

**Glukoosin vaikutus bentsalkonikloridin aiheuttamaan toksisuuteen
verkkokalvon pigmenttiepiteelisoluisissa**

Lotta Mononen
Syventävien opintojen kirjallinen työ
Tampereen yliopisto
Lääketieteen yksikkö
Silmätaudit
Marraskuu 2011

Tampereen yliopisto
Lääketieteen yksikkö
Silmätaudit

LOTTA MONONEN: GLUKOOSIN VAIKUTUS BENTSALKONIKLORIDIN
AIHEUTTAMAAN TOKSISUUTEEN VERKKOKALVON PIGMENTTIEPITEELISOLUISSA

Kirjallinen työ, s. 19.
Ohjaaja: professori Hannu Uusitalo

Marraskuu 2011

Avainsanat: ARPE-19, hyperglykemia, DMEM/F12, WST-1-koe

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää solujen elatusaineen glukoosikonsentraation vaikutus bentsalkonikloridin toksisuuteen verkkokalvon pigmenttiepiteelisoluviiljelmissä. Vaihtuvien glukoosikonsentraatioiden lisäksi tutkittiin eri elatusaineiden (DMEM/F12 ja DMEM/bikarbonaatti) vaikutuksia solujen kasvamiseen. Tutkimuksessa käytettiin ARPE-19-soluja, jotka kasvatettiin DMEM/F12-mediumissa glukoosikonsentraatiolla 18 mmol/l. Elatusaineiden glukoosikonsentraatiot olivat DMEM/bikarbonaattimediumeille 5,56 mmol/l, 18 mmol/l tai 33 mmol/l ja DMEM/F12-mediumeissa 18 mmol/l tai 33 mmol/l. 24 tunnin kasvatuksen jälkeen solut altistettiin tunnin ajaksi bentsalkonikloridille (0 %, 0,000625 %, 0,00125 % ja 0,0025 %). Bentsalkonikloridin vaikutusta solujen elinkykyyn mitattiin mitokondrioiden aktiivisuuteen perustuvan WST-1-kokeen avulla. Tuloksista laskettiin EC₅₀-arvot kaikille glukoosikonsentraatio- ja mediumyhdistelmille. Ryhmien väliset erot laskettiin Studentin t-testillä ja GraphPad Prism 5 -ohjelmalla. Tutkimuksessa ARPE-19-soluviiljelmissä bentsalkonikloridin solutoksisuus oli merkitsevästi pienempi glukoosipitoisuudella 18 mmol/l kuin 5,56 mmol/l tai 33 mmol/l, kun elatusaineena oli DMEM/bikarbonaatti. Bentsalkonikloridin toksisuus DMEM/F12-elatusaineessa kasvatetuissa soluissa oli merkitsevästi pienempi kuin DMEM/bikarbonaattimediumissa kasvatetuissa, kun glukoosikonsentraatio oli 33 mmol/l. Mikäli halutaan arvioida glukoosin vaikutusta ARPE-19-soluissa, tulisi tutkimuksissa käyttää 18 mmol/l:ssa glukoosia kasvatettujen solujen lisäksi 5,56 mmol/l:ssa kasvatettuja. Elatusaineen valitsemisessa tulisi suosia DMEM/bikarbonaattia, koska tällöin tutkimuksen glukoosikonsentraatio voi olla alle 18 mmol/l.

Sisällys

1 Johdanto	1
1.1 Silmän rakenne ja näkörata	1
1.2 Retinan pigmenttiepiteeli	2
1.3 Diabetes ja diabeettinen retinopatia	3
2 Aineisto ja menetelmät	5
2.1 ARPE-19-solut ja kasvatusmedium	5
2.2 Solujen siirrostus	5
2.3 Solujen kasvatus eri glukoosipitoisuuksissa	6
2.4 Bentsalkonikloridi ja WST-1-koe	7
3 Tulokset	9
4 Pohdinta	12
Lähteet	15

1 JOHDANTO

1.1 Silmän rakenne ja näkörata

Silmä on valoa aistiva elin, joka välittää ympäristöstä visuaalista informaatiota aivojen primariselle näkökuorelle. Näköinformaation käsittelyyn on varattu 55 % aivokuoren pinta-alasta, kun vastaava pinta-ala tuntoaistia varten on 11 %. (Prasad & Galetta 2011.) Kun valo osuu silmään, valonsäteet läpäisevät ensimmäisenä silmän peittävän kyynelfilmin. Tämän jälkeen se kulkee edelleen sarveiskalvon, etukammion, linssin ja lasiaisen läpi verkkokalvolle. (Boron & Boulpaep 2009.)

Verkkokalvo eli retina muodostuu kymmenestä solukerroksesta, ja se jaetaan kahteen osaan: lasiaista kohti olevaan neuraaliseen kerrokseen sekä retinan pigmenttiepiteeliin (Ross & Pawlina 2006). Retinan pigmenttiepiteeli on lasiaisen suhteen verkkokalvon uloin osa, ja sitä ympäröi Bruchin kalvo. Retinan pigmenttiepiteelisolujen yläpuolella neuraalisessa kerroksessa sijaitsevat fotoreseptorisolut, jotka muuttavat fotonien sisältämän valoenergian kemialliseksi energiaksi. (Haines 2005.) Fotoreseptorisolut jaetaan kahteen tyyppiin, joista tappisolut erottavat kirkaassa valossa värejä ja sauvasolut hämärässä harmaan eri sävyjä (Boron & Boulpaep 2009).

Verkkokalvolla tappisoluja on erityisesti tarkannäkemisen eli fovean alueella, kun taas sauvasolut sijaitsevat perifeerisemmin (Prasad & Galetta 2011). Näköinformaation välittämistä varten fotoreseptorisolut synapsoituvat verkkokalvon bipolaarisoluihin, jotka edelleen muodostavat liitoksen gangliosolujen kanssa. Gangliosolujen aksonit yhtyvät näköhermoksi, joka alkaa silmän näköhermonystystä. Kiasmassa oikean ja vasemman näköhermon nenänpuoleisten gangliosolujen aksonit risteävät ja jatkavat samaa näkörataa pitkin yhdessä vastakkaisen silmän ohimopuoleisten gangliosolujen aksoneiden kanssa talamukseen. Talamuksesta näköinformaatio jatkaa edelleen takaraivolohkoon primariselle näkökuorelle. (Prasad & Galetta 2011.)

