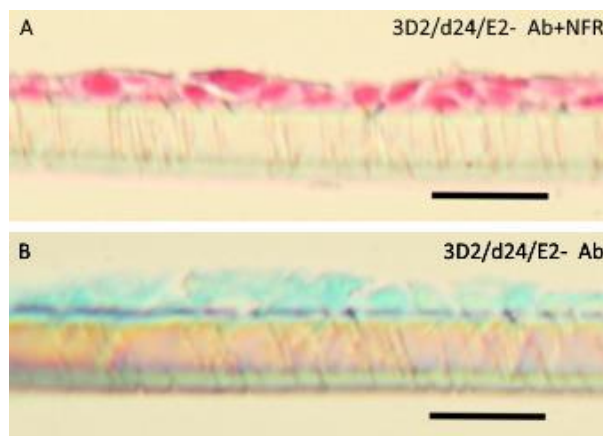
Citokemijska analiza uzoraka staničnih kultura obojanih alcijanskim modrilom (Ab), pokazala je postojanje proizvodnje sluzi u svim kulturama druge kultivacije (Slika 15). Intenzitet bojanja kiselih mukopolisaharida alcijanskim modrilom prikazan je semi-kvantitativno u Tablici 4. Kulture s različitom duljinom uzgoja (između 18 i 24 dana) pokazuju ujednačeno bojanje alcijanskim modrilom koje je intenzivnije u odnosu na šesti i dvanaesti dan kultivacije.

Izlaganjem  $\beta$ -estradiolu intenzitet bojanja alcijanskim modrilom se smanjio, bez obzira na duljinu uzgoja u kulturi i izlaganja  $\beta$ -estradiolu.



**Slika 15.** Citokemijske reakcija alcijanskim modrilom stanica iz druge kultivacije (3D2) tretiranih estradiolom (E2+; **C, E, G, H, I**) i bez tretmana  $\beta$ -estradiolom (E2-; **A, B, C, D, F, H**) koja pri različitim danima inkubacije u mediju za diferencijaciju boja plavo kisele mukopolisaharide. **A** 6. dan (d6) uzgoja u 3D kulturi. **B** 18. dan (d18) uzgoja u 3D kulturi bez tretmana  $\beta$ -estradiolom (E2-). **C** 18. dan (d18) uzgoja u 3D kulturi s tretmanom  $\beta$ -estradiolom (E2+) u trajanju od 2 dana. **D** 20. dan (d20) uzgoja u 3D kulturi bez tretmana  $\beta$ -estradiolom (E2-). **E** 20. dan (d20) uzgoja u 3D kulturi s tretmanom  $\beta$ -estradiolom (E2+) u trajanju od 4 dana. **F** 22. dan (d22) uzgoja u 3D kulturi bez tretmana  $\beta$ -estradiolom (E2-). **G** 22. dan (d22) uzgoja u 3D kulturi s tretmanom  $\beta$ -estradiolom (E2+) u trajanju od 6 dana. **H** 24. dan (d24) uzgoja u 3D kulturi bez tretmana  $\beta$ -estradiolom (E2-). **I** 24. dan (d24) uzgoja u 3D kulturi s tretmanom  $\beta$ -estradiolom (E2+) u trajanju od 8 dana. Mjerna skala 0,2 mm.

Kontra bojanje pomoću NFR boje za jezgre izostavljeno je u preparatima koji su služili za analizu intenziteta citokemijske reakcije s alcijanskim modrilom zbog toga što ono prekrije plavu boju alcijanskog modrila i onemogućuje kvalitetnu analizu slike (Slika 16).



**Slika 16.** Citokemijske reakcija alcijanskim modrilom (Ab) stanične kulture iz druge kultivacije (3D2) i kontra bojanja Nuclear Fast Red (NFR) bez tretmana  $\beta$ -estradiolom (E2-) 24. dana inkubacije u mediju za diferencijaciju (d24). **A** Nuclear Fast Red (NFR) u kombinaciji s alcijanskim modrilom (Ab) prekriva plavo obojenje kisele mukopolisaharide (crveno). **B** Alcijansko modriilo (Ab) bez kontra bojanja Nuclear Fast Red (NFR) boja kisele mukopolisaharide (plavo). Mjerna skala 0,2 mm.

#### 4.2.4. Procjena stupnja diferencijacije i funkcionalizacije stanica

Tablica 4 pokazuje sveobuhvatnu usporednu analizu podataka o rastu, stupnju diferencijacije i funkcionalnosti stanica prema parametrima prikazanima u prethodnim poglavljima. Temeljem svih kriterija rasta stanica u 3D kulturi (pokrivenost podloge stanicama, postojanje razmaka između stanica, broj slojeva epitelnih stanica, prisutnost nakupina stanica) procijenjen je rast stanica, te izražen u postotcima. Do petog dana kultivacije vidljiv je uzlazni trend, a maksimalni rast postignut je već šestog dana kada stanice u potpunosti prekrivaju podlogu, razmak među stanicama je smanjen, broj slojeva je povećan (1-3) te je vidljiv u obliku mjestimičnih višeslojnih nakupina stanica.

