Procjena barijernih značajki animalnih rožnica nakon pohrane u komercijalno dostupnim medijima

Ugrinić, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:950964

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Sara Ugrinić

Procjena barijernih značajki animalnih rožnica nakon pohrane u komercijalno dostupnim medijima

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmaceutika Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Ivana Pepića.

Zahvaljujem svome mentoru, doc. dr. sc. Ivanu Pepiću, na pomoći i savjetima tijekom izrade mog diplomskog rada.

Također zahvaljujem asistentici, znanstvenoj novakinji Marini Juretić, mag. pharm. i Katarini Antolić, mag. pharm. koje su mi bile od velike pomoći tijekom eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Hvala mojoj obitelji, prijateljima i posebno Luki, koji su bili uz mene tijekom studija.

Najveće hvala želim reći svojim roditeljima, Miki i Silvu, koji su uvijek vjerovali u mene i omogućili mi da sam danas gdje jesam.

Svoj diplomski rad posvećujem didu Marijanu.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. GRAĐA OKA 1

1.2. GRAĐA I FUNKCIJA ROŽNICE 3

1.3. KULTURA TKIVA KAO METODA POHRANE ROŽNICA 4

1.4. MEDIJI ZA POHRANU ROŽNICA IZ CORNEA LINIJE 6

2. OBRAZLOŽENJE TEME 8

3. MATERIJALI I METODE 9

3.1. PRIKUPLJANJE I TRANSPORT ANIMALNIH OČNIH JABUČICA 9

3.2. DEKONTAMINACIJA I IZOLIRANJE ANIMALNIH ROŽNICA 9

3.3. POHRANA ROŽNICA U HRANJIVIM MEDIJIMA CORNEAMAX® I CORNEAPREPII® 10

3.3.1. Pohrana rožnica u hranjivom mediju CorneaMax® 10

3.3.2. Pohrana rožnica u hranjivom mediju CorneaPrepII® 11

3.4. ODREĐIVANJE TEER-A ROŽNICA 11

4. REZULTATI I RASPRAVA 13

4.1. PROCJENA BARIJERNIH SVOJSTAVA ROŽNICA ODREĐIVANJEM TEER VRIJEDNOSTI 13

4.2. UTJECAJ POHRANE ROŽNICA U MEDIJU CORNEAPREPII® NA BARIJERNA SVOSTVA ROŽNICA 15

4.3. UTJECAJ POHRANE ROŽNICA U MEDIJU CORNEAMAX® NA BARIJERNA SVOJSTVA ROŽNICA 16

5. ZAKLJUČCI 19

6. LITERATURA 20

7. SAŽETAK / SUMMARY 22

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1. Građa oka

Oko je paran organ vida smješten u očnim šupljinama. Očna se jabučica sastoji od triju koncetričnih ovojnica. Vanjska očna ovojnica je sloj veziva i sastoji se od neprozirne bjeloočnice (*sclera*) i prozirne rožnice (*cornea*). Bjeloočnica i rožnica uvjetuju oblik i čvrstoću očne jabučice (Pepić, 2004).

Bjeloočnica obuhvaća četiri petine očne jabučice. Građena je od gustih kolagenskih i pojedinih elastičnih vlakana. Ima mnogo otvora za prolaz vidnog živca, osjetnih i motoričkih živaca te za ulaz arterija i izlaz vena. Prednji dio bjeloočnice spojen je rijetkim vezivnim tkivom s očnom spojnicom (*tunica conjunctiva bulbi*). Bjeloočnica na posebnom mjestu prelazi u rožnicu (Pepić, 2004).

Rožnica zauzima petinu vanjske očne ovojnice. To je prozirno, glatko i vlažno avaskularno vezivno tkivo. Svaka vaskularizacija rožnice predstavlja patogeni proces (Pepić, 2004). Hranjive tvari i kisik prima iz rubne mreže krvnih žila. Preostali dio kisika prima iz atmosfere, pa ako je spriječena ta izmjena, aktivira se anaerobni metabolizam i tako povećava intrakornealna koncentracija mliječne kiseline (Pepić i sur., 2012). Tako se razvija edem rožnice i gubitak njezine providnosti. U prosječne odrasle osobe, horizontalni promjer rožnice iznosi 11,5 do 12 mm, a vertikalni promjer je za oko 1 mm veći (DelMonte i Kim, 2011; Pepić, 2004). Na rožnici se razlikuju vrh, rub te vanjska i unutarnja strana (Pepić i sur., 2012; Pepić, 2004). Vrh rožnice je debljine oko 0,5 do 1 mm, te se debljina povećava prema rubovima do 0,8 do 1,5 mm. Rožnica je izdužena oblika, ravnija na rubovima, te strmija na vrhu čineći tako asferični optički sustav (DelMonte i Kim, 2011). Obje strane rožnice su slobodne. Po prednjoj strani kližu vjeđe, a stražnju stranu oplahuje očna vodica koja ispunjava prednju očnu sobicu (Pepić, 2004). Ljudska rožnica se sastoji od pet histološki raspoznatljivih slojeva, tri stanična (epitel, stroma, endotel) i dva međusloja (Bowmannova membrana, Descemetova membrana) (DelMonte i Kim, 2011; Pepić, 2004). Poredak slojeva izvana prema unutra je: epitel, Bowmannova membrana, stroma rožnice, Descemetova membrana i endotel (Pepić, 2004).

Srednja očna ovojnica (*uvea*) čini krvnu i živčanu opskrbu unutrašnjosti očne jabučice. Dijeli se, od straga prema naprijed, na tri dijela: žilnica (*choroidea*), zrakasto tijelo (*corpus ciliare*) i šarenica (*iris*). Žilnica zauzima najveći dio srednje očne ovojnice, a sprijeda završava zrakastim tijelom. Obiluje krvnim žilama koje opskrbljuju vanjske slojeve mrežnice,

a tamna je jer sadrži pigment. Zrakasto tijelo spaja žilnicu sa šarenicom. Cilijarni epitel izlučuje očnu vodicu u stražnoj očnoj sobici. Šarenica ima ulogu dijafragme oka jer posebnim sustavom mišića regulira veličinu otvora kroz koji ulazi svjetlo u oko. Nalazi se između rožnice i leće, a u sredini je kružni otvor - zjenica (*pupila*). Zjenica se doima crnom jer se kroz otvor vidi vrlo pigmentirani unutarnji sloj oko mrežnice. Količina pigmenata u pojedinim slojevima šarenice određuje boju oka. Uz pupilarni rub šarenice nalazi se uski kružni mišić (*musculus sphincter pupillae*), kojega inerviraju parasimpatička vlakna preko okulomotornog živca, a svojom kontrakcijom sužava zjenicu. Od zjeničnog sfinktera pupile do cilijarnog ruba šarenice seže široki i plosnati mišić (*musculus dilatator pupilae*), kojeg inervira simpatički sustav, a svojom kontrakcijom širi zjenicu.

Unutrašnju očnu ovojnicu izgrađuje tanka opna - mrežnica (*retina*). Mrežnica je funkcionalno najvažniji dio oka. Sastoji se od dvaju listova: vanjski list sadržava pigmentne stanice sa zrncima i štapićima pigmenata; unutarnji list se u vidnom dijelu mrežnice diferencira u složeni receptorni aparat (Pepić, 2004).