1.2 Retinan pigmenttiepiteeli

Retinan pigmenttiepiteelisolut ovat kuutiomaisia soluja, jotka ovat järjestäytyneet yhden solukerroksen paksuiseksi kerrokseksi (Ross & Pawlina 2006). Solut ovat kiinnittyneet toisiinsa aukkoliitoksilla ja tiiviillä liitoksilla, ja tämän rakenteen vuoksi retinan pigmenttiepiteelit muodostavat retina-veriesteen. Tämä estää veden, ionien ja muiden veren kuljettamien aineiden vapaan diffundoitumisen verkkokalvolle. (Simó 2010.)

Retinan pigmenttiepiteelin solut sisältävät pigmenttiaineita, kuten melaniinia ja lipofuskiinia. Melaniini on soluissa melanosomeissa, ja sen tehtävänä on sitoa solunsisäisiä happiradikaaleja sekä absorboida neuraalisen retinan läpi tulevaa valoa ja siten vähentää valon takaisin heijastumista. Toisaalta melaniini sitoo myös lääkeaineita, mikä voi olla silmälle haitallista. (Dayhaw-Barker 2002.) Lipofuskiinia kertyy soluun, kun retinan pigmenttiepiteelin solut fagosytoivat fotoreseptoreiden ulompia segmenttejä. Lipofuskiinin määrä solussa kasvaa iän mukana, ja kertynyt lipofuskiini saattaa haitata solun toimintaa ja johtaa edelleen silmänpohjan ikärappeuman kehittymiseen. (Delori ym. 2001.)

Valo aiheuttaa fotoreseptoreissa valolle herkän näköpigmentin, rodopsiinin, hajoamisen, ja näkemisen edellytyksenä on retinan pigmenttiepiteelin kyky palauttaa näköpigmentit takaisin aktiiviseen muotoon. Rodopsiini muodostuu opsiinista sekä siinä kiinni olevasta retinaalista. Valon fotonit muuttavat retinaalin 11-cis-sidoksen trans-muotoon, joka edelleen muutetaan retinoliiksi. Retinoli eritetään fotoreseptoreista retinan pigmenttiepiteelin soluille, joissa RPE65-entsyymien avulla retinoli muutetaan takaisin aktiiviseksi retinaaliksi ja kuljetetaan takaisin fotoreseptoreille. (Nilsson 2006.)

Retinan pigmenttiepiteelin solut erittävät myös kasvutekijöitä ja muita aineita, jotka ovat välttämättömiä retinan hyvinvoinnin ylläpitämisessä. Solujen on todettu erittävän muun muassa antiangiogeneettistä pigmenttiepiteelikasvutekijää (PEDF), verisuonten endoteelin kasvutekijää (VEGF), insuliinin kaltaista kasvutekijää (IGF-1), kemokiineja sekä tuumorinekroositekijää (TNF- α). Eritetyistä aineista antiangiogeneettistä pigmenttiepiteelikasvutekijää ja verisuonten endoteelin kasvutekijää pidetään tärkeimpinä. VEGF estää endoteelisolujen apoptoosia sekä auttaa ylläpitämään silmän kapillaarien endoteelin yhtenäisyyttä. PEDF taas suojaa soluja hapenpuutteen aiheuttamalta apoptoosilta, stabiloi kapillaarien seinämiä ja estää endoteelisolujen jakaantumista. (Simó ym. 2010.)

1.3 Diabetes ja diabeettinen retinopatia

Glukoosi on kaikille soluille välttämätön energianlähde, jota saadaan ruuasta. Veren normaali glukoosikonsentraatio on 4–6 mmol/l, ja haiman erittämä insuliini on välttämätön hormoni, jotta glukoosi pystyy imeytymään soluihin (Meisenberg & Simmons 2011). Jos insuliinin erityös vähenee (1 tyypin diabetes) tai sen vaikutus kohdesoluihin heikkenee (2 tyypin diabetes), alkaa verensokeripitoisuus nousta. Kun glukoosikonsentraatio on toistetuksi paastoplasmanäytteessä

vähintään 7 mmol/l tai yli 11 mmol/l, puhutaan diabeteksestä. Sitä sairastaa Suomessa arviolta yli 500 000 ihmistä, ja siitä aiheutuu 15 % terveydenhuollon menoista. On ennustettu, että sairastuneiden määrä voi jopa kaksinkertaistua tulevien 10–15 vuoden aikana. (Diabetes Käypä hoito 15.9.2009.) Kohonnut verensokeri voi ilmetä laihtumisena, runsaana virtsaamisena ja jatkuvana janon tunteena. Se voi olla myös täysin oireeton. Diabetes altistaa erilaisille kohdeelinvaurioille, kuten munuaisten vajaatoiminnalle, polyneuropatialle sekä diabeettiselle retinopatialle. (Syväne 2007.)

Diabeettinen retinopatia on diabeteksestä johtuva, jopa sokeutumiseen johtava verkkokalvosairaus. Sitä esiintyy tyypin 1 diabeetikoista joka toisella ja tyypin 2 diabeetikoista joka neljännellä. (Laatikainen & Summanen 2010.) Diabeteksen kesto on merkittävä diabeettisen retinopatian riskitekijä. Kun 1 tyypin diabetes on kestänyt 20 vuotta, sairastaa diabeettista retinopatiaa 80–100 % henkilöistä. Vastaavasti taas 2 tyypin diabeteksen diagnosoitihetkellä voidaan diabeettinen retinopatia todeta jopa kolmasosalla sairastuneista. (Diabeettinen retinopatia Käypä hoito 12.6.2006.) Myös iällä sekä veren glukoosikonsentraatiolla on vaikutusta retinopatian kehittymiseen (Moss ym. 1998, Kalesnykiene ym. 2009).

Diabeettinen retinopatia voidaan jakaa kahteen alaryhmään, joista taustaretinopaattisessa muodossa nähdään mikroaneurysmia, verkkokalvon turvotusta, kovia eksudaatteja, ja edelleen retinopatian vaikeutuessa mikroinfarktien aiheuttamia pehmeitä eksudaatteja sekä niin sanottuja IRMA-suonia (intraretinal microvascular abnormalities). Proliferatiivisesta retinopatiasta puhutaan silloin, kun verkkokalvolle alkaa kasvaa uudisverisuonia. (Laatikainen & Summanen 2010.)