Prve znakove diferencijacije i funkcionalnosti stanice su pokazale već šest dana nakon postavljanja kulture. Dvanaestog dana kultivacije stanice pokazuju potpunu diferencijaciju, ali tek od 18. dana nadalje proizvodnja sluzi (intenzitet bojanja alcijanskim modrilom) dostiže svoj maksimum i zadržava ga do kraja eksperimenta (24. dan kultivacije). Ipak, izražaj proteina kladina 4 i dalje raste, pa je zadnji dan kultivacije njegova ekspresija najizraženija u stanicama. Stanice tretirane  $\beta$ -estradiolom povećale su ekspresiju kladina 4 u odnosu na netretirane stanice s jednakom duljinom kultivacije, ali im je intenzitet bojanja alcijanskim modrilom smanjen.

**Tablica 4.** Analiza podataka o stupnju diferencijacije i funkcionalnosti humanih endocervikalnih stanica uzgojenih u 3D staničnoj kulturi. Kulture kojima je dodan  $\beta$ -estradiol označene su oznakom E2+, dok ostale kulture imaju oznaku E2-.

Dan kultivacije	RAST	DIFERENCIJACIJA			
	Kvantifikacija rasta stanica	Prisutnost mucina (intenzitet bojanja alcijanskim modrilom)		Prisutnost nepropusnih međustaničnih spojeva (klaudin 4)	
		E2-	E2+	E2-	E2+
1.	50%	/		/	
3.	90%				
5.	95%				
6.	100%	+ -	/	- +	/
12.	100%	+ -		+ - -	
18.	100%	+ +	+ -	+	+ +
20.	100%	+ +	+ -	+	+ +
22.	100%	+ +	+ -	+ -	+ +
24.	100%	+ +	+ -	+ +	+ + +

#### 4.2.5. Statistička analiza

Podatci iz Tablice 4 statistički su analizirani na način da su semikvadratitivne vrijednosti označene znakovima + i - prevedene u brojčane vrijednosti prema Tablici 5. Zbog malog broja uzoraka primijenjeni su neparametrijski statistički testovi (Spearmanov test korelacije i Mann-Whitney U test). Rezultati statističke analize pokazali su značajne razlike u prisutnosti mucina i nepropusnih spojeva između netretiranih kultura i kultura tretiranih  $\beta$ -estradiolom. Tretman  $\beta$ -estradiolom smanjio je količinu mucina, ali povećao broj nepropusnih spojeva. Također je u obje ispitivane skupine (E2- i E2+) pokazana statistički značajna korelacija količine mucina i broja nepropusnih spojeva s brojem dana provedenih u kulturi. Rezultati provedenih statističkih analiza prikazani su u Tablici 6.



**Tablica 5.** Brojčane vrijednosti dodjeljene simbolima semikvantitativne analize kultura humanih endocervikalnih stanica

Semikvantitativna analiza uz primjenu simbola „+“ i „-“	Brojčana vrijednost dodjeljena simbolima semikvantitativne analize
-	0
- - +	1
- +	2
+ -	3
+	4
+ +	5
+ + +	6

**Tablica 6.** Rezultati statističke analize temeljeni na semikvantitativnoj analizi kultura humanih endocervikalnih stanica uzgojenih u 3D staničnoj kulturi u različitim eksperimentalnim uvjetima

Analiza	Primijenjeni statistički test	Skupine		Rezultat analize
		E2-	E2+	
Korelacija intenziteta bojanja alcijanskim modrilom i dana provedenih u kulturi	Spearmanov test korelacije	$r_s = 0,93541$ $p = 0,00021$	$r_s = 0,86602$ $p = 0,00254$	Postoji statistički značajna korelacija mjerenih vrijednosti intenziteta bojanja alcijanskim modrilom i broja dana provedenih u kulturi.
Korelacija intenziteta imunohistokemijske reakcije s anti-claudin 4 i dana provedenih u kulturi	Spearmanov test korelacije	$r_s = 0,91084$ $p = 0,00064$	$r_s = 0,89443$ $p = 0,00113$	Postoji statistički značajna korelacija intenziteta imunohistokemijske reakcije s anti-claudin 4 i broja dana provedenih u kulturi
Usporedba intenziteta bojanja alcijanskim modrilom između skupina bez tretmana i s tretmanom E2	Mann-Whitney U test	U-vrijednost = 0 Kritička vrijednost U pri $p < 0,05 = 13$ $p < 0,05$ z-vrijednost = 3,30816 p-vrijednost = 0,00094 $p < 0,05$		Skupine bez tretmana i s tretmanom E2 statistički se značajno razlikuju po intenzitetu bojanja alcijanskim modrilom, tj. stanice bez tretmana E2 sadrže više mucina
Usporedba intenziteta imunohistokemijske reakcije s anti-claudin 4 između skupina bez tretmana i s tretmanom E2	Mann-Whitney U test	U-vrijednost = 6 Kritička vrijednost U pri $p < 0,05 = 13$ $p < 0,05$ z-vrijednost = -2,67804 p-vrijednost = 0,00736 $p < 0,05$		Skupine bez tretmana i s tretmanom E2 statistički značajno razlikuju po intenzitetu imunohistokemijske reakcije s anti-claudin 4, tj. stanice s tretmanom E2 sadrže više klaudina 4