Dioptrični aparat oka sastoji se od potpuno prozirnih tvorbi kroz koje prolazi svjeto na svojem putu do osjetnog sloja mrežnice. U njega ubrajamo: rožnicu, očnu vodicu (*humor aquosus*) koja ispunjava prednju očnu sobicu, leću (*lens*) i staklasto tijelo (*corpus vitreum*). Rožnica čini glavni refraktorni sustav oka, na kojemu se svjetlost prelama pri ulasku u oko.
Očna vodica je tekućina koja ispunjava prednju i stražnju očnu sobicu. Prednja je očna sobica prostor sprijeda omeđen rožnicom, a straga šarenicom i dijelom leće koji se nalazi u zjenici. Stražnja je očna sobica straga omeđena staklastim tijelom, a sprijeda šarenicom. S prednjom očnom sobicom komunicira kroz pukotinu između prednje strane leće i šarenice. Očna vodica dijelom nastaje ultrafiltracijom plazme, a dijelom aktivnom sekrecijom nepigmentiranog epitelnog sloja na cilijarnim nastavcima. Leća je najvažniji dio optičkog očnog organa, nalazi se iza šarenice i zjenice, a ispred staklastog tijela. Ona je prozirna, avaskularna, bikonveksna tvorevina uložena u prozirnu, tanku, homogenu ovojnicu. Građena je od proteinskih vlakana (35%) i vode (65%) koji tvore lećnu masu. Staklato tijelo nalazi se iza leće i ispunjava najveći dio unutrašnjosti oka. Staklasto je tijelo polučvrsta, prozirna, želatinozna masa koja se sastoji od staklaste tekućine volumena 2 ml (~99% voda) i mreže tankih i velikih proteoglikanskih vlakana koji daju konzistenciju gela (Pepić, 2004).

Pomoćne tvorbe oka, koje upotpunjuju njegovu funkciju su: vanjski mišići očne jabučice, obrva, vjeđe, spojnica i suzni sustav (Pepić, 2004).

1.2. Građa i funkcija rožnice

Kao što je napisano u prethodnom potpoglavlju, histološki se rožnica sastoji od pet slojeva; promatrajući izvana prema unutra to su: epitel, Bpwmannova membrana, stroma rožnice, Descemetova membrana i endotel (Eghrari i sur. 2015; DelMonte i Kim, 2011; Pepić, 2004).

Epitelna površina rožnice tvori prvu barijeru prema vanjskom okolišu i čini sastavni dio sloja između same rožnice i suznog filma koji je bitni dio refraktivnih značajki oka (DelMonte i Kim, 2011).

Epitel rožnice sastoji se od četiri do šest slojeva nekeratiniziranih, stratificiranih, skvamoznih epitelnih stanica, i u ljudi je debljine približno 50 µm (Eghrari i sur., 2015; DelMonte i Kim, 2011). Epitelne stanice rožnice imaju prosječan životni vijek od 7-10 dana (DelMonte i Kim, 2011), a prosječna izmjena (*turnover*) epitela približno je jedan sloj stanica dnevno (Pepić i sur., 2012). Epitel je prekriven suznim filmom koji ima bitnu ulogu za refraktivne značajke oka, primarno zbog ublažavanja mikronepravinosti vanjske strane epitela. Suzni film ima i zaštitnu funkciju površine rožnice (od mikroorganizama, od kemijskih ili fizičkih oštećenja). Također sudjeluje u opskrbi epitela faktorima rasta koji su bitni za zdravlje epitela, proliferaciju epitelnih stanica i popravak oštećenja epitela (DelMonte i Kim, 2011).

Prva dva do tri površinska sloja stanica čine plosnate i poligonalne stanice s apikalnim mikrovilima i mikronaborima te su prekriveni s nabijenim glikokaliksom, koji zajedno povećavaju površinu suznog filma.

Između stanica epitela nalaze se čvrste međustanične veze (*tight junctions*) koje spriječavaju prolazak suza u unutarstanične prostore, a djeluju i kao prepreka ulasku toksina i mikroorganizama u dublje slojeve rožnice (DelMonte i Kim, 2011). Između epitelnih stanica granaju se ogranci cilijarnih živaca pa je rožnica osjetljiva na bol. Epitel ima sposobnost regeneracije, zato pri ozljedi epitela ne ostaju ožiljci na rožnici i nema zamućenja (Pepić, 2004).

Bowmannova membrana nalazi se ispred strome rožnice, i to je acelularni sloj kolagenskih vlakana koji je debljine oko 15 µm i pomaže u održavanju oblika rožnice. Ne može se regenerirati te se nakon ozljede stvara ožiljak (DelMonte i Kim, 2011). Tijekom vremena smanjuje se debljina Bowmannove membrane (Eghrari i sur., 2015).

Stroma rožnice čini oko 90% debljine rožnice. Građena je od kolagenskih vlakana složenih u listove (200-250). Sadrži oko 85% vode što je čini izrazito hidrofilnom (Pepić, 2004). Mreža kolagena je visokoorganizirana te pridonosi transprentnosti i mehaničkoj čvrstoći rožnice (DelMonte i Kim, 2011). Glavne stanice strome su keratociti; održavaju integritet strome, te proizvode kolagen, glukozaminoglikane i metaloproteinaze matriksa (Eghrari i sur., 2015).

Descemetova membrana je produkt endotela, i nalazi se između strome i endotela (Pepić, 2004). U djece je debljine oko 3 µm, te se povećava do 10 µm u odraslih (Eghrari i sur., 2015).

Kornealni endotel je tanki monosloj stanica, ali vrlo otporna i elastična membrana. Čini prednju granicu prednje očne sobice iz koje očna vodica pasivnom difuzijom ide u smjeru strome. Odgovoran je za održavanje normalne hidratacije strome (Pepić, 2004).

Hranjive tvari i kisik rožnica prima iz rubne mreže krvnih žila. Preostali dio kisika prima iz atmosfere, pa ako je spriječena takva izmjena, aktivira se anaerobni metabolizam i tako povećava intrakornealna koncentracija mliječne kiseline. Tako se razvija edem rožnice i gubitak njezine providnosti (Pepić i sur., 2012).

1.3. Kultura tkiva kao metoda pohrane rožnica

Uspješnost većine transplantacija rožnica ovisi o tome je li očuvan endotel rožnice. Ovaj monosloj stanica oblaže unutrašnju površinu rožnice i održava providnost rožnice na način da kontrolira hidrataciju strome rožnice. S obzirom da stanice endotela teško proliferiraju, njihovo očuvanje je primarni cilj svake metode pohrane rožnice. Mrtve endotelne stanice nisu zamijenjene mitotičkom diobom, već migracijom i širenjem susjednih stanica. Zbog toga dolazi do smanjenja gustoće endotelnih stanica. U zdravom oku ima dovoljno rezervnih endotelnih stanica u svrhu očuvanja providnosti rožnice tijekom života. Kod transplantacije rožnica, jedan od uvjeta kojim se određuje kvaliteta tkiva je gustoća endotelnih stanica koja iznosi 2000 stanica/mm² (Armitage, 2011).

Tri su glavna pristupa čuvanju rožnica koje sadrže žive stanice; kultura tkiva, hipotermija i kriopohrana (Armitage, 2011).

Metoda kriopohrane jedina je metoda koja ima potencijal skladištenja rožnica na neodređeni period. Međutim, zbog složenosti procesa zamrzavanja i velikog potencijala oštećenja endotela ograničena je uporaba takve metode u rutinskoj pohrani rožnica, osim u hitnim slučajevima transplantacije, kada je glavni cilj spasiti oko (Armitage, 2011).