Diabeettisen retinopatian patogeneesi on vielä osittain epäselvä. Soluissa oleva aldoosireduktaasientsyymi muuttaa sokereita alkoholeiksi, kuten glukoosia sorbitoliksi ja galaktoosia galaktitoliksi. Kaihin on todettu aiheutuvan aldoosireduktaasin toiminnan aiheuttamasta soluvauriosta, ja samaa mekanismia on epäilty diabeettisessa retinopatiassa. (Yanoff & Duker 2007.) Alkoholit eivät pääse suoraan diffundoitumaan solukalvon läpi ulos solusta, joten niiden kertyminen solun sisälle johtaa veden absorboitumiseen soluun ja siten solun sisäiseen elektrolyyttihäiriöön. Tämä osmoottinen stressi johtaa edelleen epiteelisolujen vaurioitumiseen ja kaihin kehittymiseen. (Chung & Chung 2003, Crabbe & Goode 1998.) Toisaalta kudoksen hapenpuute ja korkea verensokeri stimuloivat retinan pigmenttiepiteelin soluja, retinan neuroneja ja gliasoluja erittämään sytokiineja sekä muita verisuonien kasvua edistäviä eli vasoproliferatiivisia aineita. Verisuonten endoteelin kasvutekijän (VEGF) erittymisen seurauksena verisuonten kasvu lisääntyy, verkkokalvon verenkierto kiihtyy ja endoteelisolujen läpäisevyys lisääntyy. (Summanen

& Tulokas 2006.) Diabetes johtaa myös verihiutaleiden toiminnan häiriintymiseen, mikä voi johtaa verkkokalvon kapillaarien tukkeutumiseen ja edelleen paikalliseen iskemiaan (Yanoff & Duker 2007). Toisaalta veri-retinaesteen vaurioituminen johtaa plasman tihkumiseen soluvälitilaan, mikä voidaan havaita verkkokalvon turvotuksena (Summanen & Tulokas 2006).

Diabeettisen retinopatian kehittymistä voidaan ehkäistä diabeteksen hyvällä hoidolla (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group 1993). Verenpaineen hallinnalla pystytään ehkäisemään diabeettisen retinopatian kehittymistä, ja säännöllisellä asetyylisalisyylihapon käytöllä voidaan mahdollisesti hidastaa sen etenemistä (Diabeettinen retinopatia Käypä hoito 12.6.2006).

ARPE-19-solut ovat viljeltyjä ihmisen retinan pigmenttiepiteelisoluja, jotka ilmentävät kyseiselle solutyypille ominaisia rakenteita (Dunn ym. 1996). Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, miten ARPE-19-solujen kasvatus erilaisilla glukoosikonsentraatioilla vaikuttaa bentsalkonikloridin (BAK) toksisuuteen WST-1-määrityksen avulla mitattuna. Lisäksi tutkittiin, mitä vaikutusta eri kasvatusmediumeilla, DMEM/F12:lla verrattuna DMEM/bikarbonaattiliuokseen, on solujen elinkykyyn. Natriumbikarbonaatti tuottaa liuutessaan vetykarbonaattia (HCO_3^-), joka toimii elimistössä veren pH-puskurina (Boron 2009).

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 ARPE-19-solut ja kasvatusmedium

Tutkimukseen käytettiin itsestään jakaantuvia ARPE-19-soluja, joiden on todettu ilmentävän kyseiselle solutyypille ominaisia rakenteita (Dunn ym. 1996). Solutasolla hyperglykeemisten kasvuolosuhteiden on havaittu aiheuttavan muutoksia ARPE-19-solujen morfologiassa, kasvunopeudessa sekä kasvutekijöiden ja proteiinien erityksessä (Heimsath ym. 2006, Yokoyama ym. 2006). Lisäksi kasvatusmediumin koostumus vaikuttaa ARPE-19-solujen erilaistumiseen solun $\alpha 5$ -geenin promoottorin transkriptioaktiivisuuden, geenien ekspression sekä solujen erilaistumisnopeuden kautta (Janssen ym. 2000, Proulx ym. 2004, Tian ym. 2005).

Solujen ylläpitoon käytettiin DMEM/F12-elatusainetta (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12), 1 % antibiootti/antimykoottiliuosta (AB/AM) ja 10 % syntymättömän naudan seerumia (Fetal Bovine Serum, FBS). DMEM/F12:n glukoosikonsentraatio oli 18 mmol/l.

Tutkimusta varten nestetyössä jäädytetyt ARPE-19-solut, joiden jakokertojen määrä eli passage oli 37, herätettiin sulattamalla ne lämpöhauteessa, ja heti liuksen sulettua solut ja neste pipetoitiin T-pulloon, jossa oli 19 ml ylläpitomediumia. Soluja kasvatettiin 37 asteessa inkubaattorissa, jonka kaasukoostumus oli 5 % CO₂ / 95 % ilmaa. Seuraavana päivänä koko medium vaihdettiin ja tilalle laitettiin 16 ml ylläpitomediumia.

2.2 Solujen siirrostus

Solujen siirrostus tapahtui 3–5 vuorokauden välein riippuen solujen kasvunopeudesta. Solujen siirrostus tapahtui, kun solut kasvoivat konfluentisti ja peittivät koko pullon pohjan. Mediumin vaihto tehtiin kerran ennen jokaista siirrostusta. Mediumin vaihdossa T-pullosta poistettiin 8 ml ylläpitomediumia ja sen tilalle lisättiin 8 ml tuoretta mediumia.

Solujen siirrostuksessa vanha medium poistettiin pullosta. Tämän jälkeen solut pestiin kaksi kertaa 10 ml:lla Hanksin suolaliuosta (Hank's Buffered Salt Solution). Solut irrotettiin lisäämällä 1 ml trypsiini-EDTA:ta ja inkuboimalla soluja 10 minuutin ajan. Kun solut olivat irronneet, pulloon lisättiin kasvatusmediumia, seosta suspensoitiin ja solumassa jaettiin tasan 2–3 sentrifugiputkeen.

Putkiin lisättiin saman verran kasvatusmediumia. Tämän jälkeen putkia sentrifugoitiin 10 minuuttia nopeudella 700 rpm. Vanha medium imettiin pois solujen päältä, tilalle lisättiin uutta mediumia 2 ml ja solut laskettiin. Uuteen T-pulloon lisättiin mediumia ja solumassaa siten, että nesteen kokonaistilavuudeksi saatiin 16 ml. Jokaisen siirrostuksen jälkeen solulinjan passage- numero kasvoi yhden numeron suuremmaksi. Solulinja tuhottiin, kun se saavutti passage-numeron 48.

Solulaskentaa varten 30 µl solumassaa värjättiin 120 µl:lla Trypan blue -liuosta, ja tätä seosta pipetoitiin edelleen solulaskukammioon. Solujen laskemisella saatiin tietää solumäärä millilitraa kohti.