**Legenda:**  $r_s$  - Spearmanov koeficijent korelacije; p ili p-vrijednost- mogućnost greške

## 5. RASPRAVA

U ovom diplomskom radu, kroz dvije kultivacije stanica (3D1 i 3D2) stanične linije epitelnih endocervikalnih stanica End1/E6E7, postignuti su optimalni uvjeti diferencijacije i funkcionalnosti tih stanica.

Prvom kultivacijom određivana je optimalna koncentracija (3,3 i 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) i vrijeme izlaganja međustaničnoj tvari (2 i 4h) te su se svi uvjeti pokazali dobrima jer nije bilo vidljivih razlika u morfologiji i sekrecijskoj aktivnosti stanica. S obzirom na dobivene rezultate i radi uštede materijala, za uspostavu druge kultivacije odabrana je manja koncentracija međustanične tvari (3,3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), te srednje vrijeme izlaganja (3h). Za procjenu diferencijacije i rasta stanica koristilo se nekoliko kriterija kao što su pokrivenost podloge stanicama, postojanje razmaka između stanica, broj slojeva epitelnih stanica, prisutnost nakupina stanica. Stanice su pokazale višeslojan rast u jednom do tri sloja. Premda u ljudskom cerviksu te stanice rastu u monosloju, u literaturi se rast u više slojeva smatra znakom uspješne kulture. Primjerice, Miessen i sur. (2012) su dokazali da rast stanica na granici "medij – zrak" doprinosi rastu stanica do 6 slojeva, što je manje u odnosu na rast stanica koje ne rastu na toj granici (Miessen i sur., 2012). Zatamnjena područja snimljena sustavom EVOS®FL *Auto Imaging System* potvrđuju dobiveni rezultat. Primijenjeni sustav pokazao se kao vrlo koristan alat za praćenje rasta stanica prije fiksiranja i uklapanja. Osim toga, takvim snimanjem površine staničnih kultura vidljiva je potpuna prekrivenost podloge stanicama što je uz citološku analizu dobrodošao dodatni pokazatelj rasta stanica u kulturi.

Imunocitokemijski rezultati stanične kulture 3D2/d6 nakon šest dana pokazuju prisutnost klaudina 4 kao dokaz početka diferencijacije stanica. U tom trenutku bazalni medij je još uvijek prodirao kroz *transwell* podlogu u područje iznad sloja stanica što pokazuje da nepropusni međustanični spojevi još uvijek nisu bili u potpunosti funkcionalni. Njihova potpuna diferencijacija nastupila je oko 12. dana što je vidljivo iz toga što 14. dana više nije bilo medija u insertu te su stanice počele rasti na granici "medij – zrak". Isti efekt primijećen je i kod A2EN stanica te potvrđen mjerenjima TEER-a čije vrijednosti  $>1000 \Omega/\text{cm}^2$  nakon 7-9 dana inkubacije dokazuju uspješnu polarizaciju stanica te nastanak međustaničnih spojeva (Buckner i sur., 2011). U radovima 3D staničnih kultura sa svojstvom izlučivanja sluzi TEER je učestao pokazatelj polarizacije (Fahey i sur., 2005; Buckner i sur., 2011). U ovom radu, zbog

nedostupnosti uređaja za mjerenje TEER-a, polarnost stanica je utvrđena morfološki na preparatima obojanim hemalaunom i eozinom, te elektronskomikroskopskom analizom ultrastrukture stanica kojom su utvrđene razlike u morfologiji i prisutnosti međustaničnih spojeva između bazalnog, lateralnih i apikalnog dijela stanice.

Stanice rastu u više slojeva te su točkasti imunocitokemijski signali kladina 4 vidljivi na svim rubovima stanica u području gdje se nalaze stanične membrane što je slično već objavljenim rezultatima. Jedan autor takve imunocitokemijske signale opisuje kao saće (eng. "*honey-combed*") (Buckner i sur., 2011), dok drugi kao paukovu mrežu (eng. "*spiderweb-like pattern*") te ih smješta u donje slojeve epitela (Blaskewicz i sur., 2011). Snimke staničnih kultura elektronskim mikroskopom u ovom radu potvrđuju da se međustanični spojevi nalaze uglavnom na nižim slojevima stanica koje pokazuju jasniju polarizaciju i veći broj dužih staničnih nastavaka na svojim lateralnim stranama, nego stanice koje su ih prerastle i nalaze se u gornjem sloju. Moguće je da je to zato što su stanice u gornjim slojevima u manjoj mjeri izložene utjecaju međustanične tvari na *transwell* podlozi. Osim provedenih metoda, diferencijacija stanica se mogla provjeriti i pomoću drugih pokazatelja kao što su imunološki profil kultura, izražaj različitih mucina, receptora i slično.