Do većine tkiva koja se koriste pri transplantaciji rožnica dolazi se putem očnih banaka koje čuvaju korneoskleralni disk, bilo metodom hipotermije (2-6°C) ili u kulturi tkiva (31-37°C). Takve dvije metode pohrane razlikuju se u tehničkim aspektima, mogućnostima procjene tkiva, vremenu pohrane te mikrobiološkoj sigurnosti (Pels i sur., 2008), dok su ishodi trasplantacija rožnica koje su čuvane takvim metodama slični (Armitage, 2011).

Hipotermija kao metoda pohrane je jednostavna i zahtjeva malo skupe opreme (Pels i sur., 2008). Također je najčešće primjenjivana metoda širom svijeta; na primjer, sve očne banke u Sjevernoj Americi koriste hipotermiju kao metodu pohrane, zahvaljujući jednostavnosti i učinkovitosti same metode. Metoda se zasniva na činjenici da stanice, tkiva i organi u hladnom okruženju imaju smanjenu potražnju za metaboličkom energijom (Armitage, 2011). Pohrana rožnica kao cijelog oka u vlažnim komorama ograničena je zbog brzog gubitka hranjivih tvari i porasta koncetracije štetnih tvari u očnoj vodici. Stoga se rožnice pohranjuju izolirane zajedno s tankim prstenom bjeloočnice (korneoskleralni disk), uronjene u otopinu čiji je ionski sastav sličan ionskom sastavu očne vodice (Armitage, 2011). Pri čuvanju rožnica metodom hipotermije provodi se procjena endotela spekularnom mikroskopijom prije pohrane. Mediji za pohranu rožnica su komercijalno dostupni i prilikom korištenja je potrebno pratiti upute proizvođača koje se tiču temperature i vremena pohrane, roka trajanja medija i ostalih bitnih čimbenika. Rožnice u mediju ne bubre, odnosno ostaju tanke i providne, te ukoliko ispitivanja donorskog tkiva to dozvole, rožnice su izravno dostupne za operaciju (Pels i sur., 2008). Medij za pohranu se sastoji od medija za kulturu tkiva kojemu su dodani antibiotici, tvari za dehidrataciju (odbubrivanje) poput dekstrana ili kondroitin sulfata, hranjive tvari, antioksidansi i faktori rasta. Prvi medij za pohranu rožnica metodom hipotermije, M-K medij, omogućava pohranu rožnica do 10 dana. Noviji mediji, kao što su modificirani M-K medij, K-sol, Dexol, Likorol, Optisol (Plus, GS), omogućavaju pohranu rožnica i do 16 dana. Međutim, da se smanji rizik od neuspješnih transplantacija, preporučeno vrijeme čuvanja rožnica kraće je od maksimalno navedenih od strane proizvođača. /6/

U kulturi tkiva kao metodi pohrane rožnica, rožnice su inkubirane pri 30-37°C, u mediju za kulturu tkiva kojemu su dodani fetalni teleći serum, antibiotici i antimikotici. Dehidratizirajuće makromolekule, koje su potrebne za održavanje normalne hidratacije *in vitro*, pri fiziološkim temperaturama ulaze u stanice i akumuliraju u vakuolama i slojevima rožnice, te se stoga ne koriste kao komponenta medija za pohranu. Iz tog razloga, rožnica tijekom pohrane obično nabubri, čak dvostruko od svoje uobičajene debljine (Pels i sur., 2008). Pri transplantacije rožnica se odbubruje na način da se rožnice stavljaju u medij koji sadrži dekstran (4-8%) (Pels, 1997). Najčešći medij za pohranu u kulturi tkiva je Eagleov

minimalni esencijalni medij (*minimal esential medium*; MEM), koji sadrži 2% fetalnog goveđeg seruma, iako neke očne banke koriste do 8% fetalnog goveđeg seruma. Većina očnih banaka u svojim medijima koriste penicilin, streptomicin i amfotericin B kao antibiotike (Armitage, 2011). Ovisno o korištenom mediju, obnova medija se obavlja nakon 10-14 dana (Pels i sur., 2008).

Prije ekscizije korneoskleralnih diskova, očne jabučice se čiste ispiranjem sa sterilnom fiziološkom otopinom i dekontaminiraju uranjanjem u otopinu povidon-jodida (Armitage, 2011). Korištenje povidon-jodida poželjno je zbog njegovog širokog antimikrobnog spektra, koji uključuje Gram-pozitivne i Gram-negativne baktrije, gljivice, kvasce, viruse i protozoe. Uz to, kao sredstvo je stabilan, nije skup i lako je dostupan (Pels i Vrensen, 1999).

Metoda procjene endotela spekularnom mikroskopijom poslije pohrane rožnica u kulturi tkiva nije moguća, te se zbog toga koristi svjetlosna mikroskopija, koja je kao metoda invazivnija. Nije moguće izvršiti procjenu bez vađenja rožnica iz bočica sa medijem, te je potrebno procjenu izvoditi u aseptičkim uvjetima. Endotel se vizualizira bubrenjem međustaničnih prostora korištenjem hipotoničnih otopina. Bubrenje je prolazno i nestaje kroz nekoliko minuta, te ovisi o integritetu staničnih membrana. Kod mrtvih i nekrotičnih stanica te u njihovom neposrednom okruženju, ne dolazi do bubrenja.

U usporedbi metode kulture tkiva i metode hipotermije, integritet endotela je bolje očuvan u rožnica koje se čuvaju u kulturi tkiva (Pels, 1997).

1.4. Mediji za pohranu rožnica iz Cornea linije

Transplantacija rožnica uz korištenje medija za pohranu iz Cornea linije (Eurobio Laboratories) obično se provodi u tri stupnja. U prvom stupnju se provodi *in situ* ekscizija rožnica (keratektomija). Potom se rožnica pohranjuje u medij za transport, CorneaPrepII®. Medij CorneaPrepII® omogućava transport rožnica pri sobnoj temperaturi do šest dana, međutim, potrebno je u što kraćem roku, rožnicu prebaciti u medij za čuvanje pri temperaturama 31-34°C. Za pohranu rožnica odgovorne su registrirane očne banke. Kada banke zaprime rožnični transplantat u mediju za transport, rožnice se prebacuju u medij za pohranu, CorneaMax® i čuvaju se pri temperaturi 31-34°C, u tzv. razdoblju karantene. Rožnice se u mediju CorneaMax® čuvaju najviše trideset dana. Tijekom tog razdoblja provode se analize propisane zakonom. Čuvanje rožnica u CorneMax® mediju dovodi do povratnog zamućenja rožnice. Nakon analiza transplantata i odabira primatelja, rožnica se premješta u medij za odbubravanje, CorneaJet®. Rožnica se u ovom mediju mora držati

najmanje 24 sata da bi se osigurala providnost. Medij CorneaJet® može služiti za transport transplantata unutar četiri dana (uključujući 24 sata potrebna za odbubravanje). Odbubravanje se provodi pri sobnoj temperaturi (www.eurobio-cornea.com).