2.3 Solujen kasvatus eri glukoosipitoisuuksissa

Solujen kasvatukset eri glukoosipitoisuuksissa tehtiin kahdessa erässä. Ensimmäisessä erässä 24 tunnin kasvatusliuos sisälsi 1 % AB/AM:ia, 10 % FBS:ia sekä DMEM/F12:ia, jonka glukoosikonsentraatio oli joko 18 mmol/l tai 33 mmol/l. DMEM/F12:n normaali glukoosikonsentraatio on 18 mmol/l. 33 mmol/l:n glukoosikonsentraatio saatiin lisäämällä puuttuva määrä D-glukoosia DMEM/F12-mediumiin. Ennen käyttöä medium steriilisuodatettiin.

Toisessa erässä 24 tunnin kasvatusliuos koostui 1 % AB/AM:sta, 10 % FBS:sta, 7,5 % natriumvetykarbonaatista sekä DMEM:sta, jonka glukoosikonsentraatio oli 5,56 mmol/l, 18 mmol/l tai 33 mmol/l. DMEM itsessään ei sisällä glukoosia, joten glukoosikonsentraatit 5,56 mmol/l, 18 mmol/l ja 33 mmol/l saatiin punnitsemalla ja lisäämällä mediumiin tarvittava määrä D-glukoosia. Ennen glukoosipitoisen DMEM:n käyttöä mediumit steriilisuodatettiin.

Solujen altistamista varten 10 000 solua siirrostettiin 96-kuoppalevyn kuoppiin. Reunimmaisiiin ja soluttomiin kuoppiin pipetoitiin 100 µl tislattua vettä, soluja sisältäviin kuoppiin pipetoitiin 100 µl 24 tunnin kasvatusmediumia. Kaksi ylintä riviä sekä alin rivi olivat soluttomia. Tämän jälkeen kuoppalevyt laitettiin inkubaattoriin, jossa lämpötila oli 37 astetta ja kaasukoostumus oli 5 % CO₂/ 95 % ilmaa.

2.4 Bentsalkonikloridi ja WST-1-koe

BAK eli bentsalkonikloridi on silmätipossa käytettävä sarveiskalvolle toksinen säilöntäaine (Labbe 2006). Bentsalkonikloridin vaikutusta selvitettiin WST-1-tutkimuksen avulla. WST-1-määrittelyksellä tutkitaan solujen mitokondrioiden toimintaa. Elinkelpoisten solujen mitokondrioiden

dehydrogenaasientsyymit pilkkovat WST-1-suolan{4-[3-(4-iodofenyyl)-2-(4-nitrofenyyl)-2H-5-tetratsolio]-1,3-bentseenidisulfonaatti} formatsaaniksi. Tämän seurauksena näytteen väri vaihtuu lievästi punaisesta tumman punaiseksi, ja tätä muutosta voidaan mitata määrittämällä näytteen aallonpituus. (Roche 2007.)

Ensimmäisen erän altistusmediumit koostuivat DMEM/F12:sta, jonka glukoosikonsentraatio oli 18 mmol/l tai 33 mmol/l, sekä 1 % AB/AM:sta. Toisen erän altistusmediumit sisälsivät 1 % AB/AM:ia, 7,5 % natriumvetykarbonaattia sekä DMEM:ia, jonka glukoosikonsentraatio oli 5,56 mmol/l, 18 mmol/l tai 33 mmol/l. Jokaista altistusta varten kuhunkin altistusmediumiin lisättiin bentsalkonikloridia, jolloin saatiin laimennussarja bentsalkonikloridikonsentraatioilla 0,0025 %, 0,00125 %, 0,000625 % ja 0,00 %. Altistusmediumeihin ei lisätty seerumia, sillä sen on todettu suojelevan soluja ja siten vähentävän bentsalkonikloridin toksista vaikutusta (Huhtala 2002a, 2002b, 2003).

Kun soluja oli kasvatettu eri glukoosipitoisuuksissa 24 tuntia, pipetoitiin kasvatusliuos pois ja lisättiin soluille 100 µl bentsalkonikloridialtistusliuosta. Tämän jälkeen levyjä inkuboitiin 37 asteessa kaasukoostumuksessa 5 % CO₂ / 95 % ilmaa yhden tunnin ajan. Tämän jälkeen solu- ja kontrollikuoppiin lisättiin 10 µl WST-1-reagenssia. Osasta levyjä otettiin lisäksi supernatantti talteen jatkotutkimuksia varten. Tätä varten 24 tunnin altistuksen jälkeen edellä mainittuihin kuoppiin pipetoitiin 250 µl altistusliuosta. Tunnin altistuksen jälkeen ylimääräinen 150 µl pipetoitiin pois ja kuoppiin lisättiin 10 µl WST-1-reagenssia. Levyjä inkuboitiin yksi tunti 37 asteessa kaasukoostumuksessa 5 % CO₂ / 95 % ilmaa. Tunnin WST-1-altistuksen jälkeen 96-kuoppalevyjä ravisteltiin minuutin ajan ja absorbanssi mitattiin aallonpituudella 450 nm Victor Multilabel Counter -laitteella.

Kaiken kaikkiaan työssä tehtiin DMEM/F12:lla glukoosikonsentraatioilla 18 mmol/l ja 33 mmol/l neljä altistusta kummastakin. DMEM-liuoksilla glukoosipitoisuuksilla 5,56 mmol/l, 18 mmol/l ja 33 mmol/l altistukset toistettiin jokaisesta viisi kertaa. Tilastollista analyysia varten kaikista glukoosikonsentraatioista valittiin kolme altistussarjaa. Aallonpituustuloksista piirrettiin annosvastekäyrät ja laskettiin EC₅₀-arvot kullekin glukoosipitoisuudelle ja altistusmediumille GraphPad Prism 5 -ohjelmalla. EC₅₀-arvo kuvaa sitä altistukseen käytettävää bentsalkonikloridin määrää, joka vähentää ARPE-19-solujen elinkykyä 50 %:lla kontrolliin verrattuna. P-arvojen määrittämiseen käytettiin Studentin t-testiä.

3 Tulokset

Bentsalkonikloridin lisäys vähensi kaikissa altistussarjoissa WST-1-suolan muodostumista. Vähenneminen oli bentsalkonikloridin konsentraatiosta riippuvaista. Kullekin glukoosikonsentraatiolle ja mediumille lasketut EC_{50} -arvot on esitetty taulukossa 1.