Analiza intenziteta bojanja stanica alcijanskim modrilom pokazala je da su kulture uzgajane 6 i 12 dana slabije obojane, dok su kulture uzgajane 18 i više dana obojane intenzivnijom plavom bojom. Iz toga možemo zaključiti da su stanice postigle punu funkcionalnost u smislu stvaranja mucina, tek nakon 12. dana. Ujednačenost intenziteta plave boje u kulturama između 18. i 24. dana kultivacije govori da je najkasnije 18. dan kultura postigla maksimalnu funkcionalnost. Također, ujednačenost intenziteta stvaranja mucina važan je preduvjet za primjenu te kulture u ispitivanjima utjecaja drugih čimbenika na funkciju stanica, pa zaključujemo da su uvjeti druge kultivacije bili optimalni za postizanje takve, ujednačene kulture. To smo i provjerili tretiranjem staničnih kultura  $\beta$ -estradiolom. Kod tih je stanica uočen jači intenzitet imunocitokemijske reakcije na anti-kladina 4. Poznato je da E2 smanjuje jačinu čvrstih spojeva pomoću matriks metaloproteinaze 7 ovisne o okludinu (Zeng i sur., 2004; Gorodeski 2007). koji zajedno s kladinom tvori čvrste spojeve. Osim čvrstih spojeva, stanične kulture su stvorile i pričvrstne spojeve koji su bili češći kod kultura sa E2. Stanice izložene  $\beta$ -estradiolu pokazale su slabiji intenzitet bojanja alcijanskim modrilom u odnosu na stanice bez

tretmana E2. Taj učinak je prisutan vjerojatno zato što estrogene potiču izlučivanje mucina iz stanica, pa time manje mucina ostaje u sekrecijskim zrcima (Gipson, 2001).

Maksimalno vrijeme unutar kojeg stanice zadržavaju postignutu morfologiju i sposobnost stvaranja sluzi u ovom radu nije utvrđeno jer to nije bilo obuhvaćeno ciljevima rada. Literaturni podaci pokazuju da takve kulture mogu biti funkcionalne tjednima (Buckner i sur., 2011; Arslan i sur., 2015).

Unatoč uspješnoj kultivaciji stanica i postignutim optimalnim uvjetima za diferencijaciju stanica, tijekom izrade ovog diplomskog rada javila su se i neka tehnička pitanja i poteškoće. Za prvu i drugu kultivaciju nismo imali potpuno iste uvjete jer nismo mogli koristiti stanice s istim brojem prethodnih presađivanja. Korištene su stanice nakon 1. i 3. presađivanja. Među njima ne bi trebalo biti velikih razlika jer se radi o stanicama stanične linije koje bi trebale i nakon velikog broja presađivanja ostati morfološki nepromijenjene. Broj presađivanja prije nasađivanja stanica razlikuje se među eksperimentima opisanim u znanstvenoj literaturi, neovisno radilo se primarnoj kulturi ili staničnoj liniji. Tako je stanična linija End1/E6E7 presađivana maksimalno 5 puta prije eksperimenta (Hijazi i sur., 2015), dok je imortalizirana stanična linija A2EN presađivana 17 do 20 puta (Buckner i sur., 2011). Kod primarne kulture svinjskih endocervikalnih stanica primijećeno je da već nakon prvog presađivanja dolazi do smanjenja potencijala stanica da tvore višestanične slojeve. Daljnjim presađivanjima taj se trend nastavio te su stanice u konačnici izgubile svoj epitelni karakter (Miessen i sur., 2012).

Tehničkih problema bilo je i s uklapanjem u parafin. Stanične kulture su ručno uklapane u parafinske blokove tako da se *transwell* podloga stavljala u tekući parafin okomito, pod pravim kutom u odnosu na dno kalupa. Taj se postupak pokazao neprikladnim jer su se neke kulture svinule ili su promijenile položaj tijekom hlađenja parafina. Rezanjem tih ultura mikrotomom dobiveni su kosi prerezi koji se očituju većom „debljinom“ *transwell* podloge i nerealnim prikazom većeg broja slojeva stanica. Stoga rezovi s većim odstupanjima od pravilnog kuta uklapanja nisu korišteni. Većina kultura je preklapana dva puta radi ispravljanja kuta uklapanja te je time došlo do dodatnog oštećenja staničnih kultura. Radi izbjegavanja ovakve problematike, neki autori su prije fiksiranja i uklapanja staničnih kultura u parafin, uklopili stanične kulture u agarozu kako bi postigli pravi kut te ih takve fiksirali (Miessen i sur., 2012) ili su zamrznuli stanične kulture te ih rezali kriostatom (Han i sur., 2020). Unatoč spomenutim djelomičnim oštećenjima nastalim ponavljanjem uklapanja u parafin, takve stanične kulture su

zadržale staničnu morfologiju i svoju funkcionalnost te su bile iskoristive za provedene eksperimente.