Mediji za kulturu tkiva iz Cornea linije sadrže: esencijalne i neesencijalne aminokiseline, australijski ozračeni fetalni telećI serum, vitamine, elektrolite, penicilin (streptomicin), HEPES pufer i bikarbonate te indikator fenol crvenilo. Medij CorneaJet® koji služi za odbubravanje rožnica, sadrži i dekstran kao sredstvo za odbubrivanje. Njihova pH vrijednost iznosi 7,25 ± 0,25, osmolarnost je 320 ± 20 mOsm/kg H_2O; imaju kontroliranu razinu endotoksina, oslobođeni su mikoplazma i sterilizirani su aseptičkom filtracijom. Takvi mediji sadrže indikator fenol crvenilo, pa ukoliko dođe do promjene boje medija u žuto ili tamno ljubičasto (ovisno o promjeni pH vrijednosti), ili promjene bistrine medija, preporučeno je ne koristiti transplantat iz takvog medija (www.eurobio-cornea.com).

Mediji iz Cornea linije se čuvaju zaleđeni te se prije uporabe trebaju postupno odmrzavati; prebacuju se na 4°C, potom na sobnu temperaturu, ili se odmrzavaju u vodenoj kupelji zagrijanoj pri 37°C. Treba izbjegavati držanje medija pri temperaturama višima od 37°C, a nakon odmrzavanja mediji se ne smiju ponovo zamrzavati. Nakon odmrzavanja mediji se mogu čuvati četiri dana pri 4°C (www.eurobio-cornea.com).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Ispitivanja prijenosa djelatne tvari preko barijere rožnice najčešće se provode *in vitro* i *ex vivo* eksperimentima. *In vitro* (stanični) modeli osiguravaju obradu relativno veliko broja ispitivanih uzoraka u jedinici vremena, ali su manje predvidljivi u usporedbi s *ex vivo* (tkivnim) modelima. Istodobno, veliki nedostatak *ex vivo* modela pri ispitivanju prijenosa djelatne tvari preko barijere rožnice je prikupljanje dovoljnog broja svježih animalnih rožnica i osiguravanje početka pokusa najdulje 2 sata nakon prekida animalne cirkulacije.

Prikupljanje i pohrana humanih rožnica s ciljem provođenja postupka transplantacije obavlja se sukladno standardiziranim protokolima očnih banaka diljem svijeta. Cilj pohrane humane rožnice u svrhu uspješne transplantacije je očuvanje endotela rožnice. Istodobno, očuvanje epitela humane rožnice tijekom pohrane je manje važno jer se epitel rožnice obnovi u slučajevima uspješne transplantacije rožnice.

S obzirom da je epitel rožnice glavna barijera prijenosu djelatnih tvari preko rožnice, očuvanje epitela rožnice je važno za provođenje uspješnih *ex vivo* ispitivanja permeabilnosti. Cilj ovog diplomskog rada je ispitati jesu li i u kojoj mjeri očuvana barijerna svojstva animalne rožnice nakon provođenja standardnih postupaka dekontaminacije te transporta i pohrane animalne rožnice u komercijalno dostupnim medijima za transport i pohranu humanih rožnica. Očuvanje barijernih svojstava animalnih rožnica u komercijalnim medijima za transport i pohranu humanih rožnica, omogućio bi prikupljanje dostatnog broja animalnih rožnica za potrebe *ex vivo* ispitivanja permeabilnosti i na taj način unaprijedio kapacitet *ex vivo* ispitivanja permeabilnosti koji se odlikuju relativno visokom predvidljivošću in vivo prijenosa djelatne tvari preko barijere rožnice.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Prikupljanje i transport animalnih očnih jabučica

Svinjske očne jabučice prikupljene su iz lokalne klaonice, kao otpad pri preradi mesa. Osoblje klaonice upoznato je sa svrhom istraživanja, te se inokulacija vrši na način da se oštećenje očne jabučice i rožnice ograniči na najmanju moguću mjeru. Pri odabiru svinja od kojih su se uzimali uzorci očnih jabučica, pazilo se da svinje budu približno iste težine (~100-120 kg) i starosti (~6 mjeseci). Očne jabučice su prikupljene približno jedan sat nakon žrtvovanja životinja.

Za svaku očnu jabučicu osigurana je jedna posudica od 60 ml, obložena sa zavojnom vatom, natopljenom sa ~30 ml Krebs-Ringer pufera (KRB). KRB pufer se izrađuje na način da se u 1000 ml redestilirane vode dodaje redom: 6,8 g NaCl, 0,4 g KCl, 0,158 g $NaH_2PO_4 \times 2 H_2O$, 2,1 g $NaHCO_3$, 0,26 g $CaCl_2 \times 2H_2O$, 0,2 g $MgSO_4 \times 7H_20$, 3,575 g HEPES, 1,1 g D-glukoza monohidrat. Iz $CaCl_2 \times 2H_2O$ i $MgSO_4 \times 7H_2O$ izrade se 1 M osnovne otopine. Umjesto gore navedene mase dodaje se 1,77 ml 1 M otopine $CaCl_2 \times 2H_2O$ i 0,81 ml 1 M otopine $MgSO_4 \times 7H_2O$. Pufer se priprema na način da se u baždarenu tikvicu od 1 l doda oko 500 ml redestilirane vode. U vodu se dodaju soli redom kako su navedene u sastavu, uz miješanje na magnetskoj miješalici. Tikvica se zatim nadopuni redestiliranom vodom do oznake te se pH prilagodi do 7,4 sa 10M NaOH. Posudice se prije prikupljanja očnih jabučica iz klaonice drže pri 4°C u prijenosnom hladnjaku. Prije postavljanja očne jabučice u posudicu, ona se ispire sa fiziološkom otopinom (natrijev klorid, 0,9%, Braun), pazeći da mlaz ne ide izravno po rožnici. Očna jabučica se u posudicu polaže prihvaćajući za očni živac sa kirurškim kliještima, na način da rožnica ne dodiruje rubove ni dno posudice, a bude u potpunosti uronjena u KRB pufer. Do laboratorija se posudice sa uzorcima čuvaju u prijenosnom hladnjaku pri 4 C, jer je pri toj temperaturi metabolička aktivnost stanica najmanja.

3.2. Dekontaminacija i izoliranje animalnih rožnica

Očne jabučice prvo prolaze proces vizualne kontrole, eliminiraju se uzorci koji imaju makroskopska, golim okom vidljiva oštećenja na rožnici. S uzorcima koji prođu vizualnu kontrolu, kreće se u postupak dekontaminacije. Potrebno je odstraniti pomoće tvorbe oka (vanjski mišići, vjeđe, trepavice). Očna jabučica se prihvaćajući kirurškim kliještima za vidni živac, ispire pod mlazom fiziološke otopine, pazeći da mlaz ne ide direktno po rožnici. Zatim se, također prihvaćajući za vidni živac, očna jabučica uranja u malu laboratorijsku čašu od 50 ml, u kojoj je 20 ml 0,5% otopine povidon jodida (Sigma-Aldrich). 0,5% otopina povidon-

jodida pripravljena je otapanjem 2,5 g poli(vinilpirolidin)-jodida (Sigma-Aldrich) u 500 ml redestilirane vode. Otopina je priređena dan prije postupka dekontaminacije, a prilagođavanje na pH = 6 rađeno je s 1 M NaOH na dan izvođenja eksperimenta. Da bi se smanjio rizik od naknadnog oštećenja, rožnica ne dodiruje stijenke čaše. Očna jabučica se u 0,5% otopini povidon-jodida drži dvije minute. Zatim se uranja u drugu laboratorijsku čašu od 50 ml, u kojoj je 20 ml fiziološke otopine, na dvije minute, te se nakon toga ispire pod mlazom fiziološke otopine. Nakon dekontaminacije očnih jabučica slijedi postupak izoliranja tkiva rožnice.