Kun altistusmedium sisälsi DMEM:ia, vähensi 0,000625 prosenttinen bentsalkonikloridi 5,56 mmol/l glukoosilla altistettujen solujen elinkykyä 17 % ja 33 mmol/l:lla käsiteltyjen solujen elinkykyä 21 % (kuva 1A ja kuva 3). Vastaavalla bentsalkonikloridipitoisuudella oli 18 mmol/l:ssa glukoosia kasvatettujen elossa olevien solujen määrä selvästi suurempi, 46 %. Tämä ero oli myös tilastollisesti merkitsevä, 5,56 mmol/l ja 18 mmol/l glukoosia kasvatettujen solujen välillä p-arvo oli 0,0163, ja 33 mmol/l ja 18 mmol/l glukoosia kasvaneiden solujen välillä p-arvo oli 0,0391 (taulukko 2). Bentsalkonikloridin konsentraatiolla 0,00125 % oli glukoosikonsentraatiossa 18 mmol/l elinkykyisten solujen osuus 29 %. Tämä oli selvästi suurempi kuin vastaavalla bentsalkonikloridipitoisuudella altistettujen elinkykyisten solujen osuudet glukoosikonsentraatioissa 5,56 mmol/l, 6 %, ja 33 mmol/l, 3 % (kuva 4). Tässäkin erot 5,56 mmol/l ja 18 mmol/l (p-arvo 0,0196) sekä 18 mmol/l ja 33 mmol/l (p-arvo 0,0078) glukoosipitoisuuksissa kasvatettujen välillä olivat tilastollisesti merkitseviä. Bentsalkonikloridin konsentraatiolla 0,00125 % saatiin merkitsevä ero myös 5,56 mmol/l ja 33 mmol/l kasvatettujen solujen välille (p-arvo 0,0462). Kun verrattiin glukoosikonsentraatioiden EC_{50} -arvoja, 5,56 mmol/l ja 18 mmol/l (p-arvo 0,5245) ja 18 mmol/l ja 33 mmol/l (p-arvo 0,7127), ei näiden välillä todettu tilastollisesti merkitsevää eroa.

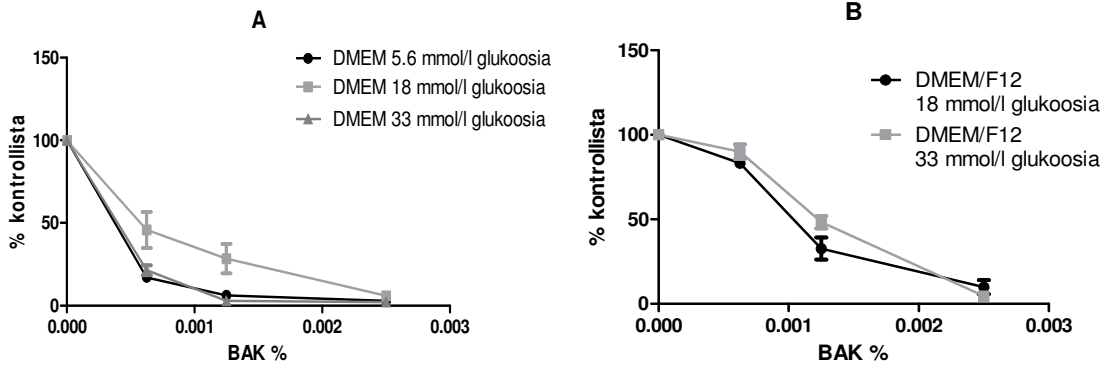
Kun altistusmedium sisälsi DMEM/F12:ia, aiheutti 0,00125 % bentsalkonikloridin lisäys 33 mmol/l glukoosia kasvatettujen solujen elinkyvyn vähennemisen 48 %:iin, kun vastaava arvo 18 mmol/l glukoosia oli 33 % (Kuva 1B). Ero oli myös tilastollisesti merkitsevä, p-arvo 0,0488. EC_{50} -arvojen välillä vastaavaa eroa ei tullut esille (p-arvo 0,8166).

Kun altistusmedieja DMEM ja DMEM/F12 verrattiin toisiinsa glukoosikonsentraatiolla 18 mmol/l, havaittiin 0,000625 % bentsalkonikloridia vähentävän DMEM-käsiteltyjen solujen elinkykyä tilastollisesti merkitsevästi 46 %:iin, kun vastaava lukuarvo DMEM/F12:lle oli 83 %, p-arvo 0,0005 (kuva 2A). Bentsalkonikloridipitoisuuksilla 0,00125 % ja 0,0025 % elossa olevien solujen määrät vähenivät molemmissa altistussarjoissa suunnilleen samassa suhteessa, eikä EC_{50} -arvoissa todettu tilastollisesti merkitsevää eroa. Glukoosikonsentraatiolla 33 mmol/l saatiin

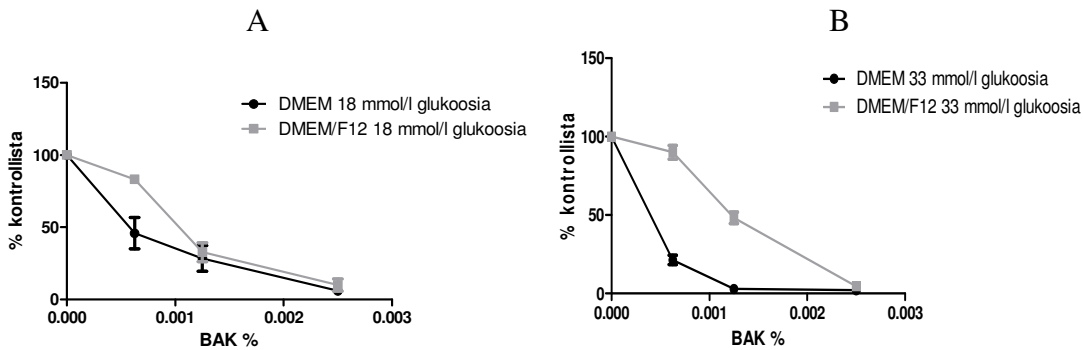
merkitsevät erot DMEM/bikarbonaatissa ja DMEM/F12:ssa kasvatettujen solujen välille sekä bentsalkonikloridipitoisuudella 0,000625 % (p-arvo < 0,0001) että 0,00125 % (p-arvo < 0,0001) (Kuva 2B). Elatusaineiden EC₅₀-arvojen välillä oli tilastollisesti merkitsevä ero glukoosipitoisuudella 33 mmol/l (p-arvo 0,0005).

Taulukko 1. Altistussarjojen EC₅₀-arvot keskiarvon keskivirheen kanssa.