Zanimljivo, tijekom optimizacije protokola histokemijskog bojanja uočeno je da je boja NFR svaki puta prekrila obojane kisele mukopolisaharide neovisno u dužini vremena izlaganja bojama. Iz tog razloga stanične kulture su bojane monokromatski, samo alcijanskim modrilom. Nadalje, vrijeme izlaganja alcijanskom modrilu uspostavljeno na različitim humanim tkivima nije bilo dovoljno za bojanje mucina u 3D kulturama, već je to bojanje trebalo produžiti na čitav sat. Pregledom objavljenih protokola ustanovili smo da su i drugi autori produžili vrijeme bojanja 3D kultura alcijanskim modrilom (Arslan i sur., 2015; Grainger i sur., 2006).

Pomoću elektronske mikroskopije, Ab bojanja te imunocitokemije pokazana je funkcionalnost staničnih kultura i njihova primjenjivost u pokusima koji uključuju izlaganje stanica hormonima. Unatoč višeslojnom rastu stanica koji se razlikuje od monosloja ljudskog endocerviksa, stanice su se diferencirale, polarizirale, stvorile međustanične spojeve te proizvele sluz. Uvjeti zadani prvom i drugom kultivacijom su zadovoljavajući te se mogu smatrati optimalnima, no nije dokazano da su oni i najbolji. Uzimajući u obzir da su u ovom diplomskom radu uvjeti kultivacije postavljeni nakon malog broja ponavljanja, nije na odmet prilikom postavljanja novog eksperimenta, ponoviti kultivaciju u ovim istim, ali i nekim drugačijim uvjetima. Isto tako, spomenute tehničke poteškoće kao što je kut uklapanja te uporaba stanica koje su prethodno presađene različiti broj puta, mogle su djelomično utjecati na rezultate primijenjenih metoda, pa bi navedene teškoće prije sljedećeg pokusa trebalo riješiti.

U svakom slučaju, postupak kultivacije stanica pomoću *transwell* podloge obložene međustaničnom tvari, uz uvjete postavljene dizajnom prve i druge kultivacije, pokazao se kao uspješan i primjenjiv u istraživanjima epitela endocerviksa.

## 6. ZAKLJUČCI

U ovom diplomskom radu istraživani su i odabrani optimalni eksperimentalni uvjeti za uzgoj endocervikalnih stanica End1/E6E7 u 3D kulturi primjenom *transwell* podloga obloženima međustaničnom tvari koja omogućuje rast stanica na granici „medij - zrak“, pri čemu su doneseni sljedeći zaključci:

1. Koncentracija i vrijeme izlaganja podloge međustaničnoj tvari unutar ispitivanih veličina (3,3 i 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , te 2 i 4h) ne utječu na rast i proliferaciju endocervikalnih stanica, na njihovu konačnu morfologiju, niti na proizvodnju mucina.
2. Stanice u 3D kulturi poprimile su cilindrični oblik, postigle polarnost i stvorile nepropusne i pričvrstne međustanične spojeve. Broj nepropusnih spojeva raste tijekom cijelog ekperimenta.
3. Stanične kulture izložene  $\beta$ -estradiolu pojačale su stvaranje nepropusnih i pričvrstnih spojeva, te smanjile količinu mucina unutar stanica jer estrogeni potiču izlučivanje mucina pa ih manje ostaje u stanici.
4. Postupak kultivacije stanica pomoću *transwell* podloge obložene međustaničnom tvari u uvjetima uspostavljenim ovim radom (3 h inkubacije s 3,3  $\mu\text{g}$  međustanične tvari po  $\text{cm}^2$  podloge, 12 - 24 dana kultivacije, 2 - 8 dana tretmana  $\beta$ -estradiolom) pokazao se kao uspješan i primjenjiv u istraživanjima epitela endocerviksa, pri čemu treba obratiti pozornost na primjereno uklapanje stanica i broj presađivanja stanica.

## 7. LITERATURA

Abbott A (2003). Biology's new dimension. *Nature* **424**: 870–872.

Al-Harhi L, Kovacs A, Coombs RW, Reichelderfer PS, Wright DJ, Cohen MH, Cohn J, Cu-Uvin S, Watts H, Lewis S, Beckner S, Landay A i WHS 001 Study Team (2001). A menstrual cycle pattern for cytokine levels exists in HIV-positive women: implication for HIV vaginal and plasma shedding. *AIDS* **15(12)**: 1535–1543.