Očna jabučica se omata i fiksira sterilnom gazom u gnijezdo napravljeno za potrebe eksperimenta (valjkasta plastična posudica visine ~5 cm, promjera ~3 cm, napunjena 2/3 sa sterilnom gazom). Izoliranje tkiva rožnice vrši se prethodno očišćenim oftalmološkim kirurškim priborom (skalpel, škarice, pinceta) koji je očišćen etanolom (70%, *V*/*V*), na radnoj površini koja je očišćena etanolom (70%, *V*/*V*). Ekscizija rožnice vrši se kirurškim priborom, pritom zahvaćajući 2-3 mm bjeloočnice. Rožica se prihvaća za rub bjeloočnice i stavlja na očišćeno satno stakalce, tako da konveksna strana rožnice ne dodiruje staklo. Na satnom stakalcu rožnica se prenosi u uređaj s laminarnim strujanjem zraka gdje se nastavlja s eksperimentom.

3.3. Pohrana rožnica u hranjivim medijima CorneaMax® i CorneaPrepII®

3.3.1. Pohrana rožnica u hranjivom mediju CorneaMax®

Na način opisan u dijelu 3.2. izolirano je deset rožnica. Rožnice se izoliraju jedna po jedna, te prenose u uređaj s laminarnim strujanjem zraka. Sa satnog stakalca se podižu s pincetom koja je još jednom očišćena etanolom (70%, *V*/*V*), te posušena na zraku. Rožnice se polažu na ploče sa 12 jažica od 10 ml (Corning) u kojima je po 5 ml hranjivog medija CorneaMax® (Eurobio Laboratories). Rožnice se polažu se na način da je konveksna strana rožnice okrenuta prema gore te ne dodiruje stijenke jažica. CorneaMax® medij je dan ranije odmrznut i čuvan u hladnjaku (4°C), do sat prije postupka, kada inkubira (Environmental Shaker- Incubator ES-20/60, Biosan, Latvija) pri 31°C. Nakon 24 sata u inkubatoru provjerava se je li CorneaMax® medij s rožnicama stabilan, odnosno je li dekontaminacija dobro provedena. Provjera se vrši vizualnim pregledom; ukoliko je medij stabilan, ne dolazi do promjene boje ili opalescencije medija. Nakon vizualne provjere, ustanovljeno je da je medij stabilan, te se nastavlja s eksperimentom. S pet rožnica nastavlja se postupak mjerenja

TEER-a, a preostalih pet rožnica se premješta na novu ploču (ploča 2) s jažicama i novim alikvotom od 5 ml medija CorneaMax®, na isti način koji je opisan prije. Ploča 2 se čuva u inkubatoru pri 31°C još 72 sata. Nakon toga se ponovo vrši vizualna provjera stabilnosti medija CorneaMax®, te se s rožnicama koje su u jažicama sa stabilnim medijem nastavlja postupak mjerenja TEER-a nakon 72 sata.

3.3.2. Pohrana rožnica u hranjivom mediju CorneaPrepII®

Na način opisan u dijelu 3.2. izolirano je šest rožnica. Rožnice se izoliraju jedna po jedna, te prenašaju u uređaj s laminarnim strujanjem zraka, sa satnog stakalca podižu se s pincetom koja je još jednom očišćena etanolom (70%, *V*/*V*), te posušena na zraku. Rožnice se polažu na ploče s jažicama od 10 ml (Corning) u kojima je po 10 ml hranjivog medija CorneaPrepII® (Eurobio Laboratories). Rožnice se na ploču polažu na način da je konveksna strana rožnice okrenuta prema gore te ne dodiruje stijenke jažica. CorneaPrepII® medij je dan ranije odmrznut i čuvan u hladnjaku (4°C), do sat prije postupka, kada se čuva pri sobnoj temperaturi (20-25°C). Nakon 24 sata pri sobnoj temperaturi provjerava se je li CorneaPrepII® medij s rožnicama stabilan, odnosno je li dekontaminacija dobro provedena. Provjera se vrši vizualnim pregledom; ukoliko je medij stabilan, ne dolazi do promjene boje ili opalescencije medija. Nakon vizualne provjere, ustanovljeno je da je medij stabilan, te se nastavlja s eksperimentom.

3.4. Određivanje TEER-a rožnica

Barijerna svojstva rožnice ispitana su mjerenjem transepitelnog električnog otpora (TEER) koristeći vertikalne difuzne ćelije (NaviCyte vertical chamber, Harvard Apparatus, SAD). Potpuni NaviCyte sustav vertikalnih ćelija sastoji se od samih ćelija, grijane podloge, sustava za protok plina (plinskog razvodnika), i sustava za prikupljanje podataka (www.warneronline.com).

Uz pomoć elektroda omogućena su elektrofiziološka mjerenja membranskog otpora (www.warneronline.com).

Ćelije se sastoje od dva dijela koja su čvrsto povezana prstenom koji osigurava da ne dolazi do propuštanja medija koji se koriste u mjerenjima. Tkiva kojima se mjere električna svojstva pričvršćuju se između dviju polovica ćelije, koje se ponašaju kao donorski i receptorski odjeljak. Difuzijska površina tkiva, odnosno rožnice u ovom mjerenju, iznosi 0,64 cm^2. Kao donorski i receptorski medij korišteno je po 3 ml KRB-a. Kod mjerenja TEER-a rožnica koje su čuvane u CorneaMax® mediju, KRB je termostatiran pri 31°C, a kod mjerenja TEER-a

rožnica koje su čuvane u CorneaPrepII® mediju, KRB je termostatiran pri 34°C. Sustav ćelija termostatiran je grijaćim blokom koji se spaja na cirkulirajuću vodenu kupelj (ED Julabo, Njemačka); u slučaju mjerenja na rožnicama čuvanim u CorneaMax® mediju, sustav je termostatiran pri 31°C, a u slučaju mjerenja na rožnicama čuvanim u CorneaPrepII® mediju, sustav je termostatiran na 34°C. Rožnice su prije postavljanja na ćelije isprane KRB-om. Rožnice koje su čuvane 24 sata u CorneaMax® mediju su blago izbubrene i nije bilo poteškoća pri pričvršćivanju na ćelije. Međutim, rožnice koje su čuvane 96 sati u CorneaMax® mediju, jako su izbubrile te im se povećala debljina, čak dvostruko od uobičajene debljine rožnice. Iz tog razloga je bilo poteškoća pri pričvršćivanju rožnica na ćelije i mjerenja TEER-a.

TEER izoliranih rožnica izmjeren je koristeći uređaj koji mjeri transepitelnu razliku napona (Epithelial Voltage Clamp EC-825A, Warner Instruments, SAD). Otpor je izmjeren pomoću Ag/AgCl elektroda s KCl (Harvard Apparatus, SAD) uronjenih u receptorski i donorski medij. Epitel rožnica fiksiranih u ćelijama usmjeren je prema donorskom odjeljku. Elektrode koje mjere jakost struje postavljene su što je moguće dalje od rožnica kako bi se osigurala ujednačena gustoća struje kroz rožnice. Elektrode koje mjere napon postavljene su što je moguće bliže rožnicama jer se na taj način smanjuje utjecaj otpora medija, koji može utjecati na preciznost instrumenata ukoliko je velik.