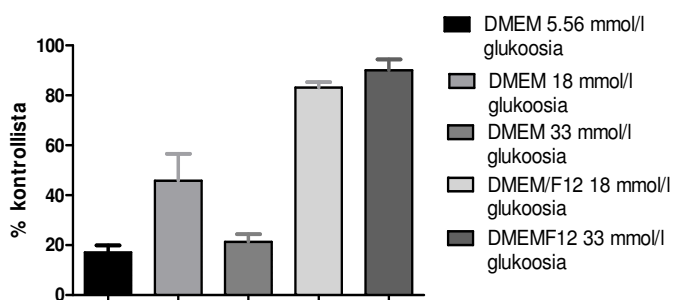
Medium	Glukoosikonsentraatio (mmol/l)	EC ₅₀ -arvo (Ka + SEM)
DMEM	5,56	0,0002580 ± 0,0001286
	18	0,0005730 ± 0,0004337
	33	0,0003998 ± 0,00006140
DMEM/F12	18	0,001114 ± 0,0002128
	33	0,001168 ± 0,00004324



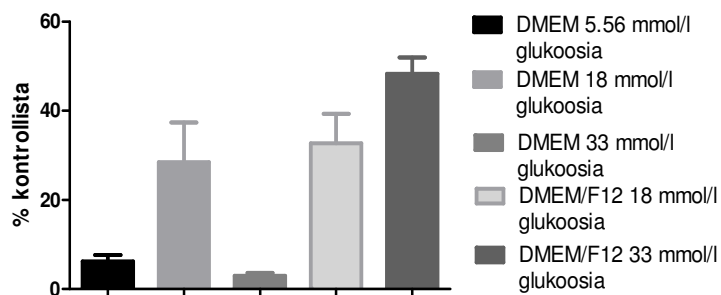
Kuva 1. WST-1-suolan väheneminen, kun medium sisältää (A) DMEM:ia ja (B) DMEM/F12:ia.



Kuva 2. WST-1-suolan väheneminen, kun altistusmedium sisältää joko DMEM:ia tai DMEM/F12:ia, ja glukoosikonsentraatio on A) 18 mmol/l tai B) 33 mmol/l.



Kuva 3. WST-1-suolan määrä, kun bentsalkonikloridikonsentraatio on 0,000625 %.



Kuva 4. WST-1-suolan määrä, kun bentsalkonikloridikonsentraatio on 0,00125 %.

Taulukko 2. P-arvot eri kasvatusmediumeille, kun bentsalkonikloridin konsentraatio on 0,000625 % ja 0,00125 %. Tilastollisesti merkitsevät arvot lihavoituina.

Elatusaine	Glukoosi-konsentraatio mmol/l	Elatusaine	Glukoosi-konsentraatio mmol/l	BAK 0,000625% p-arvo	BAK 0,00125% p-arvo
DMEM	5,56	DMEM	18	0,0163	0,0196
DMEM	5,56	DMEM	33	0,3073	0,0462
DMEM	18	DMEM	33	0,0391	0,0078
DMEM/ F12	18	DMEM/ F12	33	0,1435	0,0488
DMEM/ F12	18	DMEM	18	0,0005	0,7035
DMEM/ F12	33	DMEM	33	< 0,0001	< 0,0001

4 Pohdinta

Tämän työn tarkoituksena oli selvittää kasvatusmediumin glukoosikonsentraation vaikutus bentsalkonikloridin aiheuttamaan toksisuuteen ARPE-19-soluissa WST-1-kokeen avulla mitattuna. Soluja kasvatettiin ensin DMEM/F12-mediumissa, jonka glukoosikonsentraatio oli 18 mmol/l. Tämän jälkeen soluja kasvatettiin 24 tuntia mediuimeissa, joiden glukoosikonsentraatiot olivat joko 5,56 mmol/l, 18 mmol/l tai 33 mmol/l ja elatusaineena oli joko DMEM/F12 tai DMEM/bikarbonaatti. Tutkimuksessa havaittiin, että bentsalkonikloridin toksisuus oli selvästi pienempi 18 mmol/l:ssa glukoosia kasvatetuissa soluissa kuin 5,56 mmol/l tai 33 mmol/l kasvatetuissa, kun elatusaineena oli DMEM/bikarbonaatti. 18 mmol/l glukoosia lisäsi siis merkitsevästi solujen elinkykyä. Tämän tutkimuksen perusteella solujen elinkyvyn kannalta optimaalinen glukoosikonsentraatio ARPE-19-solujen kasvattamiseen olisi 18 mmol/l, kun käytetään elatusaineena DMEM/bikarbonaattia. Tässä vaiheessa jää kuitenkin epäselväksi, mikä vaikutus glukoosikonsentraation yhtäkkisellä vaihtamisella on tutkimustuloksiin ja selittääkö se osittain 18 mmol/l:ssa glukoosia kasvaneiden solujen selvästi parempaa elinkykyä.

Heimsath ym. (2006) vertasivat 5,5 mmol/l:ssa tai 18 mmol/l:ssa glukoosia kasvatettuja ARPE-19-soluja. Myös he havaitsivat, että 18 mmol/l:n glukoosikonsentraatiolla oli soluviljelyn kannalta myönteisiä vaikutuksia, kuten solujen jakaantumisenopeuden lisääntyminen. Lisäksi glukoosikonsentraatio vaikutti VEGF:n erittymiseen ja solujen morfologiaan. ARPE-19-solujen valmistaja suosittelee käyttämään kasvatusmediumina DMEM/F12:ia, jonka glukoosikonsentraatio on 18 mmol/l (ATCC 2011). Tämä pitoisuus on kuitenkin selvästi suurempi kuin elimistön normaali glukoosikonsentraatio, 4–6 mmol/l. Jos tutkimuksessa käytetään pelkästään ARPE-19-soluja, joita on kasvatettu 18 mmol/l:ssa glukoosia, saattaa tämä glukoosikonsentraatioero elimistön glukoosikonsentraatioon verrattuna vaikeuttaa tutkimustulosten kliinisen merkittävyyden arviointia. Jatkotutkimuksissa tulisikin käyttää 18 mmol/l:ssa glukoosia kasvatettujen solujen lisäksi 5,56 mmol/l:ssa glukoosia kasvatettuja.