Andersch-Björkman Y, Thomsson KA, Holmén Larsson JM, Ekerhovd E, Hansson GC (2007). Large scale identification of proteins, mucins, and their O-glycosylation in the endocervical mucus during the menstrual cycle. *Mol Cell Proteomics* **6(4)**: 708-716.

Argüeso P, Spurr-Michaud S, Tisdale A, Gipson IK (2002). Variation in the amount of T antigen and N-acetyllactosamine oligosaccharides in human cervical mucus secretions with the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* **87(12)**: 5641-5648.

Arslan SY, Yu Y, Burdette JE, Pavone ME, Hope TJ, Woodruff TK, Kim JJ (2015). Novel three dimensional human endocervix cultures respond to 28-day hormone treatment. *Endocrinology* **156(4)**: 1602-1609.

Berg RK, Melchjorsen J, Rintahaka J, Diget E, Søby S, Horan KA, Gorelick RJ, Matikainen S, Larsen CS, Ostergaard L, Paludan SR, Mogensen TH (2012). Genomic HIV RNA induces innate immune responses through RIG-I-dependent sensing of secondary-structured RNA. *PLoS One* **7(1)**: e29291.

Blaskewicz CD, Pudney J, Anderson DJ (2011). Structure and function of intercellular junctions in human cervical and vaginal mucosal epithelia. *Biol Reprod* **85(1)**: 97-104.

Buckner LR, Schust DJ, Ding J, Nagamatsu T, Beatty W, Chang TL, Greene SJ, Lewis ME, Ruiz B, Holman SL, Spagnuolo RA, Pyles RB, Quayle AJ (2011). Innate immune mediator profiles and their regulation in a novel polarized immortalized epithelial cell model derived from human endocervix. *J Reprod Immunol* **92(1-2)**: 8-20.

Cereijido M, Robbins ES, Dolan WJ, Rotunno CA, Sabatini DD (1978). Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J Cell Biol* **77(3)**: 853-880.

Davajan V, Nakamura RM (1973). The in vitro sperm-cervical mucus testing systems. U: *Cervical Mucus in Human Reproduction*. Ur: Elstein M, Moghissi KS, Borth R. Scriptor, Copenhagen, str. 153-161.

El-Banna AA, Hafez ES (1972). The uterine cervix in mammals. *Am J Obstet Gynecol* **112(1)**: 145-164.

Fahey JV, Schaefer TM, Channon JY, Wira CR (2005). Secretion of cytokines and chemokines by polarized human epithelial cells from the female reproductive tract. *Hum Reprod* **20(6)**: 1439-1446.

Flori F, Secciani F, Capone A, Paccagnini E, Caruso S, Ricci MG, Focarelli R (2007). Menstrual cycle-related sialidase activity of the female cervical mucus is associated with exosome-like vesicles. *Fertil Steril* **88(4 Suppl)**: 1212-1219.

Freshney RI (2016). Culture of animal cells - a manual of basic technique and specialized applications, 7th Edition. Wiley-Blackwell.

Gibbons RA, Boyd LJ, Dixon SN, Parker J, Sellwood R, Tasker JB (1973). Chemical and physical characteristics of the macromolecular components of the cervical mucus from cows after synchronization of oestrus with melengestrol actate. *J Reprod Fertil* **35(3)**: 469-476.

Gipson IK (2001). Mucins of the human endocervix. *Front Biosci* **6**: D1245-55.

Gipson IK (2005). Human Endocervical Mucins. U: *New Mechanisms for Tissue-Selective Estrogen Free Contraception*. Croxatto HB, Schürmann R, Fuhrmann U, Schellschmidt I, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, str. 219-244.

Gipson IK, Ho SB, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Zhan Q, Torlakovic E, Pudney J, Anderson DJ, Toribara NW, Hill JA 3rd (1997). Mucin genes expressed by human female reproductive tract epithelia. *Biol Reprod* **56(4)**: 999-1011.

Gipson IK, Moccia R, Spurr-Michaud S, Argüeso P, Gargiulo AR, Hill JA 3rd, Offner GD, Keutmann HT (2001). The Amount of MUC5B mucin in cervical mucus peaks at midcycle. *J Clin Endocrinol Metab* **86(2)**: 594-600.



Givan AL, White HD, Stern JE, Colby E, Gosselin EJ, Guyre PM, Wira CR (1997). Flow cytometric analysis of leukocytes in the human female reproductive tract: comparison of fallopian tube, uterus, cervix, and vagina. *Am J Reprod Immunol* **38(5)**: 350-359.

Gorodeski GI (2007). Estrogen decrease in tight junctional resistance involves matrix-metalloproteinase-7-mediated remodeling of occludin. *Endocrinology* **148(1)**: 218-231.