TEER je izračunat korištenjem sljedeće jednadžbe:

$$TEER = [\mathrm{R} - \mathrm{R}(0)] \times 0{,}64\ cm^2$$

gdje je TEER (Ω × cm²) transepitelni električni otpor, R (Ω) izmjereni otpor, R(0) (Ω) otpor prazne ćelije, a 0,64 cm² difuzijska površina rožnice. Otpor prazne ćelije mjeri se s istim volumenom KRB-a u oba odjeljka, bez postavljenje rožnice.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Procjena barijernih svojstava rožnica određivanjem TEER vrijednosti

Transepitelni električni otpor (TEER) služi kao pokazatelj barijernih svojstava epitela (Pepić i sur., 2012) i očuvanosti čvrstih veza između stanica. Barijerna svojstva epitela su u recipročnom odnosu sa vrijednosti TEER, odnosno, što je veća vrijednost TEER, to su barijerna svojstva epitela očuvanija.

Svježe rožnice nabavljane su jednom tjedno iz klaonice, kao otpad pri preradi mesa. Svaki tjedan nije bilo moguće nabaviti isti broj rožnica, zbog ograničenosti kapaciteta klaonice. Također, iako je osoblje klaonice upoznato sa ciljem naših istraživanja, nije moguće kontrolirati način inokulacije, te bi neke od očnih jabučica otpale iz daljnjeg eksperimenta zbog vidljivih oštećenja na površini rožnice, što može biti posljedica neadekvatne inokulacije ili zbog oštećenja prilikom transporta do laboratorija.

Neovisno o odvojenim očnim jabučicama, odnosno rožnicama koje su prošle vizualnu kontrolu, a koje su namjenjene za pohranu u hranjivim medijima, prije svakog eksperimenta odvojeno je 12 očnih jabučica, odnosno svježih rožnica kojima se mjeri TEER, koji služi kao kontrola u daljnjem eksperimentu.

TEER svježih rožnica mjeren je dva puta; prije postupka pohrane rožnica u CorneaPrepII® mediju, i prije postupka pohrane u CorneaMax® mediju, te služi kao kontrolna skupina radi usporedbe rezultata mjerenja nakon pohrane rožnica u medijima. Mjerenje svježih rožnica provedeno je prije pohrane u oba medija zbog biološke varijabilnosti tkiva koje se dobiva na tjednoj bazi i što dosljednijih rezultata mjerenja.

U tablici 1. i 2. prikazani su rezultati mjerenja TEER-a svježih rožnica. Mjerenje je provedeno odmah nakon ekscizije, te 30 i 60 minuta nakon postavljanja na ćelije. Za svako vrijeme mjerenja izračunate su srednje vrijednosti TEER-a uz standardnu devijaciju. TEER svih rožnica izračunat je prema jednadžbi /1/. Iz većih vrijednosti TEER-a svježih rožnica iz skupine rožnica koje su dobivene iz klaonice na dan pohrane rožnica u CorneaPrepII® mediju, vidljiva je biološka varijabilnost uzorka.

Otpor prazne ćelije je također varijabla koju treba uzeti u obzir. Pri mjerenju TEER-a svježih rožnica koje su dobivene na dan pohrane rožnica u CorneaPrepII® mediju, otpor prazne ćelije iznosio je 110 Ω, a pri mjerenju svježih rožnica na dan pohrane rožnica u CorneaMax® mediju, otpor prazne ćelije iznosio je 107 Ω.

Tablica 1. Vrijednosti TEER-a svježih rožnica, dobivenih na dan pohrane rožnica u CorneaPrepII® mediju

	t = 0		t = 30 min		t = 60 min	
Rožnica br.	R(Ω)	TEER(Ωcm²)	R(Ω)	TEER(Ωcm²)	R(Ω)	TEER(Ωcm²)
1	1200	697,6	1242	724,48	1275	758,40
2	1563	929,92	1620	966,40	1681	1005,44
3	1622	967,68	1625	969,60	855	496,00
4	775	425,60	814	450,56	1640	979,20
5	916	515,84	950	537,60	966	547,84
6	746	407,04	772	423,68	815	451,20
7	1924	1160,96	2200	1337,60	2300	1401,6
8	2100	1273,60	2200	1337,60	813	449,92
9	888	497,92	883	495,72	915	515,2
10	779	428,16	894	501,76	1005	572,8
11	792	436,48	803	442,88	2300	1401,60
12	1738	1070,72	1883	1134,72	2100	1273,60
n = 12		734,29±325,93		776,80±355,22		821,07±375,60

Tablica 2. Vrijednosti TEER-a svježih rožnica, dobivenih na dan pohrane rožnica u CorneaMax® mediju

	t = 0		t = 15 min		t = 30 min	
Rožnica br.	R(Ω)	TEER(Ωcm²)	R(Ω)	TEER(Ωcm²)	R(Ω)	TEER(Ωcm²)
1	1470	874,88	1478	877,44	1550	923,52
2	930	526,72	916	517,76	978	557,44
3	986	562,56	995	568,32	1050	603,52
4	1105	638,72	1086	626,56	1090	629,12
5	1118	647,04	1157	672,00	1250	731,52
6	1080	622,72	1137	659,2	1220	712,32
7	1111	642,56	1060	609,92	1024	586,88
8	1895	1144,32	1920	1160,32	1990	1205,12
9	1017	582,40	987	563,20	994	567,68
10	1168	679,04	1120	648,32	1110	641,92
11	1260	737,92	1305	766,72	1345	792,32
12	970	553,32	988	563,84	1086	626,56
n=12		684,27 ± 169,61		686,13 ± 178,87		714,83 ± 187,29

4.2. Utjecaj pohrane rožnica u mediju CorneaPrepII® na barijerna svostva rožnica

U CorneaPrepII® mediju pohranjeno je 6 rožnica, te nakon 24 sata čuvanja i vizualne kontrole stabilnosti medija, za svih 6 rožnica se određuje TEER vrijednost.

TEER rožnica čuvanih u CorneaPrepII® mediju mjeren je odmah nakon postavljanja rožnica na ćelije i nakon 15, 30, 60 i 90 minuta. Svi rezultati mjerenja prikazani su u tablici 3. i tablici 4., a za svako vrijeme mjerenja navedene su srednje vrijednosti TEER-a uz standardnu devijaciju. TEER svih rožnica izračunat je prema jednadžbi /1/. Otpor prazne ćelije prilikom ovog mjerenja iznosio je 107 Ω.

Tablica 3. Vrijednosti TEER-a rožnica čuvanih u CorneaPrepII® mediju tijekom 24 sata

	t = 0		t = 15 min		t = 30 min	
Rožnica br.	R(Ω)	TEER(Ωcm²)	R(Ω)	TEER(Ωcm²)	R(Ω)	TEER(Ωcm²)
1	1915	1157,12	1502	892,80	1467	870,40
2	1922	1161,6	1850	1115,52	1714	1028,48
3	1410	833,92	1480	878,72	1268	743,04
4	1462	867,20	1630	974,72	1120	648,32
5	855	478,72	836	466,56	686	370,56
6	1380	814,72	1260	737,92	1160	673,92
n=6		885,55 ± 254,36		844,37 ± 222,76		722,45 ± 222,55

Tablica 4. Vrijednosti TEER-a rožnica čuvanih u CorneaPrepII® mediju 24 sata

	t = 60 min		t = 90 min	
Rožnica br.	R(Ω)	TEER(Ωcm²)	R(Ω)	TEER(Ωcm²)
1	1270	744,32	1200	699,52
2	1477	876,80	1512	899,84
3	1206	703,36	1007	576,00
4	1041	597,76	958	544,64
5	663	355,84	528	269,44
6	1169	679,68	1250	731,52
n=6		659,63 ± 174,79		620,16 ± 213,34

Uz pomoć izmjerenih vrijednosti TEER-a, procjenjuje se utjecaj pohrane rožnica u mediju na barijerna svojstva rožnica. Kao kontrola koriste se vrijednosti TEER-a svježih rožnica, izmjerenog na dan pohrane rožnica u CorneaPrepII® mediju.