Hyperglykemian on todettu lisäävän happiradikaalien muodostumista soluissa, ja tämän lisääntyneen oksidatiivisen stressin on osittain ajateltu selittävän diabeteksen komplikaatioiden kehittymistä (Giacco & Brownlee 2010). Yokoyama ym. (2006) vertasivat 5,5 mmol/l:ssa glukoosia kasvatettuja ARPE-19-soluja soluihin, joita oli altistettu 48 tunnin ajan 33 mmol/l:lle glukoosia. He havaitsivat, että ARPE-19-solut reagoivat akuutin hyperglykemian aiheuttamaan stressiin tuottamalla lisää antioksidanttientsyymejä, kuten glutathioniperoksidaasi ykköstä (GPX-1). GPX-1

kuuluu peroksidaasientsyymien perheeseen, joka vähentää solun oksidatiivista stressiä muuttamalla esimerkiksi vetyperoksidia vedeksi (Knorpp ym. 2006). Kun tässä tutkimuksessa verrattiin DMEM/bikarbonaatissa 5,56 mmol/l:ssa ja 33 mmol/l:ssa glukoosia kasvatettuja soluja, havaittiin 5,56 mmol/l:ssa glukoosia kasvatettujen solujen elinkyky merkitsevästi paremmaksi ainoastaan bensalkonikloridin pitoisuudella 0,00125 %. Tässäkin elinkykyisten solujen määrä oli selvästi pienempi kuin 18 mmol/l:ssa glukoosia kasvatettujen, ja tämän selitys jää tässä vaiheessa epäselväksi.

Tässä tutkimuksessa oli myös tarkoitus selvittää, onko DMEM/F12-mediumissa kasvatettujen solujen elinkyvyssä eroa DMEM/bikarbonaatissa kasvatettuihin, kun glukoosikonsentraatio oli sama. Vertailtavien altistusten glukoosikonsentraatiot olivat 18 ja 33 mmol/l, koska DMEM/F12-mediumia valmistetaan vain glukoosikonsentraatiolla 18 mmol/l. DMEM ei sisällä lainkaan glukoosia. Tutkimuksessa saatiin merkittävä ero DMEM:n ja DMEM/F12:n välille vain bensalkonikloridin konsentraatiolla 0,000625 %, kun glukoosikonsentraatio oli 18 mmol/l. Kun taas verrattiin 33 mmol/l:ssa glukoosia kasvatettuja soluja, oli bensalkonikloridin aiheuttama toksisuus kauttaaltaan merkitsevästi pienempi DMEM/F12:ssa kasvatetuissa soluissa.

DMEM/F12 sisältää 1:1 DMEM:ia ja Ham's F12:ia (Nutrient Medium F12). Ham's F12:n vuoksi DMEM/F12 eroaa DMEM:sta glukoosikonsentraation lisäksi aminohappojen konsentraatioiden, B12-vitamiinin, biotiinin, epäorgaanisten suolojen sekä pyruviinihapon natriumsuolan suhteen. (Invitrogen 2011a, 2011b.) Verkkokalvossa on runsaasti sinkkiä, joka on välttämätön retinan pigmenttiepiteelisolujen metabolian ja antioksidanttientsyymien normaalille toiminnalle. Sinkin puutteen on todettu johtavan muutoksiin retinan pigmenttiepiteelin rakenteessa ja solunsisäisten granuloiden kertymiseen. (Ugarte & Osborne 2001.) DMEM, toisin kuin DMEM/F12, ei sisällä sinkkiä, ja tämä voisi osittain selittää tässä tutkimuksessa havaitun DMEM/F12:ssa kasvatettujen solujen paremman elinkyvyn. DMEM/bikarbonaattielatusaineen käyttö jatkotutkimuksissa glukoosin vaikutusten selvittämisessä ARPE-19-soluissa lienee kuitenkin järkevämpää, koska sen glukoosikonsentraatio voidaan muuttaa tarvittaessa pienemmäksi kuin 18 mmol/l.

Tässä tutkimuksessa havaittiin, että bensalkonikloridin aiheuttama toksisuus oli merkitsevästi pienempi 18 mmol/l:ssa glukoosia kasvatetuissa ARPE-19-soluissa 5,56 mmol/l:ssa tai 33 mmol/l:ssa kasvatettuihin soluihin verrattuna, kun elatusaineena käytettiin DMEM/bikarbonaattia. Koska glukoosi vaikuttaa merkitsevästi ARPE-19-solujen elinkykyyn, tulisi jatkotutkimuksissa käyttää valmistajan suositteleman 18 mmol/l glukoosikonsentraation lisäksi soluja, joita on kasvatettu glukoosikonsentraatiossa 5,56 mmol/l. Työssä verrattiin lisäksi DMEM/F12- ja

DMEM/bikarbonaattielatusaineita toisiinsa glukoosikonsentraatioilla 18 mmol/l ja 33 mmol/l. Bentsalkonikloridin aiheuttama toksisuus oli merkitsevästi pienempi DMEM/F12:ssa kasvatetuissa soluissa glukoosikonsentraatiolla 33 mmol/l. DMEM/bikarbonaatin käyttö elatusaineena lienee kuitenkin jatkotutkimuksissa järkevämpää, koska tällöin pystytään tutkimaan soluja myös alle 18 mmol/l:n glukoosikonsentraatioilla.

Lähdeluettelo

- ATCC. ARPE-19 [verkkodokumentti]. Päivitetty 2011. Siteerattu 21.11.2011. www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=crl-2302&Template=cellBiology.
- Boron WF ja Boulpaep EL. 15 Sensory Transduction: Visual Transduction ja 28 Acid-Base Physiology: pH and Buffers sekä Acid-Base Chemistry, When CO₂/ HCO₃⁻ Is the Only Buffer. Kirjassa Boron WF ja Boulpaep EL, toim. Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach. 2. painos. Saunders Elsevier 2009. www.mdconsult.com, tekstiviite (Boron)
- Chung SS, Chung SK. Genetic Analysis of Aldose Reductase in Diabetic Complications. *Current Medicinal Chemistry*. 2003;10:1375–87.
- Crabbe MJ, Goode D. Aldose reductase: a window to the treatment of diabetic complications? *Progress in Retinal & Eye Research*. 1998;17:313–83.
- Dayhaw-Barker P. Retinal Pigment Epithelium Melanin and Ocular Toxicity. *International Journal of Toxicology*. 2002;21:451–454.
- Delori FC, Goger DG, Dorey CK. Age-Related Accumulation and Spatial Distribution of Lipofuscin in RPE of Normal Subjects. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2001;42:1855–66.
- Diabeettinen retinopatia [verkkodokumentti]. Käypä hoito- suositus. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin, Suomen Silmälääkäriyhdistyksen ja Diabetesliiton lääkarineuvoston asettama työryhmä. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim 2011 [päivitetty 12.6.2006]. www.kaypahoito.fi. tekstiviite: (Diabeettinen retinopatia: Käypä hoito- suositus 2006)
- Diabetes [verkkodokumentti]. Käypä hoito- suositus. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin, Suomen sisätautilääkäreiden yhdistyksen ja Diabetesliiton lääkarineuvoston asettama työryhmä. Suomalainen Lääkäriseura Duodecim 2011 [päivitetty 15.9.2009]. www.kaypahoito.fi. tekstiviite: (Diabetes: Käypä hoito- suositus 2009)
- Dunn KC, Aotaki- Keen AE, Putkey FR ja Hjelmeland LM. ARPE-19, A Human Retinal Pigment Epithelial Cell Line with Differentiated Properties. *Experimental Eye Research*. 1996;62:155–169.
- Giacco F ja Brownlee M. Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circulation Research*. 2010;107:1058–70.
- Haines D. 20 The Visual System toim. *Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications*. 3. painos. Churchill Livingstone Elsevier 2005. Verkkokirja.
- Heimsath EG, Unda R, Vidro E, Muniz A, Villazana-Espinoza ET. ja Tsin A. ARPE- 19 Cell Growth and Cell Functions in Euglycemic Culture Media. *Current Eye Research*. 2006;31:1073–1080.