Grainger CI, Greenwell LL, Lockley DJ, Martin GP, Forbes B (2006). Culture of Calu-3 cells at the air interface provides a representative model of the airway epithelial barrier. *Pharm Res* **23(7)**: 1482-1490.

Han L, Andrews W, Wong K, Jensen JT (2020). Conditionally reprogrammed macaque endocervical cells retain steroid receptor expression and produce mucus. *Biol Reprod* **102(6)**: 1191-1202.

Handler JS, Preston AS, Steele RE (1984). Factors affecting the differentiation of epithelial transport and responsiveness to hormones. *Fed Proc* **43(8)**: 2221-2224.

Hel Z, Stringer E, Mestecky J (2010). Sex steroid hormones, hormonal contraception, and the immunobiology of human immunodeficiency virus-1 infection. *Endocr Rev* **31(1)**: 79-97.

Hijazi K, Cuppone AM, Smith K, Stincarelli MA, Ekeruche-Makinde J, De Falco G, Hold GL, Shattock R, Kelly CG, Pozzi G, Iannelli F (2015). Expression of Genes for Drug Transporters in the Human Female Genital Tract and Modulatory Effect of Antiretroviral Drugs. *PLoS One* **10(6)**: e0131405.

Hodges CA, Palmert MR, Drumm ML (2008). Infertility in females with cystic fibrosis is multifactorial: evidence from mouse models. *Endocrinology* **149(6)**: 2790-2797.

Insler V, Lunenfeld B (1978). *Diagnosis and Treatment of Functional Infertility*. Grosse Verlag.

Ismail N, Giribabu N, Muniandy S, Salleh N (2015). Estrogen and progesterone differentially regulate the levels of cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR), adenylate cyclase (AC), and cyclic adenosine mono-phosphate (cAMP) in the rat cervix. *Mol Reprod Dev* **82(6)**: 463-474.

Kase L, Glass RH, Speroff NG (2005). Sperm and Egg Transport, Fertilization, and Implantation. U: *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, 6th Edition. Ur: Speroff L, Fritz MA. Lippincott Williams & Wilkins, str. 437-487.

Katz DF, Slade DA, Nakajima ST (1997). Analysis of pre-ovulatory changes in cervical mucus hydration and sperm penetrability. *Adv Contracept* **13(2-3)**: 143-151.

Kaur G, Dufour JM (2012). Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis* **2(1)**: 1-5.

Kyongo JK, Jespers V, Goovaerts O, Michiels J, Menten J, Fichorova RN, Crucitti T, Vanham G, Ariën KK (2012). Searching for lower female genital tract soluble and cellular biomarkers: defining levels and predictors in a cohort of healthy Caucasian women. *Plos one* **7(8)**: e43951.

Lorenzen E, Follmann F, Jungersen G, Agerholm JS (2015). A review of the human vs. porcine female genital tract and associated immune system in the perspective of using minipigs as a model of human genital Chlamydia infection. *Vet Res* **46**: 116.

Magaldi TG, Almstead LL, Bellone S, Prevatt EG, Santin AD, DiMaio D (2012). Primary human cervical carcinoma cells require human papillomavirus E6 and E7 expression for ongoing proliferation. *Virology* **422(1)**: 114-124.

Martínez-Sáez N, Peregrina JM, Corzana F (2017). Principles of mucin structure: implications for the rational design of cancer vaccines derived from MUC1-glycopeptides, *Chemical Society Reviews* **46(23)**: 7154–7175.

Martyn F, McAuliffe FM, Wingfield M (2014). The role of the cervix in fertility: is it time for a reappraisal?. *Hum Reprod* **29(10)**: 2092–2098.

Matter K, Aijaz S, Tsapara A, Balda MS (2005). Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr Opin Cell Biol* **17(5)**: 453-458.

McKenzie J, King A, Hare J, Fulford T, Wilson B, Stanley M (1991). Immunocytochemical characterization of large granular lymphocytes in normal cervix and HPV associated disease. *J Pathol* **165(1)**: 75-80.

Miessen K, Einspanier R, Schoen J (2012). Establishment and characterization of a differentiated epithelial cell culture model derived from the porcine cervix uteri. *BMC Vet Res* **8**: 31. doi:10.1186/1746-6148-8-31.

Nakano Fabiana Y, Leão Rogério de Barros F, Esteves Sandro C (2015). Insights into the role of cervical mucus and vaginal pH in unexplained infertility. *Medical Express* **2(2)**: M150207.

Naz RK, Butler A, Witt BR, Barad D, Menge AC (1995). Levels of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in sera and cervical mucus of fertile and infertile women: implication in infertility. *J Reprod Immunol* **29(2)**: 105-117.

Odeblad E (1968). The functional structure of human cervical mucus. *Acta Obstet Gynecol Scand* **47**: 57-79.

Odeblad E (1969). Types of human cervical secretions. *Acta Eur Fertil* **1**: 99–116.