Iz dobivenih rezultata mjerenja vidljiv je povoljan utjecaj pohrane rožnica u CorneaPrepII® mediju na barijerna svojstva rožnica, odnosno opaženo je da su vrijednosti

TEER-a više od vrijednosti TEER-a svježih rožnica. To se može objasniti pojavom da epitelna oštećenja koja su prisutna prije pohrane u medijima za pohranu u kulturi tkiva, mogu, do neke mjere, zacijeliti tijekom prva tri dana čuvanja (Haug i sur., 2013).

4.3. Utjecaj pohrane rožnica u mediju CorneaMax® na barijerna svojstva rožnica

U CorneaMax® mediju pohranjeno je 10 rožnica, te se nakon 24 sata čuvanja i vizualne kontrole stabilnosti medija, za 5 rožnica se određuje TEER vrijednost, dok je preostalih 5 rožnica prebačeno u novi alikvot medija i čuvano još 96 sati. Nakon 96 sati i vizualne provjere stabilnosti medija, 2 rožnice su odbačene iz eksperimenta jer je došlo do promjene boje i bistrine medija, a s preostale 3 rožnice se kreće u postupak mjerenja TEER-a. Rezultati mjerenja još jedne rožnice su odbačeni jer su ćelije propuštale medij i rezultati nisu bili dosljedni.

TEER rožnica čuvanih u CorneaMax® mediju mjeren je odmah nakon postavljanja rožnica na ćelije i nakon 15, 30, 60 i 90 minuta. Rezultati mjerenja TEER-a rožnica čuvanih 24 sata prikazani su u tablici 5. i tablici 6., a rezultati mjerenja TEER-a nakon čuvanja rožnica 120 sati u CorneaMax® mediju prikazani su u tablici 7 i tablici 8. Za svako vrijeme mjerenja navedene su srednje vrijednosti TEER-a uz standardnu devijaciju. TEER svih rožnica izračunat je prema jednadžbi /1/. Otpor prazne ćelije prilikom mjerenja TEER-a rožnica čuvanih 24 sata iznosio je 102 Ω, a prilikom mjerenja rožnica čuvanih 120 sati iznosio je 113 Ω.

Uz pomoć izmjerenih vrijednosti TEER-a, procjenjuje se utjecaj pohrane rožnica u mediju na barijerna svojstva rožnica. Kao kontrola koriste se vrijednosti TEER-a svježih rožnica, izmjerenog na dan pohrane rožnica u CorneaMax® mediju.

Tablica 5. Vrijednosti TEER-a rožnica čuvanih u CorneaMax® mediju 24 sata

	t = 0		t = 15 min		t = 30 min	
Rožnica br.	R(Ω)	TEER(Ωcm²)	R(Ω)	TEER(Ωcm²)	R(Ω)	TEER(Ωcm²)
1	1900	1150,72	2100	1278,72	2500	1534,72
2	380	117,92	470	235,52	455	225,92
3	1530	913,92	1245	731,52	1280	753,92
4	1500	894,72	1050	606,72	1200	702,72
5	1520	907,52	1450	862,72	1600	958,72
n=5		808,96 ± 368,48		743,04 ± 379,99		835,20 ± 474,33

Tablica 6. Vrijednosti TEER-a rožnica čuvanih u CorneaMax® mediju 24 sata

	t = 60 min		t = 90 min	
Rožnica br.	R(Ω)	TEER(Ωcm²)	R(Ω)	TEER(Ωcm²)
1	2800	1726,72	2700	1662,72
2	1400	830,73	640	344,32
3	1288	759,04	1138	663,04
4	1380	817,92	1390	824,32
5	1660	997,12	1620	971,52
n=5		1026,30 ± 401,42		893,18 ± 489,20

Rožnice koje su čuvane u CorneaMax® mediju 24 sata, blago su izbubrile, i vizualnom procjenom se opaža zamućenje. Razlog tome može biti što u ovom mediju nema dekstrana niti kojeg drugog sredstva za odbubrivanje, pa stoma rožnice bubri, a posljedično se gubi providnost rožnice. Bez obzira na to, vrijednosti TEER-a ovih rožnica više su od TEER-a rožnica kontrolne skupine, što znači da su barijerna svojstva rožnice nakon 24 sata pohrane u ovom mediju očuvana.

Tablica 7. Vrijednosti TEER-a rožnica čuvanih u CorneaMax® mediju 120 sati

	t = 0		**t = 15 min**		**t = 30 min**	
Rožnica br	R(Ω)	TEER(Ωcm²)	R(Ω)	TEER(Ωcm²)	R(Ω)	TEER(Ωcm²)
1	95		580		30	
2	218	67,20	120	4,48	207	60,16
3	443	211,20	495	244,48	509	253,44
n=2		139,20 ± 101,82		124,48 ± 169,71		156,80 ± 136,67

Tablica 8. Vrijednosti TEER-a rožnica čuvanih u CorneaMax® mediju 120 sati

	t = 60 min		**t = 90 min**	
Rožnica br.	R(Ω)	TEER(Ωcm²)	R(Ω)	TEER(Ωcm²)
1				
2	245	84,48	245	84,48
3	453	217,60	525	263,68
n=2		151,04 ± 94,19		174,08 ± 126,71

Rožnice koje su čuvane u CorneaMax® mediju 120 sati jako su nabubrile, čak dvostruko od svoje uobičajene debljine, te su također izgubile providnost. TEER takvih rožnica drastično je smanjen u usporedbi s TEER vrijednostima kontrolne skupine, što znači da nakon pohrane rožnica u CorneaMax® mediju, barijerna svojstva rožnice nisu očuvana, odnosno da nisu očuvane čvrste veze između stnica epitela.

Kod pohrane rožnica u medijima iz Cornea linije, slijedeći korak bi bio premještanje rožnica u medij za odbubrivanje, no zbog ograničenosti laboratorija, u ovom eksperimentu to nije moglo biti provedeno. Stoga nije ispitano kako bi odbubrivanje rožnica utjecalo na barijerna svojstva.

5. ZAKLJUČCI

- Tansepitelni električni otpor (TEER) praktični je pokazatelj barijernih svojstava animalne rožnice i očuvanosti integriteta čvrstih veza između stanica epitela.
- Pohranom animalnih rožnica u CorneaPrepII® mediju za pohranu u kulturi tkiva tijekom 24 sata, barijerna svojstva animalnih rožnica ostaju očuvana.
- Pohranom animalnih rožnica u CorneaMax® mediju za pohranu u kulturi tkiva tijekom 120 sati, barijerna svojstva rožnice se mijenjaju u ovisnosti o vremenu. Nakon 24 sata čuvanja u mediju barijerna svojstva rožnice nisu bila narušena, dok nakon 120 sati u mediju dolazi do narušavanja barijernih svojstava rožnice i integriteta čvrstih veza između stanica epitela.
- Za cjelovitije razumjevanje utjecaja čuvanja animalnih rožnica u medijima iz Cornea linije na barijerna svojstva animalnih rožnica, potrebno je provesti daljnja ispitivanja.