Huhtala A, Alajuuma P, Bungalassi S ym. A Collaborative Evaluation of the Cytotoxicity of Two Surfactants by Using the Human Corneal Epithelial Cell Line and the WST- 1 Test. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2003;19:11–21.

Huhtala A, Mannerström M, Alajuuma P, ym. Comparison of an Immortalized Human Corneal Epithelial Cell Line and Rabbit Corneal Epithelial Cell Culture in Cytotoxicity Testing. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2002a;18:163–175.

Huhtala A, Tähti H, Salminen L ja Uusitalo H. Evaluation of adverse ocular effects of 5-Fluorouracil by Using Human Corneal Epithelial Cell Cultures. *Journal of toxicology. Cutaneous and ocular toxicology* 2002b;21:283–292.

Invitrogen. DMEM, no glucose [verkkodokumentti]. Päivitetty 2011a. Siteerattu 21.11.2011. products.invitrogen.com/ivgn/product/11966025.

Invitrogen. DMEM-F12 [verkkodokumentti]. Päivitetty 2011b. Siteerattu 21.11.2011. products.invitrogen.com/ivgn/product/11320033.

Janssen JJ, Kuhlmann ED, van Vugt AH, ym. Retinoic acid delays transcription of human retinal pigment neuroepithelium marker genes in ARPE-19 cells. *Neuroreport*. 2000;11:1571–1579.

Kalesnykiene V, Sorri I, Voutilainen R, Uusitupa M, Niskanen L. ja Uusitalo H. The effect of glycaemic control on the quantitative characteristics of retinopathy lesions in patients with type 2 diabetes mellitus: 10-year follow-up study. *Graefes Archive for Clinical & Experimental Ophthalmology*. 2009;247:335–41.

Knorpp T, Robinson SR, Crack PJ, Dringen R. Glutathione peroxidase-1 contributes to the protection of glutamine synthetase in astrocytes during oxidative stress. *Journal of Neural Transmission*. 2006;113:1145–55.

Laatikainen L ja Summanen P. Diabeettinen retinopatia. [päivitetty 24.8.2010]. Lääkäriin käsikirja. Kustannus Oy Duodecim 2011. www.terveysportti.fi, artikkeli ykt00566. tekstiviite (Laatikainen)

Labbe A, Pauly A, Liang H, ym. Comparison of Toxicological Profiles of Benzalkonium Chloride and Polyquaternium-1: An Experimental Study. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2006;22:267–278.

Meisenberg G ja Simmons WH. 30 – Integration of Metabolism. Kirjassa: Meisenberg G ja Simmons WH, toim. *Principles of Medical Biochemistry*. 3. painos. Saunders, an imprint of Elsevier 2011. www.mdconsult.com, tekstiviite (Meisenberg)

Moss S E, Klein R. ja Klein B E. The 14-year incidence of visual loss in a diabetic population. *Ophthalmology*. 1998;105:998–1003.

Nilsson SE. From basic to clinical research: a journey with the retina, the retinal pigment epithelium, the cornea, age-related macular degeneration and hereditary degenerations, as seen in the rear view mirror. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*. 2006;84:452–65.

Prasad S ja Galetta SL. Anatomy and physiology of the afferent visual system. [Review]. *Handbook of Clinical Neurology*. 2011;102:3–19.

Proulx S, Landreville S, Guerin SL ja Salesse C. Integrin $\alpha 5$ expression by the ARPE-19 cell line: comparison with primary RPE cultures and effect of growth medium on the $\alpha 5$ gene promoter strength. *Experimental Eye Research*. 2004;79:157–65.

Roche Applied Science. Cell profilation Reagent WST-1 [verkkodokumentti]. Version 2007. Siteerattu 4.8.2009. www.roche-applied-science.com/pack-insert/1644807a.pdf.

Ross M ja Pawlina W. 24 Eye. Kirjassa: Ross M ja Pawlina W, toim. *Histology: a text and atlas*. 5. painos. Baltimore, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2006, s. 834–866.

Simó R, Villarroel M, Corraliza L, Hernández C, Garcia-Ramírez M. The Retinal Pigment Epithelium: Something More than a Constituent of the Blood-Retinal Barrier—Implications for the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010;2010:190724.

Summanen P ja Tulokas S. Diabeettisen retinopatian patogeneesi. Lisätietoa aiheesta diabeettinen retinopatia. *Suomalainen lääkäriseura Duodecim* 2011. [päivitetty 4.1.2006]. www.kaypahoito.fi, artikkeli nix00480. Tekstiviite: (diabeettinen retinopatia)

Syvänne M. Mitä tyyppin 2 diabeteksessa kannattaa hoitaa ja miksi? *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 2007;123:1465–71.

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*. 1993;329:977–86.

Tian J, Ishibashi K, Honda S, Boylan SA, Hjelmeland LM ja Handa JT. The expression of native and cultured human retinal pigment epithelial cells grown in different culture conditions. *British Journal of Ophthalmology*. 2005;89:1510–1517.

Ugarte M ja Osborne NN. Zinc in the retina. *Progress in Neurobiology*. 2001;64:219–49, 2001.

Yanoff M ja Duker JS. 6.2 Retinal Pigment Epithelium ja 6.19 Diabetic Retinopathy. Kirjassa Yanoff M ja Duker JS, toim. *Ophthalmology*. 3. painos. Mosby 2008. Verkkokirja. www.mdconsult.com, tekstiviite (Yanoff).

Yokoyama T, Yamane K, Minamoto A, ym. High glucose concentration induces elevated expression of anti-oxidant and proteolytic enzymes in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Experimental Eye Research*. 2006;83:602–609.