Planchon S, Fiocchi C, Takafuji V, Roche JK (1999). Transforming growth factor-beta1 preserves epithelial barrier function: identification of receptors, biochemical intermediates, and cytokine antagonists. *J Cell Physiol* **181(1)**: 55-66.

Roy M, Mukherjee S (2014). Reversal of Resistance towards Cisplatin by Curcumin in Cervical Cancer Cells. *Asian Pac J Cancer Prev* **15(3)**: 1403–1410.

Schumacher GFB, Kim MH, Hosseinian AH, Dupon C (1977). Immunoglobulins, proteinase inhibitors, albumin, and lysozyme in human cervical mucus: I. Communication: Hormonal profiles and cervical mucus changes-Methods and results. *Am J Obstet Gynecol* **129(6)**: 629–636.

Shin K, Fogg VC, Margolis B (2006). Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**: 207-235.

Thompson LA, Barratt CL, Bolton AE, Cooke ID (1992). The leukocytic reaction of the human uterine cervix. *Am J Reprod Immunol* **28(2)**: 85-89.

Tsukita S, Furuse M, Itoh M (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2(4)**: 285-293.

Vigil P, Cortés ME, Zúñiga A, Riquelme J, Ceric F (2009). Scanning electron and light microscopy study of the cervical mucus in women with polycystic ovary syndrome. *J Electron Microsc* **58(1)**: 21-27.

Wira CR, Fahey JV, Ghosh M, Patel MV, Hickey DK, Ochiel DO (2010). Sex hormone regulation of innate immunity in the female reproductive tract: the role of epithelial cells in balancing reproductive potential with protection against sexually transmitted pathogens. *Am J Reprod Immunol* **63(6)**: 544-565.

Zeng R, Li X, Gorodeski GI (2004). Estrogen Abrogates Transcervical Tight Junctional Resistance by Acceleration of Occludin Modulation, *J Clin Endocrinol Metab* **89(10)**: 5145–5155.

#### **Literatura preuzeta s interneta:**

<https://teachmeanatomy.info/pelvis/female-reproductive-tract/cervix/> (Pristupljeno 26.9.2019.)

[https://publications.iarc.fr/\\_publications/media/download/4556/f0e203eba3c15419c810bde8409c5fa12b7dfae2.pdf](https://publications.iarc.fr/_publications/media/download/4556/f0e203eba3c15419c810bde8409c5fa12b7dfae2.pdf) (Pristupljeno: 24. 9. 2019.)

<https://userpages.umbc.edu/~jwolf/method5.htm> (Pristupljeno 15. 8. 2020.)

<https://www.corning.com/worldwide/en/products/life-sciences/products/surfaces/matrigel-matrix.html> (Pristupljeno 11.1.2020.)

<https://www.stemcell.com/air-liquid-interface-culture-respiratory-research-lp.html> (Pristupljeno 23.1.2020.)

## **ŽIVOTOPIS**

Ime i prezime **Nikolina Bradarić**

Datum rođenja **13.7.1995.**

Adresa stanovanja **Vijenac Slavka Kolara 24, 31000 Osijek**

Broj mobitela **+385 91 9775712**

E-mail **nikolina.bradaric@gmail.com**

### **Obrazovanje:**

2017.-2020. **Diplomski sveučilišni studij Eksperimentalna biologija; modul Fiziologija i imunobiologija**  
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet (PMF),  
Biološki odsjek, Zagreb (Hrvatska)

2014.-2017. **Preddiplomski studij Biologije**  
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju,  
Osijek (Hrvatska)

### **Iskustvo:**

2019.-2020. **Izrada diplomskoga rada**  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu (MEF), Zavod za histologiju i  
embriologiju  
Tema: Diferencijacija ljudskih endocervikalnih stanica uzgojenih u 3D  
staničnoj kulturi  
Mentorice: izv. prof. dr. sc. Marija Ćurlin (MEF)  
doc. dr. sc. Romana Gračan (PMF)

2020. **Erasmus+ stručna praksa**  
Medicinsko sveučilište u Beču  
Centar za patofiziologiju, infektologiju i imunologiju, Institut za patofiziologiju i istraživanje alergija  
Tema: Transport željeza kroz ljudsku placentu – lokalizacija transferina (Tf) i transferin receptora 1 (TfR1) u različitim tipovima stanica placentalne barijere pomoću imunofluorescentne mikroskopije  
Mentor: izv. prof. dr.sc. Isabella Ellinger

2018. **Laboratorijska stručna praksa**  
Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zavod za animalnu fiziologiju  
Voditelj: prof. dr. sc. Nada Oršolić

**Dodatno:**

2020. **Stipendist Lab Rotation Programa**  
BioTechMed Graz

2018.-2019. **Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama; LabAnim A kategorija**  
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet

2017. **Voditelj radionice za djecu školskog i predškolskog uzrasta**  
Naziv radionice: "Kako mozak doživljava okus hrane"  
"Tjedan mozga" (2017, Osijek)