6. LITERATURA

- Armitage JW. Preservation of Human Cornea, *Transfus Med Hemother*, 2011, 38, 143-147.

- DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg*. 2011, 37, 588-598.

- Eghrari AO, Amer Riazuddin S, Gottsch JD. Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development. *Prog Molecular Biol Transl Sci*. 2015, 134, 7-23.

- Eurobio Laboratories, CorneaMax® storage medium, 2010, http://www.eurobio-cornea.com/images/Image/File/Cornea/CMXSTO01F%20-%20CorneaMax%20V1_00.pdf, pristupljeno 21.3.2017.

- Eurobio Laboratories, CorneaPrepII® storage medium, 2010, http://www.eurobio-cornea.com/images/Image/File/Cornea/CMXSTA01F%20-%20CorneaPrepII%20V1_00.pdf, pristupljeno 21.3.2017.

- Haug K, Azqueta A, Johnsen-Soriano S, Shahdadfar A, Drolsum LK, Moe MC, Røger MT, Romero FJ, Collins AR, Nicolaissen B. Donor cornea transfer from Optisol GS to organ culture storage: a two-step procedure to increase donor tissue lifespan. *Acta Ophthalmol.* 2013, 91, 219-225.

- NaviCyte Vertical Ussing System, https://www.warneronline.com/product_info.cfm?id=723, pristupljeno 15.5.2017.

- Pels E, Vrensen GFJM. Microbial decontamination of human donor eyes with povidone-iodine: penetration, toxicity, and effectiveness. *Br J Ophthamol*. 1999, 83, 1019-1026.

- Pels E, Beele H, Claerhout I. Eye bank issues: Preservation techniques: warm versus cold storage, *Int Ophtalmol*, 2008, 28, 155-163.

- Pels L. Organ culture: the method of choice for preservation of human donor corneas. *Br J Ophthamol.* 1997, 81, 523–525.

- Pepić I. Problemi lokalne primjene pripravaka za oči, *Farm Glas,* 2004, 60, 311-328.

- Pepić I, Hafner A, Lovrić J, Filipović-Grčić J. Modeli za ispitivanje permeabilnosti I predviđanje bioraspoloživosti lijeka u oku, *Farm Glas*, 2012, 68, 177-200.

7. SAŽETAK

S obzirom da je epitel rožnice glavna barijera prijenosu djelatnih tvari preko rožnice, očuvanje epitela rožnice važno je za provođenje uspješnih *ex vivo* ispitivanja permeabilnosti.

U ovom diplomskom radu ispitan je utjecaj pohrane animalne rožnice u komercijalno dostupnim medijima za transport i pohranu rožnica na očuvanje barijernih svojstava rožnice. Barijerna svojstva rožnica procijenjena su određivanjem transepitelnog električnog otpora. Transepitelni električni otpor izoliranih animalnih rožnica određen je u vertikalnim protočnim difuzijskim ćelijama.

Pohranom rožnica u CorneaPrepII® mediju tijekom 24 sata, barijerna svojstva rožnica ostaju očuvana. Pohranom rožnica u CorneaMax® mediju tijekom 120 sati, barijerna svojstva rožnica se mijenjaju u ovisnosti o vremenu; nakon 24 sata čuvanja u mediju barijerna svojstva rožnice nisu bila narušena, dok nakon 120 sati u mediju dolazi do narušavanja barijernih svojstava rožnice.

SUMMARY

Given that the corneal epithelium is the main barrier to the transfer of the active substances through the cornea, preservation of the epithelim is important to conduct *ex vivo* permeability tests.

The aim of this diploma thesis was to examine the effect of the storage of animal cornea in commercially available mediums for transport and storage on the barrier properties of the cornea. Barrier properties of the cornea were estimated by measuring transepithelial electric resistance. Transepithelial electric resistance tests of the isolated animal corneas were performed in vertical difusion cells, using epithelial voltage clamp.

By storing the corneas in the CorneaPrepII® meduim for 24 hours, the barrier properties of the corneas remain preserved. By storing the corneas in the CorneaMax® medium for 120 hours, the barrier properties change depending of the time of storage; after 24 hours of storage in the medium, the barrier properties of the corneas remain preserved, while after 120 hours of storage barrier properties were disrupted.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku tehnologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, HrvatskA

Diplomski rad

PROCJENA BARIJERNIH ZNAČAJKI ANIMALNIH ROŽNICA NAKON POHRANE U KOMERCIJALNO DOSTUPNIM MEDIJIMA

Sara Ugrinić

SAŽETAK

S obzirom da je epitel rožnice glavna barijera prijenosu djelatnih tvari preko rožnice, očuvanje epitela rožnice važno je za provođenje uspješnih *ex vivo* ispitivanja permeabilnosti.

U ovom diplomskom radu ispitan je utjecaj pohrane animalne rožnice u komercijalno dostupnim medijima za transport i pohranu rožnica na očuvanje barijernih svojstava rožnice. Barijerna svojstva rožnica procijenjena su određivanjem transepitelnog električnog otpora. Transepitelni električni otpor izoliranih animalnih rožnica određen je u vertikalnim protočnim difuzijskim ćelijama.

Pohranom rožnica u CorneaPrepII® mediju tijekom 24 sata, barijerna svojstva rožnica ostaju očuvana. Pohranom rožnica u CorneaMax® mediju tijekom 120 sati, barijerna svojstva rožnica se mijenjaju u ovisnosti o vremenu; nakon 24 sata čuvanja u mediju barijerna svojstva rožnice nisu bila narušena, dok nakon 120 sati u mediju dolazi do narušavanja barijernih svojstava rožnice.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 23 stranice, 8 tablica i 12 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: kultura tkiva, transepitelni električni otpor, vertikalne difuzijske ćelije

Mentor: **Dr. sc. Ivan Pepić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ivan Pepić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Anita Hafner, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Technology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

BARRIER PROPERTIES OF THE ANIMAL CORNEA AFTER STORAGE IN COMMERCIALLY AVAILABLE MEDIUMS

Sara Ugrinić

SUMMARY

Given that the corneal epithelium is the main barrier to the transfer of the active substances through the cornea, preservation of the epithelim is important to conduct *ex vivo* permeability tests.

The aim of this diploma thesis was to examine the effect of the storage of animal cornea in commercially available mediums for transport and storage on the barrier properties of the cornea. Barrier properties of the cornea were estimated by measuring transepithelial electric resistance. Transepithelial electric resistance tests of the isolated animal corneas were performed in vertical difusion cells, using epithelial voltage clamp.

By storing the corneas in the CorneaPrepII® meduim for 24 hours, the barrier properties of the corneas remain preserved. By storing the corneas in the CorneaMax® medium for 120 hours, the barrier properties change depending of the time of storage; after 24 hours of storage in the medium, the barrier properties of the corneas remain preserved, while after 120 hours of storage barrier properties were disrupted.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 23 pages, 8 tables and 12 references. Original is in Croatian language.

Keywords: organ culture, transepithelial electric resistance, vertical difusion cells

Mentor: **Ivan Pepić**, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ivan Pepić**, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Anita Hafner, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Dubravka Vitali Čepo, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2017.